

N° d'ordre: 2240

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE
Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse
Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS)
Département « Génie des Procédés et Systèmes Microbiens »

THESE

Présentée à l'INPT

par

Hend BEJAOU

En vue d'obtenir le titre de:

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
TOULOUSE**

École doctorale: SCIENCES DES PROCEDES

Spécialité: GENIE DES PROCEDES ET DE L'ENVIRONNEMENT

**Champignons ochratoxinogènes et ochratoxine A (OTA) dans des vignobles
Français et procédés biologiques de décontamination de l'OTA dans les
moûts de raisin**

**Soutenue publiquement le 18 Juillet 2005
devant le jury composé de:**

M. M. BARAKATE (Pr. Université de Marrakech) Président

M. A. LEBRIHI (Pr. ENSAT-INPT) Directeur de thèse
Mme. P. TAILLANDIER (MC/HDR. ENSIACET-INPT) Co-directeur de thèse
Mme. A. LONVAUD-FUNEL (Pr. Université Bordeaux 2) Rapporteur
Mme. F. SEIGLE-MURANDI (Pr. Université de Grenoble) Rapporteur

Au Seigneur de l'Univers

A mes Proches

A tout le Corps Enseignant que j'ai pu côtoyer tout au long de mes études

A Pierre et à Marie Curie pour leur amour à la Science

Remerciements

L'exercice académique de remerciements en début de mémoire est un peu réducteur du sentiment de gratitude que je souhaite exprimer pour faire part de ma reconnaissance, mais je sacrifierai à la tradition, en m'excusant par avance au prés des personnes que je pourrai oublier.

Je voudrais remercier en tout premier lieu mes très chers parents pour leurs soutiens moral et financier, pour leurs encouragements, leurs conseils, leur dévouement et pour tous les efforts et les sacrifices qu'ils n'ont cessé de faire pendant tout mon parcours et pendant la période de réalisation de la thèse.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS-INPT-UPS) dans le département Génie des Procédés et Systèmes Microbiens à l'École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INPT) sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Ahmed LEBRIHI et sous la codirection de Madame Patricia TAILLANDIER Maître de Conférences et habilitée à diriger les recherches au sein du même laboratoire. Madame Florence MATHIEU, Maître de Conférences et Chercheur dans notre laboratoire qui ne faisait pas directement partie de mes encadrants s'est toujours intéressée de très près à mon travail. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour leur accueil bienveillant au sein du laboratoire, pour leurs conseils très précieux et leurs encouragements ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont constamment témoignée.

J'adresse également mes remerciements à Mesdames les Professeurs Aline LONVAUD-FUNEL et Françoise SEIGLE-MURANDI d'avoir accepté d'évaluer en tant que rapporteurs mon travail de thèse.

Je souhaite exprimer également mes remerciements à Monsieur le Professeur Mustapha BARAKATE qui a accepté de juger ce travail.

Tout au long de mes études de troisième cycle en France j'ai bénéficié d'une bourse du Gouvernement Tunisien qui m'a été octroyée par le Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche de Tunisie. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciement pour son soutien financier.

Les conditions de travail favorables dont j'ai pu bénéficier sont le fait de l'ensemble du personnel permanent et des étudiants du laboratoire, je les remercie tous.

SOMMAIRE

Remerciements

Sommaire

Liste des abbréviations

INTRODUCTION GENERALE..... 1

CHAPITRE I. ETAT DE L'ART SUR LES TRAVAUX MENES SUR L'OCHRATOXINE A ET APPLICATION A LA FILIERE RAISIN

1. LES MYCOTOXINES	4
1.1. Nature des mycotoxines.....	4
1.2. Vecteurs d'exposition aux mycotoxines.....	4
1.3. Impacts sanitaires et économiques.....	5
2. OCHRATOXINE A	6
2.1. Nature de la molécule.....	6
2.2. Propriétés physico-chimiques.....	7
2.3. Toxicité	8
2.4. Méthodes de dosage de l'ochratoxine A	9
2.4.1. CCM (Chromatographie sur Couche Mince).	9
2.4.2. Méthodes immunoenzymatiques.....	9
2.4.3. CLHP (Chromatographie Liquide à Haute Pression).....	10
2.4.3.1. Immunopurification avant dosage par CLHP.....	10
2.4.3.2. Méthodes de confirmation.....	10
3. LES CHAMPIGNONS OCHRATOXINOGENES	11
3.1. Genres et espèces ochratoxinogènes.....	11
3.1.1. Genre <i>Aspergillus</i>	11
3.1.2. Genre <i>Penicillium</i>	15
3.2. Identification des champignons ochratoxinogènes.....	16
3.2.1. <i>Aspergillus</i>	16
3.2.1.1. Description morphologique.....	16
3.2.1.2. Les black aspergilli.....	16
3.2.2. <i>Penicillium</i>	25
4. L'ALIMENTATION VECTEUR D'OCHRATOXINE A	26
5. FILIERE RAISIN, JUS DE RAISIN ET VIN	27
5.1. Filière raisin: importance économique et dégats causés par les champignons.....	27

5.2. Niveaux de contamination à l'OTA des produits de la filière.....	28
5.2.1. Rasins secs.....	28
5.2.2. Jus de raisin.....	28
5.2.3. Vins.....	29
5.3. Champignons ochratoxinogènes au sein de la filière.....	32
5.4. Ecologie et ochratoxinogénèse des champignons.....	34
5.4.1. Facteurs intrinsèques.....	34
5.4.2. Facteurs extrinsèques.....	35
5.4.2.1. Facteurs physico-chimiques.....	35
5.4.2.2. Facteurs biologiques.....	38
5.4.2.3. Facteurs chimiques.....	39
6. GESTION DE LA CONTAMINATION AU SEIN DE LA FILIERE.....	40
6.1. Système de surveillance.....	40
6.2. Réglementation.....	41
6.3. Stratégies de lutte contre la contamination à l'OTA.....	43
6.3.1. Mesures préventives.....	43
6.3.2. Mesures curatives.....	45
6.3.2.1. Physique.....	46
6.3.2.2. Chimique (utilisation de l'ozone).....	47
6.3.2.3. Méthodes biologiques.....	48
7. CONCLUSION.....	50

CHAPITRE II. CHAMPIGNONS OCHRATOXINOGENES DANS DES VIGNOBLES FRANÇAIS ET ORIGINE DE L'OTA DANS LE RAISIN

Introduction.....	52
Plan de travail.....	54
Résultats et discussion.....	56
1. Description de la population fongique totale.....	56
2. Description de la population fongique ochratoxinogène.....	57
3. Evolution des populations fongiques totale et ochratoxinogènes.....	58
3.1. Selon les stades de maturité.....	58
3.2. Selon les régions.....	58
3.2.1. Régions du Poitou Charentes et de l'Alsace.....	58
3.2.2. Bassin méditerranéen.....	60
3.2.2.1. La région Provence-Alpes-Côte-d'Azur.....	60
3.2.2.2. Région du Languedoc-Roussillon.....	61

3.2.3. Comparaison entre les différentes régions.....	63
3.3. Selon les variétés au niveau du Bassin méditerranéen.....	64
Conclusion.....	68

ARTICLE 1

FUNGAL FLORA AND OCHRATOXIN A PRODUCTION DURING WINE GRAPE MATURATION IN FRENCH VINEYARDS DURING THREE YEARS

Abstract	70
1. Introduction	71
2. Materials and methods	72
2.1. French study area.....	72
2.2. Samples collection.....	73
2.3. Mycological analysis of grapes.....	73
2.4. Ochratoxigenic ability of the isolates	73
2.5. Ochratoxin A analysis in grapes	73
2.6. High performance liquid chromatography	73
3. Results	74
3.1. Total fungal isolates.....	74
3.2. Ochratoxigenic fungal isolates.....	75
3.3. Fungi population evolution.....	75
3.3.1. During the growing season.....	75
3.3.2. Regional variation and varieties.....	75
4. Discussion	76
Acknowledgements	78
References	78

CHAPITRE III. EFFETS DE CERTAINS AGENTS CHIMIQUES FONGICIDES ET ALCOOLS SUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION D'OCHRATOXINE A PAR LES CHAMPIGNONS

INTRODUCTION.....	91
RESULTATS.....	93

1. Effets de certains traitements fongicides utilisé dans le vignoble sur la croissance des champignons ochratoxigènes et la production de l'OTA.....	93
2. Effets in vivo des alcools sur la croissance et la production d'OTA par l'espèce <i>Aspergillus carbonarius</i>	94
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	96

ARTICLE 2

ALCOHOLS EFFETS ON GROWTH AND OCHRATOXIN A PRODUCTION BY TWO ISOLATES OF *ASPERGILLUS CARBONARIUS* SPECIES

Abstract.....	99
1. Introduction.....	99
2. Materials and methods.....	100
2.1. Moulds.....	100
2.2. Preparation of spore suspensions.....	100
2.3. Cultivation conditions.....	100
2.4. Fungal growth	101
2.5. Sample preparation	101
2.6. Detection and quantification of ochratoxin A	101
2.7. Statistical analysis.....	102
3. Results	102
3.1. Effects of methanol and ethanol on fungal growth.....	102
3.2. Effects of ethanol and methanol on ochratoxin A production.....	102
4. Discussion.....	103
Acknowledgements.....	106
References.....	106

CHAPITRE IV. PROCÉDES BIOLOGIQUES DE DECONTAMINATION DES MOUS DE RAISIN

INTRODUCTION.....	115
RESULTATS.....	116
1. Elimination de l'OTA par les <i>Aspergillus</i> de la section Nigri.....	116

1.1. Dégradation.....	116
1.2. Adsorption.....	116
2. Elimination de l'OTA par les microorganismes de l'environnement vinicole.....	117
CONCLUSION.....	119

ARTICLE 3

BIODEGRADATION OF OCHRATOXIN A BY NIGRI SECTION ASPERGILLUS SPECIES ISOLATED ON FRENCH GARPES: A HOPE FOR OCHRATOXIN A DECONTAMINATION IN GRAPE JUICES AND MUSTS

Abstract.....	121
1. Introduction.....	122
2. Materials and methods.....	123
2.1. Strains.....	123
2.2. Culturing media.....	123
2.3. Fermentation conditions.....	124
2.4. Ochratoxin A extraction.....	124
2.5. Detection and quantification of ochratoxin A.....	124
3. Results	125
3.1. Screening of Nigri section <i>Aspergillus</i> isolates for OTA detoxifying activity...	125
3.2. Kinetics of ochratoxin A degradation by three isolates of Nigri section <i>Aspergillus</i> species on SGM.....	125
4. Discussion.....	126
Acknowledgements.....	127
References.....	127

ARTICLE 4

BLACK ASPERGILLI CONIDIA AS NEW BIOLOGICAL ADSORBENT FOR OCHRATOXIN A IN GRAPE JUICES

Abstract.....	135
Introduction.....	136
Materials and methods.....	137

Strains.....	137
Culturing media.....	137
Preparation of spore suspensions.....	138
Fermentation conditions	138
Coinidia germination.....	138
Assessing grape juice tint.....	139
Detection and quantification of ochratoxin A.....	139
Statistical analysis.....	139
Results	139
Ochratoxin A removal in synthetic grape juice.....	139
Ochratoxin A removal in natural grape juice	140
Discussion	141
Acknowledgements	144
References	144

ARTICLE 5

OCHRATOXIN A REMOVAL IN SYNTHETIC AND NATURAL GRAPE JUICES BY SELECTED OENOLOGICAL *SACCHAROMYCES* STRAINS

Abstract	153
Introduction	154
Materials and methods	156
Yeast strains.....	156
Yeast wall additive.....	156
Culture media.....	156
Growing yeast assay	157
Yeast preparation.....	157
Adsorption assay.....	157
OTA extraction.....	158
Detection and quantification of OTA.....	158
Statistical analysis.....	158
Results	159
Removal of OTA by growing yeasts.....	159
Adsorption assays	159
Effect of cell concentration.....	159

Effect of time.....	160
Discussion.....	160
Acknowledgements.....	162
References.....	162
DISCUSSION GENERALE	171
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	180
REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	184

LISTE DES ABBREVIATIONS

AFSSA: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AOAC: Association of Analytical Communities

DGCCRF: Direction Générale de la Concurrence de la Consommation et de la Répression des Fraudes

FAO: food and Agriculture Organization

IARC: International Agency for research on cancer.

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

ICV: Institut Coopératif du Vin

ITV: Institut Technique de la Vigne et du Vin

MAAF: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (UK)

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ONIVIN: Office National Interprofessionnel des Vins

OTA: Ochratoxine A

PNUE: Programme des Nations Unies pour l'Environnement

SCOOP: Scientific Cooperation (UE)

WHO: World Health Organization

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Les champignons microscopiques ont de tout temps accompagné l'Homme à travers son parcours. Certains de ces microorganismes peuvent être bénéfiques et très utiles à l'Homme et sont considérés comme des acteurs importants dans plusieurs procédés de fermentation.

Toutefois, la présence de certaines autres moisissures sur plusieurs produits d'origine animale ou végétale peut avoir un impact négatif sur la qualité de l'alimentation ainsi que sur la santé humaine et animale. Destructeurs, ravageurs des cultures et/ou producteurs de substances toxiques, les champignons ont contribué depuis l'antiquité au changement du cours de l'histoire des Hommes. La rouille, agent destructeur des récoltes, avait été probablement la cause de la famine des peuples d'Egypte et d'Israël racontée par la Bible. En 1847, la moisissure *Phytophthora infestans* était également la source d'attaque des champs de pomme de terre en Irlande et a contraint à l'immigration au Canada quelques 90000 Irlandais.

Le potentiel de ces champignons à produire des substances toxiques n'était pas de moindre impact. Le "Feu de Saint Antoine": hallucinations collectives attribuées longtemps à des effets de sorcellerie et provoquées en fait par un parasite du seigle ou *Claviceps purpurea*, était depuis le moyen âge et jusqu'au 19^{ème} siècle la source d'épidémies mortelles en France et en Europe centrale.

Ce n'est que vers le début du siècle que l'on commence à soupçonner les propriétés toxiques de ces micromycètes et c'est vers 1913 que la première mycotoxine, l'acide pénicillique, a été isolée du maïs contaminé par des *Penicillium* (Alsberg et Black, 1913).

La découverte de l'ochratoxine A (OTA) n'a eu lieu qu'en 1965 par une équipe Sud Africaine au cours d'une recherche systématique sur les mycotoxines (Van der Merwe *et al.*, 1965a,b). Plus tard, plusieurs espèces au sein des genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été reconnues ochratoxinogènes.

A l'issue de plusieurs tests toxicologiques, l'OTA a été montrée néphropathique, cancérigène, tératogène et immunosuppressive et a été répertoriée dans la liste des molécules dangereuses.

Plusieurs maladies humaines spéculées ou attribuées à cette mycotoxine, telles que la néphropathie endémique des pays du Balkans (Petrova-Bocharova *et al.*, 1988) et les tumeurs du tractus urinaire et rénales observées en Tunisie (Maaroufi *et al.*, 1996) et en Egypte (Waffa *et al.*, 1998), ainsi que la détection de cette molécule dans le sang d'individus sains ou non à

travers le monde, ont montré le grand danger et l'importante exposition des Hommes à cette mycotoxine.

Si l'air (Plamgreen et Lee, 1986; Selim *et al.*, 1998) et les matériaux de construction (Andersson *et al.*, 1997) sont reconnus comme des agents d'exposition à cette molécule, l'alimentation demeure l'essentiel vecteur de cette contamination.

Que ce soit dans les produits animaux ou végétaux, différentes teneurs ont pu être détectées. Les produits de la filière céréale sont toutefois les plus contaminés et participent pour 50 à 80 % à l'ingestion de l'OTA par les Hommes. La contamination par l'OTA dans les produits de la filière raisin n'a été décelée qu'en 1996. Cette filière est alors classée 2^{ème} après la filière céréale pour sa contribution à l'ingestion en OTA des humains estimée à 15 % (FAO/OMS/PNUE, 1999).

Aussi ancienne que Noé, la vigne est une culture retrouvée à travers le monde. Toutefois 40 % du vignoble mondial est situé en Europe et assure la plus importante production de raisin et de vin (Dutruc-Rosset, 1998).

Classée 2^{ème} producteur mondial (après l'Espagne et à égalité avec l'Italie) et 1^{er} consommateur de vin à travers le monde (à égalité avec l'Italie), la France est un pays de grandes traditions vitivinicoles. La présence de l'OTA dans cette filière constitue alors un sérieux problème à la fois économique et sanitaire.

Dés 1996, les études se sont multipliées afin d'évaluer les teneurs en OTA dans les produits finis (vins de différents types, raisins secs et jus de raisin) et semi-finis (moûts) pour mieux localiser la contamination et essayer de comprendre son origine. Or, les études menées jusqu'à 2001 et se rapportant aux analyses du raisin dans les vignobles étaient très peu nombreuses voire inexistantes dans certains pays européens dont la France. Les mécanismes de formation de l'OTA étaient mal connus et diverses hypothèses avaient été émises mais pas confirmées.

Dans ce contexte, les autorités des pays européens, prenant conscience de ce risque, ont lancé en 2001 un projet de mise en place d'un système de gestion du risque de l'OTA dans la filière raisin, jus de raisin et vin: projet intitulé Wine-Ochra-Risk financé dans le cadre du 5^{ème} PCRD: "risk assesment and integrated OTA management in grapes and wine" (mai 2001-mai 2005). Six pays européens (Grande-Bretagne, France, Espagne, Portugal, Italie, Grèce) et Israël sont engagés dans ce projet.

L'objectif ultime de ce projet était la réalisation d'un programme HACCP de gestion des risques de l'OTA au sein de cette filière. Déterminer un système de surveillance, établir une législation européenne dans la filière, proposer des stratégies préventives et curatives adaptées à ses produits seraient les ultimes retombées de cette étude européenne.

L'étude menée au cours de ce travail s'inscrit dans le cadre de la contribution française à ce projet européen.

Dans un premier temps, 4 régions vitivinicoles Françaises ayant différentes localisations géographiques ont été choisies. Des échantillons de raisin de différentes variétés, ayant subi différents traitements antifongiques ont été collectés à 3 stades de maturation et au cours de trois campagnes successives. Les champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été isolés, identifiés et testés pour leur capacité à produire l'OTA. Cette mycotoxine a été également dosée dans les différents échantillons de raisin récupérés pour chaque campagne de prélèvement. La dynamique des populations fongiques (quantitative et qualitative) ainsi que la teneur en OTA dans les raisins ont été étudiées en fonction des différents paramètres choisis: la localisation géographique, la variété, le stade de maturation, le traitement fongique et le millésime.

Cette partie concernant la vigne, permettra de déterminer les points critiques de maîtrise au niveau des vignobles français afin d'assurer une meilleure prévention des cultures. Une discussion concernant le système vitivinicole français et l'origine de la contamination à l'OTA sera menée.

Dans un second temps, Les effets de stress provoqués chez certains champignons ochratoxinogènes et probablement liés à l'utilisation de certains traitements fongicides ou à l'utilisation d'alcools seront également discutés et commentés.

Enfin, des méthodes biocuratives étudiées au cours de ce travail afin d'essayer de diminuer le taux de contamination à l'OTA des jus de raisin et des moûts seront présentées. Des microorganismes appartenant à la niche écologique de la vigne (*Aspergillus* de la section Nigri) ou d'utilisation courante dans les procédés de fermentation (*Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*) ont été testés pour leur capacité de dégradation et/ou d'adsorption de l'OTA.

Ces différents aspects feront l'objet de 3 grandes parties successives, précédées d'une synthèse bibliographique intitulée: "Etat de l'Art des travaux menés sur l'OTA et application à la filière raisin". Cette partie récapitule l'ensemble des travaux se rapportant à l'OTA de façon générale et ceux s'intéressant à la filière raisin, jus de raisin et vin en particulier.

Ce travail devrait ainsi déboucher sur une meilleure compréhension de la contamination à l'OTA au sein de la filière pour une gestion efficace et une maîtrise améliorée du risque.

CHAPITRE I.

ETAT DE L'ART DES TRAVAUX MENES SUR L'OCHRATOXINE A

&

APPLICATION A LA FILIERE RAISIN

1. LES MYCOTOXINES

1.1. Nature des mycotoxines

Les mycotoxines sont des composés naturels toxiques, élaborés par de nombreuses espèces de moisissures. Ce sont des métabolites secondaires produits par les champignons et n'ayant pas de rôle évident dans l'économie de la cellule vivante qui les synthétise. Plus de 300 mycotoxines dont on a pu identifier la structure chimique ont été produites par culture, sous contrôle strict de température et d'humidité, à partir de quelques 350 types de moisissures (Le Bars et Le Bars, 1987). Seule une vingtaine de mycotoxines ont été actuellement identifiées à des teneurs significatives dans notre environnement (Hsieh, 1992).

Ces mycotoxines présentent des origines chimiques très diverses correspondant à la différence de leurs voies de biosynthèse: il s'agit de composés dérivés des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine, sporodesmine), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxines, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine) (Turner, 1971, 1983; Steyn, 1980).

1.2. Vecteurs d'exposition aux mycotoxines

Si l'air (Plamgreen et Lee, 1986; Selim *et al.*, 1998) et les matériaux de construction (Andersson *et al.*, 1997) infestés par des spores et des champignons sont des vecteurs de contaminations très graves chez les Hommes et les animaux, l'alimentation reste néanmoins, la voie d'exposition essentielle aux mycotoxines.

La FAO estime que 25% des aliments dans le monde sont significativement contaminés par des mycotoxines (Smith *et al.*, 1994). Seuls les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont impliqués dans la chaîne alimentaire humaine (Sweeny et Dobson, 1998) infestée essentiellement par les mycotoxines suivantes: les trichothécènes, l'ochratoxine, les aflatoxines, la stérigmatocystine, la zéaralénone, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique et les fumonisines (D'Mello et McDonald, 1997; Scudamore et Livesey, 1998). Les substances contaminées sont très diverses:

- les céréales (blé, orge, sorgho, millet, maïs, riz, seigle, avoine) et leurs produits dérivés (pain, pâtes, biscuits, biscottes, pâtisseries réfrigérées ou congelées)
- les oléagineux (arachide, tournesol, lin, soja)
- les fruits (agrumes, bananes, pommes, raisins) et leurs produits dérivés (jus de fruits, compotes, fruits secs (raisins secs, amandes, noix, pistaches))
- les légumes (fèves, haricots, épices (poivre noir et rouge)) et leurs produits de transformation (chips)
- les viandes (produits de charcuterie (jambon, lard et saucisses), abats, foies, reins, muscles de porc et de volailles) et les produits carnés transformés (tourte à la viande, porc salé, viande cuite)
- le lait et les produits laitiers (lait en poudre, fromage, yaourt). Dans le cas de ces produits la contamination peut être soit endogène dues aux moisissures dites «nobles» ajoutées intentionnellement dans le cadre de la fermentation, soit exogène provoquée par des moisissures de détérioration non désirées.
- Les fèves: cacao, café...

Dans les graines et les tourteaux, couramment utilisés en alimentation animale, on trouve les aspergilli, les fusaria et des penicillia. Toutefois d'autres genres peuvent être rencontrés et seraient capables de produire des mycotoxines: *Claviceps*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Phomopsis*, *Pithomyces*, *Stachybotris* et *Wallemia*.

1.3. Impacts sanitaires et économiques

La contamination des aliments de l'Homme ou des animaux par des mycotoxines peut provoquer un certain nombre de maladies: des mycoses, des allergies et des mycotoxicoses. Un bon nombre des ces mycotoxines ont un effet plus insidieux dans la mesure où elles sont cancérogènes (Le Bars et Le Bars, 1987).

Selon Mannon et Johnson (1985) environ 25 % des denrées alimentaires sont contaminées par des mycotoxines et occasionnent des pertes mondiales estimées de 5 à 10 %. Ces pertes sont dues essentiellement à la production de substances non vendables, au prix de revient augmenté par la détoxification de la matière première ou à sa destruction lorsqu'elle est trop contaminée. Des dégâts sont aussi observés chez les animaux d'élevage qui meurent ou qu'il faudrait soigner après ingestion d'une denrée contaminée.

2. OCHRATOXINE A

2.1. Nature de la molécule

L'OTA est formée par un groupement isocoumarine substitué (7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthylisocoumarine (O α)) lié à la L- β -phénylalanine par une liaison amide (figure I.1) (Abarca *et al.*, 2001).

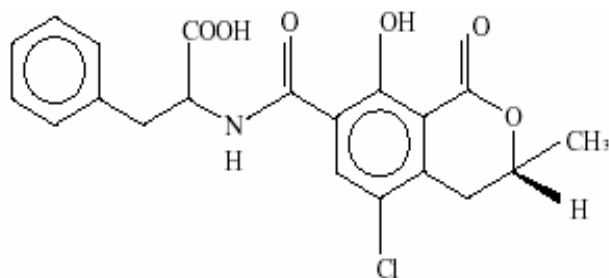


Figure I.1: structure de l'ochratoxine A (C₂₀H₁₈O₆NCl) (N°. de CAS: 303479)

L'ochratoxine A (OTA) a été découverte il y a environ une trentaine d'années par un groupe de chercheurs Sud-Africains lors d'une recherche systématique de mycotoxines (Van der Merwe *et al.*, 1965 a et b). Elle appartient à la famille des polycétoacides et plus précisément au groupe des ochratoxines. Ce groupe présente une structure générale (figure I.2) qui peut en fonction des groupement R donner en plus de l'OTA différents analogues de structures (tableau I.1).

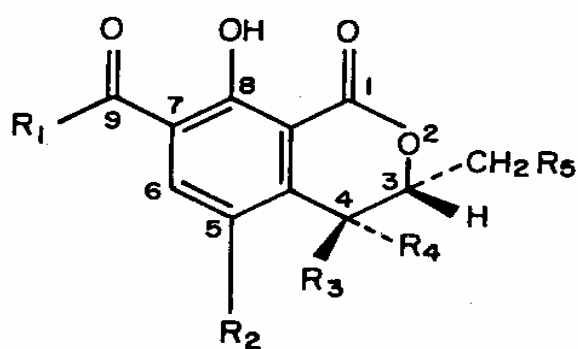


Figure I.2: Formule générale des ochratoxines (voir tableau 1 pour les structures des groupements R) (Marquardt et Frohlich, 1992)

Tableau I.1: Différentes formes d'ochratoxines

Nom commun	R1	R2	R3	R4	R5	PKa de dissociation du groupe 8-hydroxyl	Références
OTA	Phénylalanine (Phe)	Cl	H	H	H	7,05 à 7,10	Van Der Merw <i>et al.</i> , 1956; Chu, 1974
OTB	Phe	H	H	H	H	8	
OTC	Phe,éthyl ester	Cl	H	H	H	7,05 à 7,10	
OT α	OH	Cl	H	H	H	11	
OT β	OH	H	H	H	H		

Le groupe isocoumarine dans la molécule d'OTA est un squelette de pentakétide formé à partir d'acétate et de malonate par le biais du métabolisme des polycétones. La portion hétérocyclique est structurellement liée au melléine: un métabolite fongique assez répandu. L'atome de chlore est incorporé dans le pentacétone par l'action d'une chloropeptidase. La L-phénylalanine provient du métabolisme de l'acide shikimique et liée à la structure générale à travers le groupement carboxyle (Moss, 1996 in Sweeny et Dobson, 1998).

2.2. Propriétés physico-chimiques

L'ochratoxine A est la toxine la plus fréquente et la plus étudiée au sein des ochratoxines (Moss, 1998). L'Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée a étudié les caractéristiques physico-chimiques de l'OTA et a permis de préciser différentes propriétés dont voici quelques unes (Pohland *et al.*, 1982):

- l'OTA est un solide blanc de masse molaire 403,8 g/mol, ayant un point de fusion de 90°C quand elle est cristallisée dans le benzène et de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène;
- elle possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5500/mol x cm dans le méthanol;
- elle présente un maximum d'émission de fluorescence à 467 nm dans l'éthanol à 96% et à 428 nm dans l'éthanol absolu.

- L'OTA présente deux groupements qui peuvent exister ou non sous forme ionisable selon les conditions physiologiques et qui sont: le groupement carboxyle de la phénylalanine ayant un pKa de 4,4 (Valenta, 1998) et le groupement hydroxyle sur le C8 ayant un pKa entre 7,05 et 7,1 (Marquardt et Frohlich, 1992).

- La molécule présente un caractère "acide faible" (Petzinger et Ziegler, 2000) et peut entrer en réaction par ses groupements phénolique et carboxylique. Par son groupement phénol l'OTA pourrait s'adsorber sur les surfaces chargées négativement à travers des liaisons hydrogènes et ou à travers des complexes de transfert de charge (Hamaker et Thompson., 1972). Elle peut aussi s'adsorber sur des composés hydrophobes en résultat de l'interaction avec ses deux orbitales électroniques (π) (Furuya *et al.*, 1997).

- L'OTA est instable à la lumière et à l'air, elle disparaît ou se dégrade après une brève exposition à la lumière essentiellement en présence d'humidité. Dans une solution d'éthanol, elle peut rester stable pendant une année dans des conditions réfrigérées et à l'obscurité. Quand elle est chauffée jusqu'à décomposition, la molécule émet des fumées toxiques de chlore et d'oxydes d'azote (IARC, 1976).

Comparée à la patuline ou à l'acide pénicillique, l'OTA paraît plus stable dans les aliments, bien qu'elle l'est probablement moins par rapport à l'aflatoxine (Weiden Börner, 2001).

Une fois formée dans l'aliment, cette molécule peut résister à un degré appréciable à différentes étapes du processus alimentaire (cuisson, torréfaction, fermentation) (Moss, 1998; Weiden Börner, 2001). Toutefois, sa résistance à des températures aussi importantes que 250°C ne l'a pas épargné dans des conditions normales de cuisson ou de fritures, d'une partielle dégradation (Müller, 1982).

2.3. Toxicité

L'OTA est une mycotoxine toxique pour l'homme et les animaux. Elle a été rapportée néphrotoxique, tératogène, immunosuppressive et a été également classée carcinogène du groupe 2B (peut provoquer le cancer) (IARC, 1993). Elle était supposée être impliquée dans plusieurs problèmes sanitaires humains, tels que la néphropathie endémique des Balkans (Petrova-Bocharova *et al.*, 1988) et le développement de tumeurs du tractus urinaire et rénal en Tunisie (Maaroufi *et al.*, 1996) et en Egypte (Waffa *et al.*, 1998). L'OTA a été aussi détectée dans des échantillons de sang humain d'individus en bonne santé de divers pays du monde (la Suède, la Norvège (Thuvander *et al.*, 2001), le Canada, l'Allemagne, l'ex-Yugoslavie (Keeper-Goodman et Scott, 1989), le Japon (Ueno *et al.*, 1998), l'Italie

(Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1994), la France où 22 à 25 % de la population est touchée avec des teneurs en OTA comprise entre 0,1 et 130 ng/mL (Creppy *et al.*, 1991; Creppy *et al.*, 1993...) ce qui confirme la large exposition à cette molécule. Chez les animaux la néphropathie porcine (Krogh, 1978) ainsi que certains défauts craniofaciaux chez les volailles (Boorman, 1989) ont été également attribués à l'OTA.

Xiao *et al.* (1996, a, b), ont pu déduire que la présence par ordre décroissant des groupements carboxyle (de la phénylalanine), chlore (en C5) et hydroxyle (en C8) favorisent la *toxicité in vitro* et *in vivo* de l'OTA sans pour autant être essentiels à sa manifestation. Xiao *et al.* (1996 b) supposent que le groupement phénylalanine permet à l'OTA d'être guidée vers les cibles cellulaires (ce qui explique le peu de toxicité de l'Ota). Seul le groupement isocoumarinique serait responsable de la toxicité via la formation d'une forme ouverte de l'OTA (OP-OTA) à la suite de l'hydrolyse de la fonction lactone dans certaines conditions physiologiques. Cette forme a montré plus de toxicité que l'OTA. De plus, il a été constaté que l'OTA se liait aux macromolécules biologiques par une liaison ester covalente impliquant le groupement carbonyle de cette fonction lactone et il a été conclu que cette liaison serait responsable de la toxicité et génotoxicité de l'OTA qui se lierait respectivement aux protéines enzymatiques et acides nucléiques (Xiao *et al.*, 1996 a).

2.4. Méthodes de dosage de l'ochratoxine A

2.4.1. CCM (Chromatographie sur Couche Mince)

L'utilisation de la CCM, permet une détection et une quantification de l'OTA. Plusieurs protocoles ont ainsi été développés par l'AOAC (1995) (Official Methods 973.37 et 975.38), notamment pour la recherche de l'OTA. D'après Lin *et al.* (1998), les paramètres de CCM idéaux pour la détection de l'OTA sont les suivants:

Type de couche mince: gel de silice (silica gel); solvant de séparation: toluène/éthyl-acétate/90 % d'acide formique (5:4:1, v/v/v); Système de détection: une lampe UV (365 nm ou 254 nm); Méthode de quantification: densité fluorimétrique à 365 nm.

2.4.2. Méthodes immuno-enzymatiques (EIA) (Enzyme-Immuno Assay)

Il s'agit d'une technique de détection rapide basée sur la mise en place d'une réaction antigène-anticorps. L'antigène est ici l'OTA à doser et l'anticorps est une immunoglobuline anti-OTA produite par réaction immunitaire chez un animal.

La plus répandue des méthodes EIA est l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Elle s'effectue souvent sur plaque de micro-titration de 96 puits qui, avec l'établissement d'une gamme étalon, représente le dosage quantitatif d'origine immunotechnologique le plus utilisé (Dragacci et Frémy, 1998, in Cahagnier, 1998).

2.4.3. CLHP (Chromatographie Liquide à Haute Performance)

Le système CLHP nécessite l'utilisation d'une colonne analytique de type C-18, 5 μm et d'une phase mobile, délivrée à un débit de 1 mL/min, est composée d'acétonitrile/eau/acide acétique (99:99:2, v/v/v). L'acidification de la phase mobile est indispensable sinon l'OTA est éluée avec le front de solvant. La détection par fluorescence est possible directement, sans dérivation. Le fluorimètre est réglé aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ (Bragulat *et al.*, 2001). Le système CLHP associée à un détecteur à fluorescence est considéré comme la meilleure méthode d'analyse de l'OTA (Rizzo *et al.*, 2002) et est très souvent utilisé pour le dosage de l'OTA dans les jus de raisin et les vins (Visconti *et al.*, 1999; Merkaki *et al.*, 2001).

2.4.3.1. Immunopurification de l'OTA avant dosage sur CLHP

C'est une technique d'immuno-affinité destinée à purifier spécifiquement l'OTA d'un produit alimentaire avant son dosage sur CLHP. Pour cela, il existe sur le marché des colonnes d'immunoaffinité spécifique de l'OTA. Dans un premier temps l'aliment est préparé afin d'en extraire on OTA. Ensuite, l'extrait est dilué puis chromatographié sur colonne d'immunoaffinité. Après un double lavage à l'eau de la colonne, l'OTA est éluée par de l'acétonitrile ou du méthanol ou par une solution légèrement basique. Dans tous les cas, il est impératif de se conformer aux prescriptions des fournisseurs de colonnes (Dragacci et Frémy, 1998).

2.4.3.2. Méthodes de confirmation

Deux méthodes de confirmation sont couramment utilisées.

La première est une méthode chimique de formation du dérivé méthyl-ester de l'ochratoxine A (Lerch et Muller, 1990). Ce dérivé s'obtient par méthylation de l'OTA par réaction avec le chlorure de trifluorure en solution méthanol.

La deuxième est une méthode enzymatique qui est opérée par dégradation de l'OTA grâce à une carboxypeptidase et sa transformation en OT α et en phénylalanine.

3. LES CHAMPIGNONS OCHRATOXINOGENES

3.1. Genres et espèces ochratoxinogènes

L'ochratoxine A est produite par différentes espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*.

3.1.1. Genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sp. sont des microorganismes cosmopolites (Pařenicová *et al.*, 1997). Ils ont une valeur économique très importante vue leur capacité à produire divers métabolites intéressants pour l'homme mais sont également très dangereux par leur capacité à produire des métabolites toxiques. La production d'OTA a été attribuée à plusieurs sections du genre *Aspergillus* rapportées par Abarca *et al.* (2001) et Varga *et al.* (2003) (tableau I.2). Parmi ces sections la "Circumdati" est la plus anciennement réputée ochratoxinogène grâce à son représentant *A. ochraceus*, agent de destruction fatale dans les céréales et autres denrées alimentaires humaines et animales.

La section «Nigri» est aussi très importante vue l'ochratoxigénicité qui a été récemment attribuée à certains de ses représentants, *A. niger* (Abarca *et al.*, 1994; Ono *et al.*, 1995) et *A. carbonarius* (Horie, 1995; Wicklow *et al.*, 1996) prouvés comme contaminants majeurs de certaines denrées tropicales et subtropicales tels que raisins et dérivés (Zimmerli et Dick, 1996). Ils ont ainsi contracté la mauvaise réputation d'organismes potentiellement destructeurs, malgré leur grande et ancienne importance économique et industrielle dans le genre *Aspergillus* liée à leurs potentiels producteurs de métabolites utiles pour l'homme (acides gras et enzymes hydrolytiques) (Campbell-Platt et Cook, 1989).

Tableau I.2: Genre *Aspergillus*:
 Histoire chronologique des espèces ochratoxinogènes au sein des diverses sections
 aspergillaires

Section	Espèces ochratoxinogènes	Références
Circumdati (le goupe <i>ochraceus</i>)	<i>A. ochraceus</i>	Van de Merwe <i>et al.</i> , 1965 a,b; Ciegler, 1971; Smith et Moss, 1985; Cvetnic et Pepeljnak, 1990; Jiménez <i>et al.</i> , 1991; Ranjan et Sinha, 1991; Mantle et McHugh, 1993; Varga <i>et al.</i> , 1996; Abarca <i>et al.</i> , 1997
		Hesseltine <i>et al.</i> , 1972
		Mislivec <i>et al.</i> , 1975
		Pitt et Hocking, 1997
	<i>A. ostianus</i>	Wyllie et Morehouse, 1977
	<i>A. petrakii</i>	Betina, 1991
	<i>A. melleus</i>	Varga <i>et al.</i> , 1996
	<i>A. sulphureus</i>	
	<i>A. sclerotiorum</i>	
	<i>A. alliaceus</i>	
	<i>A. auricomus</i> (du soja indonésien) (rarement rencontrés dans les produits alimentaires (Pitt, 2000))	Varga <i>et al.</i> , 1996; 2003
	<i>A. wentii</i> (cacahuète d'Australie)	Varga <i>et al.</i> , 1996; 2003

	<i>A. quercinus</i> <i>IMI247368</i>	Varga <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. elegans</i>	
	(Télomorphe) <i>Neopetromyces muricatus</i>	
Flavi	<i>Petromyces albertensis</i> (télomorphe) (isolé de céréale canadienne)	Varga <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. albertensis</i>	Varga <i>et al.</i> , 1996
	<i>Petromyces alliaceus</i> (télomorphe)	Varga <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. alliaceus</i> (anamorphe)	Varga <i>et al.</i> , 1996; Bayman <i>et al.</i> , 2002
	<i>A. bombycis</i>	Varga <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. nomius</i>	
	<i>A. flavus</i>	
	<i>A. parasiticus</i>	
<i>A. toxicarius</i>		
	<i>A. pseudotamarii</i>	
Nidulantes	<i>A. ochraceoroseus</i>	Varga <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. versicolor</i>	
Cremeri	<i>A. wentii</i>	Varga <i>et al.</i> , 1996; 2003
Terrei	<i>A. terreus</i>	Ueno <i>et al.</i> , 1991; Varga <i>et al.</i> , 2003
Fumigati	<i>A. fumigatus</i>	Szebiotko <i>et al.</i> , 1981;
		Abarca <i>et al.</i> , 1997;
		Varga <i>et al.</i> , 2003
	<i>Aspergillus sp. JV3</i>	Varga <i>et al.</i> , 2003

	<i>Aspergillus viridinutans</i> <i>IMI306135</i>	Varga <i>et al.</i> , 2003
Aspergillus (groupe A. glaucus)	<i>Eurotium herbariorum</i>	Chelkowski <i>et al.</i> , 1987
Usti	<i>A. ustus</i>	Ueno <i>et al.</i> , 1991
Versicolores	<i>A. versicolor</i>	Abarca <i>et al.</i> , 1997
	<i>A. sydowii</i>	Ueno <i>et al.</i> , 1991
Nigri	<i>A. niger aggregate</i>	
	<i>A. foetidus</i> (le premier représentant des Nigri rapporté ochratoxinogène)	Ueno <i>et al.</i> , 1991 Téren <i>et al.</i> , 1996 Magnoli <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. niger var niger</i>	Abarca <i>et al.</i> , 1994; 2003
	<i>A. awamori var. fumeus</i> ; <i>A. usamii</i> ; <i>A. usamii mut. shirousamii</i>	Ono <i>et al.</i> , 1995
	<i>A. awamori</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. foetidus</i>	Téren <i>et al.</i> , 1996
	<i>A. niger group</i>	Nakajima <i>et al.</i> , 1997
	<i>A. niger</i>	Téren <i>et al.</i> , 1997
	<i>A. niger</i>	Heenan <i>et al.</i> , 1998
	<i>A. foetidus</i>	Ueno <i>et al.</i> , 1991; Magnoli <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. niger</i>	Urbano <i>et al.</i> , 2001; Da Rocha <i>et al.</i> , 2002; Taniwaki <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. niger var. awamori</i> ; <i>A. niger var niger</i>	Dalcero <i>et al.</i> , 2002; Magnoli <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. niger var niger</i>	Accensi <i>et al.</i> , 2001
	<i>A. niger</i> (type N)	Accensi <i>et al.</i> , 2001
	<i>A. carbonarius</i>	

		Horie, 1995
		Téren <i>et al.</i> , 1996
		Wicklow <i>et al.</i> , 1996
		Heenan <i>et al.</i> , 1998
	(Études de confirmation)	Joosten <i>et al.</i> , 2001; Sage <i>et al.</i> , 2002; Cabañes <i>et al.</i> , 2002; Da Rocha <i>et al.</i> , 2002; Taniwaki <i>et al.</i> , 2003; Abarca <i>et al.</i> , 2003; Battilani <i>et al.</i> , 2003; Belli <i>et al.</i> , 2004; Sage <i>et al.</i> , 2004
	<i>A. japonicus</i> var <i>japonicus</i> (nécessite une confirmation)	Dalcero <i>et al.</i> , 2002;
	<i>A. japonicus</i> (nécessite une confirmation)	Battilani <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. lacticoffeatus</i> (isolé des fèves de café au Venezuela et en Indonésie)	Samson <i>et al.</i> , 2004
	<i>A. sclerotioniger</i> (isolé de fève verte de café)	

3.1.2. Genre *Penicillium*

Différentes études s'intéressant aux champignons isolés de plusieurs aliments ont montré le faible pourcentage des *Penicillia* producteurs d'OTA (Pitt, 1987; Lillehoj *et al.*, 1980; Mills *et al.*, 1989). Longtemps confondu avec *P. viridicatum* (Ciegler *et al.*, 1973), *P. verrucosum* a fini par en être différencié et reconnu comme l'unique espèce ochratoxinogène au sein du genre *Penicillium* (Chu, 1974; Pitt, 1987, 1988; Frisvad et Filtenborg, 1989; Frisvad et Samson, 1991; Frisvad *et al.*, 1999). D'autres espèces de *Penicillium* ont été également rapportées ochratoxinogènes mais des études de confirmations sont nécessaires et Frisvad

(1989) a attiré l'attention sur des erreurs d'identification au sein de ce genre décelées au sein de plusieurs mycothèques.

3.2. Identification des champignons ochratoxinogènes

3.2.1. *Aspergillus*

3.2.1.1. Description morphologique

Le thalle est à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule. Les phialides sont formées soit directement sur la vésicule (têtes conidiennes unisériées) soit portées sur des métules ou stérigmates (têtes conidiennes bisériées). Les conidies sont sèches, en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, basipétales s'accroissant par la base, unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, brun, noir ou vert. Cellules à parois épaissies (Hülle cells) et sclérotés parfois présents (Botton *et al.*, 1990). Le genre comprend près de 180 espèces (Raper et Fennell, 1965; Samson, 1979) réparties en 18 sections essentiellement définies d'après les caractères de l'appareil reproducteur. Le genre *Aspergillus* et ses télomorphes ont été aussi typifiés (Gams *et al.*, 1985). Au sein du genre *Aspergillus*, la section Nigri présente la taxonomie la plus conflictuelle malgré tous les efforts fournis pour mieux l'élucider. Dans ce qui suit on insistera sur la taxonomie des espèces fongiques au sein de cette section. Leur histoire taxonomique chronologiquement évolutive, le conflit encore d'actualité pour différencier les espèces et celles récemment découvertes seront décrites et une clé d'identification phénotypique succincte sera présentée.

3.2.1.2. Les black aspergilli

Historique: espèces et conflit taxonomique

Depuis 1934 jusqu'à nos jours de nombreux travaux taxonomiques continuent afin de mieux reconnaître les représentants du groupe des black aspergilli. Malgré les nombreuses découvertes et avancées qui ont été faites dans ce domaine les difficultés taxonomiques persistent.

Dés les premiers travaux de Mosseray (1934), 35 espèces ont pu être identifiées dans le groupe des black aspergilli. Ce nombre a été ensuite revu à la baisse par Raper et Fennell en

1965, et 12 espèces et 2 variétés ont été retenues. A partir de cette date, les études se sont enchaînées pour accepter, modifier, ajouter ou rejeter certains éléments de cette taxonomie et les derniers apports mitigés, diversifiés et encore considérés provisoires datent de l'année 2004 (Samson *et al.*, 2004; Abarca *et al.*, 2004).

Les plus importantes étapes par lesquelles est passée la taxonomie de la section Nigri sont résumées dans le tableau I.3:

Tableau I.3: Histoire de la taxonomie des black aspergilli

Référence	Avancées taxonomiques dans le groupe des black aspergilli
Murakami, 1979 a, b	Classification des souches industrielles japonaises en 2 groupes: <i>A. niger</i> groupe et groupe des black-Koji
Al-Musallam, 1980	Sur la base des caractères morphologiques et culturaux: elle a identifié - 5 espèces facilement reconnaissables: <i>A. carbonarius</i> (bainier) Thom <i>A. heteromorphus</i> (Batista et Maia) <i>A. ellipticus</i> (Raper et fannell) Al-Musallam <i>A. helicothrix</i> (Al-Musallam) <i>A. japonicus</i> Saito (2 variétés: <i>A. japonicus</i> var. <i>japonicus</i> (Saito) et <i>A. japonicus</i> var. <i>alutaceus</i> (Izuka) Al-musallam) - le complexe <i>A. niger aggregate</i> formé par 2 espèces: <i>A. foetidus</i> et <i>A. niger</i> (différenciables par le diamètre de leurs colonies sur milieu CZA), ce dernier est composé de 6 variétés (différenciées sur la base de la dureté et les ornements des conidies) et 2 formes.
Klich et Pitt, 1988	Acceptent la nomenclature d'Al-Musallam et accepte provisoirement les deux variétés attribuées à <i>A. japonicus</i> ,
Kozakiewicz, 1989	Rejette la nomenclature d'Al-Musallam en se basant sur l'argument de la vitesse de maturation des

	<p>conidies des black aspergilli et propose une nouvelle classification basée sur l'ornementation des conidies (deux types sont observés: conidies échinulées et verruqueuses) observées par les techniques du SEM.</p> <p>Ainsi, les <i>A. niger aggregate</i> sont formés par 3 espèces: <i>A. acidus</i> Kozakiewicz, <i>A. citricus</i> (avec 2 variétés) et <i>A. niger</i> (avec 6 variétés).</p> <p>Elle maintient séparément <i>A. japonicus</i> et <i>A. aculeatus</i> avec ce dernier synonyme d'<i>A. atroviolaceus</i></p>
Kuster van Someren, Samson et Visser, 1991	<i>A. helichothrix</i> est une variante morphologique d' <i>A. ellipticus</i>
Kusters van Someren <i>et al.</i> , 1991 [Confirmations par d'autres méthodes moléculaires: Varga <i>et al.</i> , 1993; Mégnégneau <i>et al.</i> , 1993; Visser <i>et al.</i> , 1996; Pařenicová <i>et al.</i> , 1997]	Grâce à des méthodes moléculaires, ils proposent deux espèces au sein des <i>A. niger aggregate</i> : <i>A. niger</i> (groupe I); <i>A. tubingensis</i> (groupe II)
Varga <i>et al.</i> , 1994	Par des méthodes moléculaires, ils trouvent parmi les isolats d'un sol brésilien, 6 isolats identiques mais différents des deux groupes précédents. Ils introduisent une nouvelle espèce: <i>A. brasiliensis</i>
Steinman <i>et al.</i> , 1994, 1995	Proposent deux nouvelles espèces au sein des black aspergilli, isolées d'un échantillon de sol de la région de la mer morte: <i>A. homomorphus</i> et <i>A. pseudo-hétéromorphus</i> ; ces deux taxons ont été ensuite considérés identiques
Kevi <i>et al.</i> , 1996; Pařenicová <i>et al.</i> , 1996	Confirmation par méthodes moléculaires de la similarité de tous les isolats de l'espèce <i>A. carbonarius</i> (groupe unique jusqu'à maintenant)

Pitt et Hocking, 1997	Maintient séparés <i>A. japonicus</i> et <i>A. aculeatus</i>
Pařenicová <i>et al.</i> , 1997	Ajoutent aux <i>A. niger aggregate</i> l'espèce <i>A. foetidus</i> et reconnaît ainsi au sein de ce groupe <i>A. niger</i> ; <i>A. tubingensis</i> et <i>A. foetidus</i>
Pařenicová <i>et al.</i> , 2001	Reconnaissance après vérification de quatre espèces différentes et morphologiquement identiques au sein des <i>A. niger aggregate</i> : <i>A. niger</i> ; <i>A. tubingensis</i> ; <i>A. foetidus</i> et <i>A. brasiliensis</i>
Pařenicová <i>et al.</i> , 2001	Différenciation entre les deux taxons <i>A. japonicus</i> et <i>A. aculeatus</i> reconnues comme deux espèces séparées et morphologiquement identiques
Klich, 2002	La séparation entre <i>A. japonicus</i> et <i>A. aculeatus</i> reste en question
Samson <i>et al.</i> , 2004	4 nouvelles espèces découvertes parmi les black aspergilli (sur des bases morphologiques et biochimiques): <i>A. costaricensis</i> ; <i>A. lactocoffeatus</i> ; <i>A. piperis</i> et <i>A. sclerotioniger</i>
De vries <i>et al.</i> , 2004 a, b	Découverte d'une nouvelle espèce: <i>A. vadensis</i>

Pour éviter toutes confusions, plusieurs espèces mentionnées au niveau de la bibliographie telles que *A. awamori*, *A. phoenicis*, *A. ficuum* et *A. usamii* ont été réduits à des synonymes d'après ce qui a été rapporté par Varga *et al.* (2003). Il faut tout de même rappeler qu'*A. phoenicis* et *A. ficuum* étaient au départ des dénominations beaucoup plus acceptées par le code botanique qu'*A. niger*. Ce n'est qu'en 1992 que Kozakiewicz propose de garder la dénomination *A. niger* et en reçoit l'accord par le congrès botanique au Japon une année plus tard (Greuter *et al.*, 1994). Les études de Pařenicová *et al.* (1997) ont ensuite montré que différentes souches qualifiées d'*A. awamori* et *A. phoenicis* peuvent appartenir soit à l'espèce *A. niger*, soit à l'espèce *A. tubingensis* soit aux variétés d'*A. foetidus* (*A. foetidus* var. *acidus* ou *A. foetidus* var. *pallidus*) alors qu'elles étaient auparavant considérées comme variétés d'*A. niger* d'après Al-Musallam (1980) et Kozakiewicz (1989).

Différents groupes au sein de la section Nigri

Selon Abarca *et al.* (2004), les "Nigri" peuvent être classés et différenciés en 4 groupes: (1) les unisériés, les bisériés (2) *A. carbonarius* et les bisériés (3) *A. niger aggregate* et (4) les formes non communes.

• Unisériés (figure I.3)

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

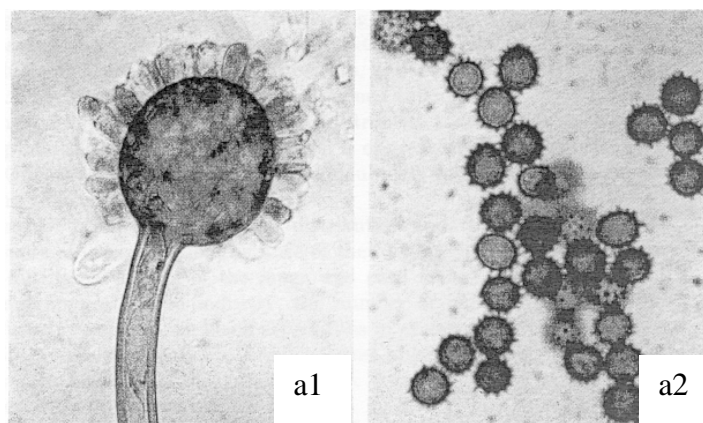
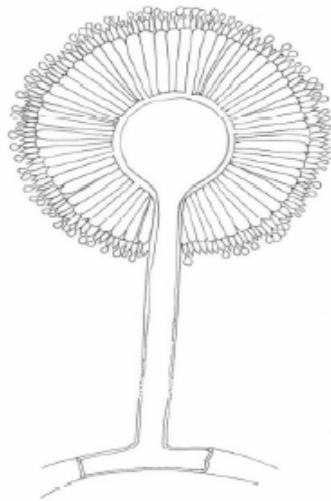


Figure I.3: *A. japonicus*, a1, tête avec des stérigmates courtes unisériées, (x 740). A2, conidies fortement échinulées, (x 1720).

• Bisériés (figure I.4)



Les bisériés regroupent: *A. niger aggregate* et *A. carbonarius*.

Figure I.4: conidiophore aspergillaire bisérié (Abarca *et al.*, 2004)

A. niger aggregate (figure I.5): a été constitué par Al-Musallam en 1980. Certains de ces représentants: *A. niger* Tiegh, *A. tubingensis* Mosseray et *A. foetidus* Raper et Fennell: ont reçu le label GRAS par la FAD (Food and Drug Administration) aux Etats Unis et sont utilisés en tant qu'outils biotechnologiques en industrie (Pařenicová *et al.*, 1997). Récemment les études de Abarca *et al.* (1994), ont montré que ce groupe est hétérogène et pourrait en fait dissimuler quelques spécimens ochratoxinogènes très difficilement de ceux qui sont utiles et sans danger. Une attention particulière s'est alors focalisée sur ce groupe afin de mieux gérer sa taxonomie et différencier ces représentants, notamment les espèces ochratoxinogènes de celles qui ne le sont pas.

Ce complexe pourrait renfermer selon les différents avis taxonomiques 2 (*A. foetidus* et *A. niger* (Al-Musallam, 1980)), 3 (*A. acidus*, *A. citricus* (*A. foetidus*) et *A. niger* (Kozakiewicz, 1989)) ou 4 taxons (Pařenicová *et al.*, 2001) (*A. niger*, *A. tubingensis* (Kusters van Someren *et al.*, 1991), *A. brasiliensis* (varga *et al.*, 1994) et *A. foetidus* (Pařenicová *et al.*, 1997))

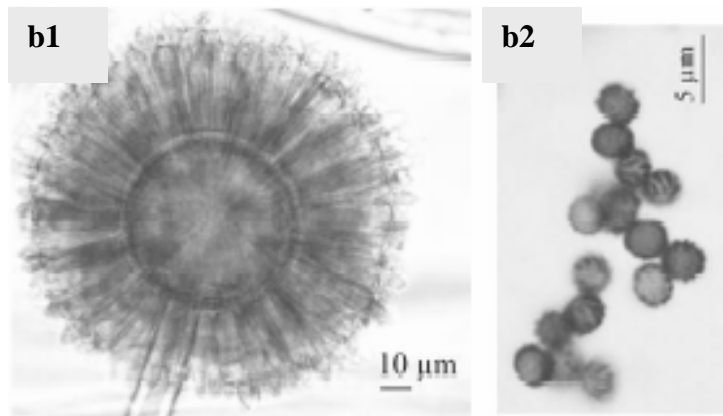


Figure I.5: *A. niger* aggregate (A-219, UAB Mycology group), tête (b1) et conidie (b2)
(Abarca *et al.*, 2004)

A. carbonarius (figure I.6): est l'espèce la plus distincte au sein de la section Nigri (Abarca *et al.*, 2004). Cette distinction est à la fois phénotypique (Raper et Fennell, 1965; Kevei *et al.*, 1996) biochimique (Kevei *et al.*, 1996) et moléculaire (Kusters-van Someren *et al.*, 1991; Mégnégneau *et al.*, 1993; Pařenicová *et al.*, 1997, 2000, 2001; Varga *et al.*, 2000, 2003). Au sein de l'espèce *A. carbonarius* une seule variété a été proposée, il s'agit: d'*A. carbonarius* var. *incidus* (Hamari *et al.*, 1999, Varga *et al.*, 2000).

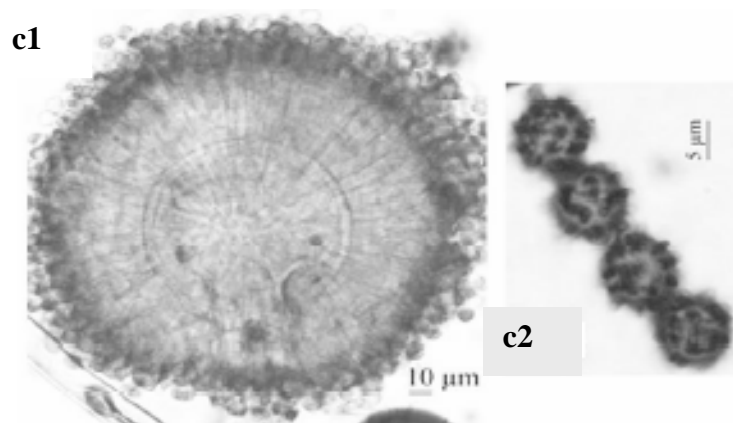


Figure I.6: *A. carbonarius* (A-1157, UAB Mycology group), tête (c1) et conidies (c2) (Abarca *et al.*, 2004)

- **Les espèces non communes:** Elles sont au nombre de 3, *A. helicothrix*, *A. ellipticus* et *A. heteromorphus*.

Clefs d'identification

Pour reconnaître de façon globale les grands groupes des black aspergilli, Abarca *et al.* (2004) propose la clef d'identification suivante en excluant les formes non communes (tableau I.4):

Tableau I.4: clé d'identification des 3 groupes essentiels des black aspergilli proposé par Abarca *et al.* (2004)

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

D'après Samson *et al.*, 2004, parmi les black aspergilli, 15 espèces dont 5 récemment découvertes (*A. vadensis* (De Vries *et al.*, 2004 a, b) *A. costaricensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotiumniger* (Samson *et al.*, 2004)) peuvent être énumérées et certains critères morphologiques distinctifs des champignons, surtout ceux rapportés ochratoxinogènes, (cultivés sur Czapek yeast extract agar (CYA) et incubés à 25°C pendant 7 jours) (Pitt et Hocking, 1997; Samson *et al.*, 2004) peuvent être retenus (tableau I.5).

Tableau I.5: Principaux caractères morphologiques des espèces appartenant à la section Nigri

Espèces (Samson <i>et al.</i> , 2004)	Tête conidienne	Présence de sclérotés	Diamètre des conidies (µm)	Formes et ornementation des conidies
<i>A. aculeatus</i>	Unisériée (pourpre brun à maturité) (Botton <i>et al.</i> , 1990)	(+)§	< 6 (4-5)	Très ellipsoïdales Globuleuses, échinulées
<i>A. japonicus</i>		(blancs à crèmes atteignant 500 µm) (Botton <i>et al.</i> , 1990)		

<i>A. carbonarius</i> *	Bisériées	(+) (jaune grisâtre)	> 6 (7-9)	Verruqueuses
<i>A. ellipticus</i>		(+)§	< 6 (parfois > 6)	Très ellipsoïdales
<i>A. niger</i> * (type N)		(-)	< 6 (3.5-5)	Sphériques, globuleuses, brunes, échinulées (Botton <i>et al.</i> , 1990)
<i>A. tubingensis</i> (type T)		(+)§		
<i>A. foetidus</i> *		(-)	< 6	
<i>A. brasiliensis</i>		(-)	< 6	
<i>A. heteromorphus</i>		(-)	< 6	
<i>A. homomorphus</i>		(-)	<6	
<i>A. costaricaensis</i>		(+)	3.5-4.3	Gobuleuse ou sub- globuleuses - Lisse quand elles sont jeunes - De paroi rugueuse et couleur brun foncé (mâtüre)
<i>A. lacticoffeatus</i> *		(-)	3.5-4.1 x 3.4-3.9	Subglobuleuse Très souvent lisses
<i>A. piperis</i>		(+) (du jaune ou brun rosâtre)	2.8-3.6 x 2.8-3.4	Lisses (jeunes) Très dure avec des striations et des bars irréguliers
<i>A. sclerotioniger</i> *		(+) (jaune orange)	5-6 x 4.9-5.6	Sub-globuleuse Lisses (jeunes) Verruqueuses et brun foncé

<i>A. vadensis</i> (De Vries <i>et al.</i> , 2004 a, b)		(-)	< 6	
---	--	-----	-----	--

* espèce productrice d'OTA confirmée

§ Caractère pas toujours présents

Finale­ment, au sein des black aspergilli, nous retenons 3 espèces principales: *A. niger* (dans le complexe *A. niger aggregate*), *A. carbonarius* (tout deux des bisériés) et *A. japonicus* (unisériés). Ces trois espèces ont été largement décrites dans la littérature (Botton *et al.*, 1990; Pitt et Hocking, 1997).

3.2.2. *Penicillium*

Le genre *Penicillium* est caracté­risé par un thalle vert ou plus rarement blanc, dont la texture est souvent utilisée comme critère de détermination. Conidiophores isolés, groupés en faisceaux, hyalins, lisses ou granuleux, simples ou ramifiés, terminés par un pénécille. Les pénécilles sont constitués, suivant le cas, soit d'un simple verticille de phialides (monoverticillés), soit d'un verticille de ramifications (métules) portant les phialides (biverticillés), soit de plusieurs verticilles successifs comportant des ramifications, des métules et des phialides (triverticillés, quadriverticillés,...). Les caractères des pénécilles servent à la différenciation des groupes et des espèces. Phialides ampulliformes ou lancéolées. Conidies disposées en longues chaînes, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres (figure I.7).

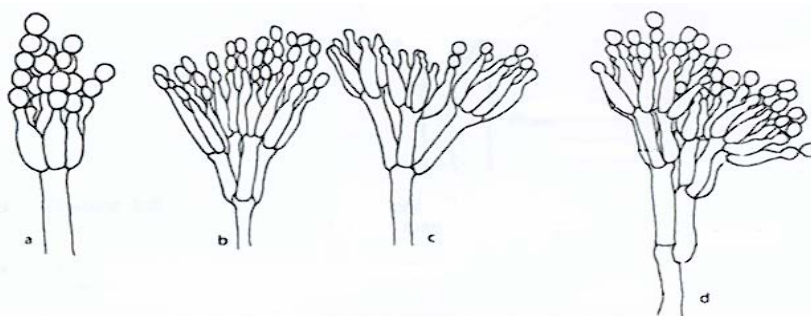


Figure I.7: caractères morphologiques des *Penicillium*, pinceau monoverticillé (a), biverticillé (b), biverticillé fourchu (furcatum) (c), terverticillé (d) (Pitt, 1979)

4. L'ALIMENTATION: UN VECTEUR D'OCHRATOXINE A

La contamination en l'OTA se produit surtout dans les céréales et les légumes secs (Programme international sur la sécurité des substances chimiques, 1990; Centre international de recherche sur le cancer, 1993), mais elle peut aussi toucher le café (Ueno *et al.*, 1991; Burdaspal et Legarda, 1999; Bucheli *et al.*, 2000), le cacao, les fruits (Majerus *et al.*, 1993), les épices et les herbes (Patel *et al.*, 1996), la bière (Jorgensen, 1998; Legarda et Burdaspal, 1998; Ueno, 1998), la viande de porc et de volaille (Kuiper-Goodman et Scott, 1989) ainsi que le lait (Skaug, 1999). L'OTA a été aussi trouvé dans le vin, le jus de raisin (Majerus et Otteneder, 1996; Zimmerli et Dick, 1996) et le raisin sec (MAAF, 1997; Heenan *et al.*, 1998). Selon des données Européennes (tableau I.6), les céréales sont manifestement les principales sources d'exposition à l'OTA pour l'homme par le régime alimentaire, tandis que les gros buveurs de vin rouge peuvent recevoir un apport considérable de cette source. Une analyse des schémas de consommation régionaux a indiqué qu'avec un niveau similaire de contamination, les céréales fourniraient des apports plus élevés dans d'autres régions que l'Europe, en particulier au Moyen-Orient, en Extrême-Orient et en Afrique (MAFF, 1997).

Tableau I.6: Ingestion d'ochratoxine A sur la base de données européennes (D'après le document de travail du CCFAC CX/FAC99/14) (FAO/OMS/PNUE, 1999)

Produits alimentaires	Concentration moyenne d'OTA en µg/Kg	Consommation en g/jour	Apport quotidien d'OTA en ng/Kg de poids corporel*	% de l'ingestion totale
Céréales	0,5	226	1,9	54
<i>Vin rouge</i>	0,19	171	0,54	15
Café	0,9	29	0,43	12
Bière	0,07	234	0,27	7,6
Viande de porc	0,1	76	0,13	3,7
<i>Raisins secs</i>	2,8	2,3	0,11	3,1
Epices	11	0,05	0,09	2,6
Volaille	0,03	53	0,03	0,9
Légumes secs	0,1	12	0,02	0,6

<i>Jus de raisin</i>	1,0	?(50)**	(0,8)?	(19)?
Total			3,5	

*Hypothèse de poids corporel de 60 Kg

**Aucune donnée fiable de consommation; non pris en compte dans l'ingestion totale

5. FILIERE RAISIN, JUS DE RAISIN ET VIN

5.1. Filière raisin: importance économique et dégâts causés par les champignons

La superficie du vignoble mondial s'élève à 7,8 millions d'hectares. 40 % de ce vignoble se trouve en Europe (2,8 millions d'hectares) et assure la production de 306 millions de tonnes de raisin par an soit 54 % de la production mondiale. Les rendements annuels en raisin de table et en raisins secs s'élèvent respectivement à 2,2 et 0,5 millions de tonnes alors que 190 millions d'hectolitres de vins sont produits et représentent 75 % de la production mondiale (dont 60 % par les pays de l'Union Européenne et 15 % par les pays européens restants). Le raisin et ses dérivés jouent en plus un rôle majeur dans les changes import-export (Dutruc-Rosset, 1998). La consommation moyenne annuelle en vin d'un européen est d'environ 29,3 litres et s'élève parfois à 50 litres et plus dans certains pays tels que la France et l'Italie. La France possède le quart du vignoble de l'Union européenne et le 1/9 du vignoble mondial. Elle se situe au 2^{ème} rang mondial parmi les producteurs de vins (à égalité avec l'Italie et derrière l'Espagne) et son secteur viticole constitue 17 % des 45 milliards d'euros de livraison agricole (Armitage, site internet; ONIVIN, 2000).

Les champignons filamenteux se développent naturellement sur le raisin, ils contaminent également les bouchons en liège des bouteilles et les barriques en bois utilisées lors du stockage et de la maturation des vins (Fleet, 2003).

Les conséquences du développement de moisissures dans la filière raisin sont multiples: la pourriture du raisin dans le vignoble, la production de métabolites et d'enzymes qui passent dans le jus et dans le vin, dépréciant l'aspect, la flaveur et la couleur, réduisant de façon qualitative et quantitative la valeur alimentaire, altérant les qualités technologiques par un retardement possible du développement des levures et des bactéries lactiques pendant les fermentations alcooliques et malolactiques et produisant des toxines (Fleet, 2003). Parmi ces toxines on peut trouver les Trichothécènes (*Trichothecium roseum*) (Schwenk *et al.*, 1988), la patuline (Scott *et al.*, 1977), la citrinine (*P. expansum*) (Vinas *et al.*, 1993), l'acide byssoclamique (*Byssoclamis nivea*) (Samson *et al.*, 1996) et l'ochratoxine A (Zimmerli *et*

Dick, 1996). Si la patuline est totalement dégradée par la fermentation alcoolique (Ough et Corison, 1980), la citrinine, les trichothécènes et l'acide byssochlamique sont très faiblement présents (traces) dans les produits de la filière. Quant à l'ochratoxine A qui est très faiblement éliminée lors de la fermentation ou le stockage, elle constitue la majeure mycotoxine au sein de la filière. L'OTA est ainsi un sérieux problème à la fois sanitaire et économique dans la filière raisin, jus de raisin et vin dans le monde et particulièrement en Europe et en France.

5.2. Niveaux de contamination en l'OTA des produits de la filière

Depuis 1996, date de la détection de l'OTA pour la première fois dans la filière raisin (Zimmerli et Dick, 1996), les études se sont multipliées. Soucieux de la santé du consommateur de ces denrées, différents organismes et laboratoires s'intéressant à la filière se sont mobilisés et différentes études ont eu lieu. Raisins, raisins secs, jus de raisin et vins sont les principaux produits au sein de la filière contaminés en l'OTA.

5.2.1. Raisins secs

De hautes concentrations en OTA ont été détectées dans le raisin sec de la Grèce et de la Turquie (MAFF, 1997), seuls 7 échantillons sur 60 ne contenaient pas de l'OTA, alors que 25 échantillons (42%) étaient contaminés à des niveaux compris entre 4 et 53,6 µg/Kg (MAFF, 1997). 13 échantillons de raisins secs ont été également analysés par la DGCCRF (1998) et l'OTA a été détectée dans 7 échantillons dont 3 d'entre eux ont présenté des teneurs supérieures à 1 µg/kg. En 1998 Heenan *et al.* ont isolé des espèces ochratoxinogènes sur des raisins secs de l'Australie et de la New-Zélande. En 2001, une enquête réalisée en France pour le compte de la revue «60 millions de consommateurs» a permis de détecter des quantités d'OTA très élevées dans un échantillon de raisin sec de label Bio s'élevant à 43,89 µg/Kg. Des concentrations élevées en OTA ont été également détectées dans des raisins secs originaires d'Angleterre (Anon, 1997; McDonald *et al.*, 1999).

5.2.2. Jus de raisin

Concernant le jus de raisin, la DGCCRF a analysé 46 échantillons commercialisés et 15 échantillons de matière première (moût ou jus de raisin). 28 % des échantillons commercialisés ou destinés à être commercialisés dépassaient la limite de 0.5 µg/Kg

(proposée aux experts de la commission européenne) et 13 % dépassaient plus de 2 fois cette limite (Bilan DGCCRF, 1999). Dumoulin et Riboulet (2002), ont pu analyser trois jus de raisin rouge et deux de raisin blanc issus de la filière biologique en France. L'ensemble des jus de raisin rouges étaient positifs à l'OTA dont les teneurs étaient comprises entre 0,16 et 0,21 µg/L.

5.2.3. Vins

Au cours de différentes études menées dans le monde, des dosages ont été réalisés sur des produits finis (vins) de différentes origines géographiques, issus de différents procédés de fabrication et de différents types et états sanitaires de raisins. Les teneurs en OTA ont été également suivies au cours de la maturation du raisin ou de la fabrication du vin. Des observations ont pu ainsi être faites et des conclusions ainsi que des hypothèses ont pu être émises pour une meilleure compréhension de l'origine de la contamination à l'OTA au sein de la filière. Ainsi les niveaux de contamination à l'OTA ont pu être reliés à différents facteurs:

Situation géographique

Zimmerli et Dick en 1996 ont pour la première fois rapporté la présence de l'OTA dans des vins et jus de raisin Européens au cours d'un travail réalisé en Suisse. Sur 133 vins analysés, les teneurs en OTA varient entre 0,03 µg/L et 0,388 µg/L.

Une étude réalisée en Allemagne en 1996 (Majerus et Otteneder, 1996) sur des vins français (20 échantillons) a permis d'obtenir des teneurs en OTA variant de 0,13 µg/L à 0,78 µg/L dans 29 % des échantillons. Le tableau I.7 récapitule les teneurs en OTA dans des vins rouges à travers le monde. Bien que le nombre d'échantillons analysés n'était pas élevé, les quantités d'OTA dosées ainsi que le maximum décelé dans un vin italien et qui s'élève à 7 µg/L étaient très significatifs.

Tableau I.7: Ochratoxine A dans les vins rouges à travers le monde (Höhler, 1998)

Pays	Nombre d'échantillon de vin analysé	Echantillons positifs	Médiane ($\mu\text{g/L}$)	Maximum ($\mu\text{g/L}$)
Allemagne	11	3	0,03	0,24
Suisse	1	1	0,07	0,07
France	20	6	0,13	0,78
Italie	10	7	0,30	7,00
Espagne	6	3	0,13	0,19
Grèce	2	1	-	0,11
Portugal	2	2	0,32	0,34
Macédoine	6	4	0,43	0,89
Tunisie	5	5	1,63	1,85
Afrique du sud	2	1	0,05	0,05
USA	2	1	0,08	0,08
Chilie	9	2	-	0,21
Australie	5	1	-	0,22

Depuis ces travaux le laboratoire de la DGCCRF de Bordeaux a souhaité évaluer les niveaux réels de contamination de vins français et marocains et il a obtenu des résultats variables: inférieurs à $0,01 \mu\text{g/L}$ dans les vins français alors que 2 échantillons de vins marocains présentaient des teneurs très élevées ($10,5$ et $15,6 \mu\text{g/L}$). Une étude marocaine a également analysé 30 échantillons de vin qu'elle a trouvé contaminés à l'OTA avec des teneurs s'élevant à plus de $3,2 \mu\text{g/L}$ (Filali *et al.*, 2001).

Les vins produits à proximité de la Mer Méditerranée sont les plus riches en OTA. Ceci a été également observés à l'issue d'une étude menée en Italie (Pietri *et al.*, 2001). En 1998, Ospital *et al.* ont dosé l'OTA dans 26 vins Français et 3 vins étrangers (1 vin Espagnol et 2 vins Portugais) et ont pu détecter des teneurs en cette mycotoxine dans 50 % des cas, plus importantes dans les vins rouges du bassin méditerranéen Français (les vins du Midi) et à l'étranger. Les valeurs décelées varient entre $0,27 \mu\text{g/L}$ (maximum détecté dans le bassin méditerranéen français) et $0,01 \mu\text{g/L}$. Les vins en provenance des autres régions françaises (Sud-ouest, Pays de Loire et Beaujolais) ne présentaient pas de teneurs notables, la plupart est en dessous du seuil de détection.

Les conditions climatiques particulières à la région méditerranéenne pourraient favoriser le développement d'*Aspergillus* et/ou de *Penicillium* potentiellement producteurs d'OTA. Il a été également rapporté que sous ce climat chaud, des quantités d'OTA plus importantes pourraient être détectées, ce qui a amené à suggérer que c'est plutôt le genre *Aspergillus* qui pourrait être impliqué dans la production d'OTA (Pietri *et al.*, 2001).

Il est toutefois intéressant de noter que les vins du nouveau monde, qui eux aussi bénéficient d'un ensoleillement important, ne sont pas contaminés par l'OTA. Le paramètre climatique ne peut donc à lui seul expliquer la formation d'OTA sur les grains de raisin. Il faudrait également considérer le paramètre variétal et l'influence du terroir, car eux aussi peuvent jouer un rôle majeur dans le développement des espèces fongiques.

Procédés technologiques

Au cours d'une étude réalisée en 2002 par Dumoulin et Riboulet, des vins de différentes régions de France ont été analysés. Neuf vins de Bourgogne et du Beaujolais ainsi qu'un vin blanc alsacien et un vin rosé des Côtes de Provence n'ont montré aucune trace d'OTA. De ce résultat, il a été conclu que l'influence du procédé de vinification sur la production d'OTA est très limitée et qu'il y a eu une absence ou une inactivité des moisissures susceptibles de produire la mycotoxine sur les baies.

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

Maturation et qualité du raisin destiné à la fermentation

Des vins doux liquoreux caractérisés par une surmaturation et par la présence de la pourriture noble de *Botrytis cinerea* ont été analysés. Aucune trace d'OTA n'a été détectée bien que l'environnement de ces baies puisse sembler favorable au développement des moisissures ochratoxinogènes (*Aspergillus* et *Penicillium*). A l'issue de cette étude, il a été conclu que l'influence des facteurs climatiques peut modifier considérablement la répartition des différents types de moisissures et devrait par conséquent être prise en considération lors des études se rapportant à la contamination à l'OTA.

Il a été aussi observé que pour les parcelles en bon état sanitaire, le recul de la date de vendange pour une récolte à maturité phénolique optimale n'entraîne pas une augmentation significative de la teneur en OTA (Rousseau et Blateyron, 2002). Toutefois, des raisins en mauvais état sanitaire donne des vins dont la teneur en OTA a tendance à augmenter avec la maturité et une vendange retardée (Rousseau et Blateyron, 2002).

De fortes teneurs en OTA ont été également détectées dans du rosé Algérien et pourrait être la conséquence de la macération d'un raisin fortement contaminé (Dumoulin et Riboulet, 2002). Des vins vendus en gros en Italie, également très infestés à l'OTA, étaient issus d'une matière première de très mauvaise qualité (Bertolini, 2000).

5.3. Champignons ochratoxinogènes au sein de la filière

A. ochraceus et *P. verrucosum* étaient les principaux champignons ochratoxinogènes au sein de la filière céréale. Jusqu'à 1998, ces deux espèces étaient également considérées responsables de la production de l'OTA sur les raisins (Ospital *et al.*, 1998). Dès 1999, des espèces ochratoxinogènes: *A. carbonarius* et *A. niger* ont été isolées du raisin sec (Codex Alimentarius Commission, 1998). Plus tard, il a été montré que la microflore responsable de la contamination du raisin en l'OTA se trouve essentiellement au niveau du champ (Battilani *et al.*, 2003).

Dans les vins, une enquête réalisée par l'Onivins en 2001 a montré que la production d'OTA est due essentiellement à *A. carbonarius*, ainsi qu'à *A. ochraceus* (dans le sud de la France) et *P. viridicatum* (plutôt *P. expansum* (voir taxonomie)) (dans les vignobles septentrionaux) (Rousseau et Blateyron, 2002). Toutefois, Sage *et al.* (2002) ont mené une étude au sud de la France (département de l'Aude) et ont montré une prédominance de l'espèce ochratoxinogène

A. carbonarius (93% (14/15) des isolats au sein de cette espèce étaient ochratoxinogènes) et l'absence des espèces *A. ochraceus* et *P. verrucosum*.

Une étude menée en Amérique du Sud, a également confirmé l'importance ochratoxigénique des black aspergilli dans la filière raisin où *A. niger* était isolée à la fois au Brésil et en Argentine et présentait un pouvoir producteur compris entre 26 et 96 µg/g (milieu YES). *A. carbonarius* était isolé uniquement au Brésil et avait un pouvoir producteur compris entre 18 et 234 µg/g YES, alors qu'*A. ochraceus* avait une très faible incidence et *P. verrucosum* était totalement absent (Da Rocha Rosa *et al.*, 2000, 2002).

Sur du raisin espagnol, trois études différentes ont montré l'importance des black aspergilli dans la contamination en l'OTA. Dans la première (Abarca *et al.*, 2001) des black aspergilli ont été isolés de raisins secs, dans la deuxième (Cabanès *et al.*, 2002), *A. carbonarius* était la seule espèce productrice d'OTA (0,22 à 1,51 µg/g CYA) sur du raisin de cuve alors que dans la troisième (Belli *et al.*, 2004a), et pour également du raisin de cuve les espèces de la section Nigri étaient prépondérantes (1,42 µg/g CYA) malgré l'existence d'une faible incidence de certains représentants de la section Circumdati.

En Italie, *A. carbonarius*, *A. fumigatus* et *P. pinophilum* ont été isolés des échantillons de raisin et ont montré des potentiels ochratoxinogènes s'élevant respectivement à 26,9, 20,22 et 16,03 ng/Kg CYA (Battilani *et al.*, 2000, 2001). En plus de son potentiel ochratoxigénique, *A. carbonarius*, représentant 50 % des isolats producteurs d'OTA, a été également reconnu comme une espèce agressive (Battilani et Pietri, 2002). Une troisième étude, menée également en Italie (Battilani *et al.*, 2003), a permis de confirmer la prédominance (91,3 % des espèces isolés et 97 % des *Aspergillus*) et le rôle ochratoxigénique des black aspergilli et plus précisément d'*A. carbonarius*. *A. ochraceus* a été toutefois occasionnellement isolé au Nord du pays, et les espèces: *A. japonicus*, *P. funiculosum* et *P. spinulosum* ont été rapportées pour la première fois ochratoxinogènes. *P. verrucosum* n'a jamais été isolé du raisin italien.

Au Portugal, aucun isolat ochratoxinogène n'a été isolé du raisin d'après une étude publiée en 2001 (Abrunhosa *et al.*, 2001). Plus récemment en 2003, 370 champignons ont pu être isolés de 11 vignobles portugais dont 14 % sont ochratoxinogènes et composés par une forte majorité black aspergillaire (90 %). Par contre sur les 301 *Penicillium* récupérés aucun isolat n'a montré un potentiel ochratoxinogène (Serra *et al.*, 2003).

Quelque soit le pays, les *Aspergillus* de la section Nigri sont donc les principaux acteurs ochratoxigéniques au sein de la filière raisin.

5.4. Ecologie et ochratoxinogénèse des champignons

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini (Leszkowicz, 1999). Celles-ci peuvent survenir au champ (avant récolte), lors du transport, pendant la transformation ou pendant toutes ces périodes. La mycotoxine peut aussi être présente alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de la mycoflore, soit du fait de traitements technologiques. Toutefois la présence de champignons ne signifie pas nécessairement l'élaboration de mycotoxines, mais qu'un potentiel de production existe. Plusieurs facteurs d'ordre biologique, physique et chimique conditionnent la mycotoxinogénèse (D'Mello *et al.*, 1997). La nature des mycotoxines produites dépend des espèces fongiques, des conditions écologiques et de la stabilité de ces toxines dans le milieu alimentaire.

Les conditions permettant la toxinogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique. Parmi ces facteurs nous distinguons les facteurs intrinsèques liés à la souche fongique et les facteurs extrinsèques constitués par l'ensemble des facteurs écologiques.

5.4.1. Facteurs intrinsèques

Au sein d'une espèce réputée toxigène, toutes les souches n'ont pas cette propriété. La fréquence de souches toxigènes dépend de l'espèce fongique considérée et, pour une même espèce, parfois de la région et du substrat d'origine (Le Bars et le Bars, 1987). Ainsi, *A. carbonarius*, une des principales espèces ochratoxinogènes au sein des vignobles, présente une incidence ochratoxinogène dépendant du pays d'origine du substrat raisin analysé. Elle est en effet de 60 % en Italie (Battilani *et al.*, 2003), 97 % au Portugal (Serra *et al.*, 2002), 25 % au Brésil (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002) et de 93.3 % en France (Sage *et al.*, 2002).

Les incidences ochratoxinogènes au sein de l'espèce *A. niger* ont également varié. 4 % au Portugal (Serra *et al.*, 2003), 17 % en Argentine et de 30 % au Brésil (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002). Pour *A. ochraceus*, 2 des 5 isolats trouvés au Brésil (40 %) étaient ochratoxinogènes (40 %) (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002).

Plus importante que cette fréquence, dépendant des performances analytiques, est la distribution du potentiel toxigène au sein de l'espèce. Ce potentiel est très variable selon les souches et sa distribution n'est pas significativement différente d'une distribution normale, dans la mesure où ce potentiel est exprimé par le logarithme de la concentration maximale en toxine.

5.4.2. Facteurs extrinsèques

5.4.2.1. Facteurs physico-chimiques

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance, le développement et la physiologie des moisissures et, en outre sur la compétition entre les espèces. Compte tenu des températures habituellement rencontrées dans les denrées alimentaires, comprises généralement entre 0 et 35 °C, et dans la mesure où les autres facteurs de l'environnement ne jouent pas de rôle limitant, des moisissures sont susceptibles de s'y développer. Ainsi, par exemple, les *Penicillium* sont, dans leur ensemble, relativement favorisés par des températures fraîches, tandis qu'une dominante *Aspergillus* signera une conservation à une température supérieure ou un début de réchauffement. *A. ochraceus* est en effet très souvent lié aux climats chauds et tropicaux et se développe à des températures modérées s'étalant entre 8 et 37°C avec un optimum entre 24 et 37°C (ICMSF, 1996). Les black aspergilli sont liés aux climats tropicaux et subtropicaux. En effet, *A. carbonarius* a été rapporté hautement résistant aux rayons solaires et au séchage par le soleil grâce à la couleur noire de ses spores. Il peut croître dans un intervalle de température allant de 10 à 40°C (Pitt *et al.*, 2000) et présente une capacité ochratoxigénique (*in vitro*) maximale sur milieu CYA (en comparaison avec le milieu YES) à 15 ou 20°C. Pour le groupe des *A. niger aggregate*, le maximum de production était obtenu sur milieu YES entre 20 et 25°C. De façon générale, la production d'OTA par les *Aspergillus* de la section Nigri se fait dans un très large intervalle de température ce qui explique que cette molécule pourrait être produite de façon continue au niveau du vignoble (Esteben *et al.*, 2004).

La température optimale de toxinogénèse est en général voisine de la température de croissance, tout en demeurant légèrement inférieure si l'on considère la toxinogénèse proprement dite, c'est à dire la production de toxine par unité de croissance du champignon (Leszkowicz, 1999).

Parmi les multiples interactions entre la température et les autres facteurs, physiques et biologiques, le couple température-humidité revêt une importance particulière.

Humidité et disponibilité en eau

Il s'agit de paramètres très importants dans le développement des moisissures. Tout d'abord, l'humidité relative de l'air environnant une spore va déterminer l'activité de l'eau (A_w) dans

cette spore et, au-delà d'une certaine valeur, dépendant de l'espèce fongique, cette spore pourra germer. Puis dans un second temps, il est nécessaire que le mycélium trouve de l'eau disponible pour poursuivre sa croissance. Quelle que soit la nature de l'aliment, à une valeur d' A_w de 0,65, aucun microorganisme ne peut se développer. Les différences de comportement entre les espèces fongiques selon la disponibilité en eau ont conduit à distinguer des espèces hygrophiles, mésophiles et xérophiles. L'influence de la disponibilité en eau est modulée par les autres facteurs environnementaux, ainsi l' A_w limite est d'autant plus faible que la température est voisine de la température optimale de croissance; l' A_w la plus favorable dépend de la nature des espèces coexistantes sur la denrée (Le Bars et Le Bars, 1987).

Pour les *Aspergilli*, la croissance optimale selon les espèces se situe entre une A_w de 0,72 et une A_w de 0,9 alors que la plupart des *Penicillia* poussent mieux à des $A_w > 0,95$ (Hocking et Pitt, 1979).

De façon générale, les moisissures se développant aux champs, comme celles se développant sur le matériel de putréfaction nécessitent une forte humidité (20 à 25 %) pour leur croissance (Hesseltine, 1976), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant seulement 10 à 18 % d'humidité (Lillehoj et Elling, 1983).

Une étude réalisée sur un milieu simulant le jus de raisin a permis de déterminer l'optimum de production de l'OTA en fonction du temps et de l'activité de l'eau. Pour *A. carbonarius* une activité d'eau de 0.96 combinée avec une période d'incubation de 5 jours permettent une accumulation maximale de l'OTA. Pour *A. niger aggregate*, plusieurs combinaison A_w -temps(jours) ont permis de produire le maximum d'OTA. Il s'agit des combinaisons suivantes: (0,995;5), (0,96;7), (0,94;9), (0,92;11), (0,90;13) (Belli *et al.*, 2004b).

Composition gazeuse

Les moisissures sont des organismes aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO_2 ont un effet dépresseur bien plus important sur la toxinogénèse que sur la croissance. Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoquent rapidement une intense toxinogénèse (Le Bars et Le Bars, 1987).

Nature du substrat

La composition chimique d'un produit alimentaire, sauf cas exceptionnel, est généralement suffisante pour le développement de la plupart des moisissures.

La toxigenèse dépend beaucoup plus étroitement que la croissance de la composition de la denrée. Cette spécificité du substrat provient de différences physiques (A_w , conductivité thermique, oxygénation) et chimique (Le Bars, 1982; Lacey, 1989). Ainsi, pour la biogenèse des dérivés de la voie des polycétoacides (ochratoxines...), on peut schématiquement faire le classement suivant, par ordre décroissant, en fonction des composants dominants dans le substrat: glucides, lipides, protides. Le raisin à maturité présentant le maximum de glucides (glucose et fructose), a été en effet rapporté comme étant un substrat idéal pour le développement des champignons ochratoxinogènes et pour la production d'OTA, comparé à ce même substrat à des stades antérieurs de développement. Quoiqu'il en soit, il faut se garder de toute extrapolation hâtive, car il peut y avoir des interférences spécifiques entre certains composés d'origine végétale ou fongique. L'acidité est aussi une des propriétés du substrat qui joue un rôle important dans le développement fongique et la toxigenèse. Patterson et Domoglou (1986) ont observé que la production d'ochratoxine A était maximale à pH 5.6.

Des aspects physiques, physico-chimiques, chimiques et éventuellement biologiques dans le cas des fruits sont recouverts par le terme substrat.

La rupture des défenses naturelles des grains ou fruits, facilite la pénétration et le développement rapide des moisissures. La résistance mécanique au tassement détermine l'importance du volume d'air intergranulaire. La faible conductibilité thermique des denrées peu hydratées favorise les échauffements locaux.

Une étude récemment réalisée en Italie avait pour objectif la détermination de la susceptibilité du raisin au développement d'*A. carbonarius* et à la production d'OTA. Le facteur variétal a pu expliquer (dans le modèle de l'analyse de la variance) à 24 % l'incidence du champignon ochratoxinogène et à 36 % la production d'ochratoxine A (Battilani *et al.*, 2004).

5.4.2.2. Facteurs biologiques

Les prédateurs

D'après des études réalisées à l'ICV, des raisins marqués par le vers de la grappe et par *Botrytis* ont donné lieu à des vins riches en OTA pouvant atteindre les 0,5 et 1 µg/L (dans 12 et 5 % des vins du millésime 2000) (Rousseau et Blateyron, 2002) et 5 µg/L pour une cuvée expérimentale (ICV, 2003). Les vers de la grappe seraient des vecteurs de champignons producteurs d'OTA. En effet, grâce aux écailles de leur épiderme, ils favorisent le déplacement des spores. De plus, par leurs perforations et micro morsures sur les baies, ils créent des voies d'entrée pour les aspergilli, les mettant ainsi en contact avec la pulpe ce qui permet la production d'OTA (ICV, 2003). Les champignons, surtout non pathogène (tels qu'*A. carbonarius* et *A. niger*) sont en effet incapables de coloniser une baie intacte et ont besoin pour se développer soit de la présence d'une blessure soit d'une dégradation pelliculaire par *Botrytis cinerea* ou par une surmaturité (WHO, 2002; Lataste *et al.*, 2003).

Les insectes et les acariens sont des vecteurs de spores et de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. Au cours de la conservation, les oiseaux et les rongeurs interviennent de manière similaire (Le Bars et Le Bars, 1987).

D'autres tests (ITV, 2003) ont également permis d'isoler *A. carbonarius* dans des fumagines, posant ainsi les cochenilles et la cicadelle pruineuse comme possibles facteurs aggravants, tout comme le défaut d'éclaircissement de la zone fructifère qui rend les baies plus susceptibles aux attaques.

Interactions entre microorganismes

Une diversité de champignons peut infester les raisins avant la récolte, il s'agit des genres: *Botrytis*, *Uncinula*, *Alternaria*, *Plasmopara*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Oidium* et *Cladosporium* (Fleet, 2001). On trouve aussi différents types de levures. Des interactions entre les moisissures ou entre levures et moisissures peuvent avoir lieu et peuvent avoir un impact sur la production de l'ochratoxine A. Chaque espèce fongique manifeste une préférence et une tolérance particulières vis à vis des caractéristiques écologiques. Sa dissémination dépend de son potentiel infectieux, notamment de l'intensité de sporulation et de la longévité des spores; cette dissémination s'effectue essentiellement par l'air (xérospores)

dans le cas des aspergilli et des penicillia. Enfin, l'extension locale de la moisissure dépend de la vitesse de sa croissance linéaire.

Sur une denrée alimentaires, une espèce fongique pourrait être confrontée avec d'autres organismes qui peuvent perturber sa croissance et la production de mycotoxines (Le Bars et Le Bars, 1987):

- Moisissures plus ou moins compétitives qui ne permettent pas l'installation d'autres espèces.
- Bactéries ou levures, dont les vitesses de multiplication sont plus rapides dans la mesure où les conditions physico-chimiques, notamment l'activité de l'eau, leur sont favorables
- Acariens et insectes, qui favorisent la dissémination des spores et altèrent les défenses naturelles de la denrée par les lésions qu'ils provoquent.

La mycoflore des denrées alimentaires: un ensemble floristique adaptatif et évolutif

La mycoflore évolue au cours de la conservation des denrées en fonction de l'ensemble des éléments définis précédemment. Ces microorganismes possèdent un remarquable pouvoir d'adaptation et un changement dans un procédé technologique peut entraîner une modification qualitative et quantitative de la mycoflore et entre autres des champignons ochratoxinogènes.

5.4.2.3. Facteurs chimiques

L'effet des pesticides est particulièrement intéressant puisqu'ils sont largement utilisés pour contrôler les maladies des plantes. L'emploi d'insecticides réduit l'apparition de mycotoxines en prévenant les lésions dues aux insectes et acariens. Certains d'entre eux ont par ailleurs des propriétés antifongiques, ce qui valorise leur utilisation. Enfin, quelques-uns exercent une action directe sur la toxinogénèse elle-même.

Si les fongicides utilisés au champ ou les agents fongistatiques employés en tant qu'additifs ou agents de conservation sont appliqués avec succès, le risque de contamination en mycotoxines est faible. Il convient toutefois d'être circonspect dans l'emploi de ces substances fongiques. En effet, certaines études ont montré qu'à concentration sub-létale, la production de mycotoxines est favorisée (Moss et Frank, 1987) (Le Bars et Le Bars, 1987). Plusieurs traitements phytosanitaire visant l'amélioration de la qualité au sein de la filière raisin ont été proposés pour le cas de la filière raisin et seront détaillés dans la partie prévention.

6. GESTION DE LA CONTAMINATION A L'OCHRATOXINE A

6.1. Système de surveillance

Les mycotoxines sont le résultat d'un processus naturel, le métabolisme secondaire des moisissures. Il est donc parfois impossible d'éviter leur production, qui est par ailleurs imprévisible. En effet, celle-ci peut avoir lieu avant comme après récolte (Pohland, voir site internet) et toute la chaîne alimentaire serait affectée. Ainsi, tous les maillons de la chaîne alimentaire doivent être surveillés: de la production à la distribution en passant par la transformation des aliments et leur stockage.

L'ochratoxine A fait partie des mycotoxines faisant l'objet d'une surveillance étroite. Des enquêtes et des plans nationaux de surveillance ont été instaurés pour mesurer la fréquence et le niveau de contamination des produits concernés. Pour assurer cette surveillance, des réseaux de laboratoire d'application, pilotés par des laboratoires nationaux de référence ou des laboratoires experts, pratiquent des milliers d'analyses chaque année. De nombreux laboratoires de l'industrie agro-alimentaire contrôlent les matières premières à risque avant utilisation ainsi que le produit fini (AFSSA, 1999).

En 1994, la commission européenne a créé un groupe de coopération scientifique (SCOOP Task 3.2.2) pour rassembler des données sur l'apport d'OTA par le régime alimentaire dans l'Union européenne; 13 états membres ont collaboré à cette enquête qui est la plus récente et la plus détaillée à ce jour.

Huit pays ont estimé que l'apport d'OTA d'origine alimentaire, sur la base de données nationales de consommation, est d'une moyenne de 1,8 ng/Kg de poids corporel/jour. Etant donnée la durée de la période biologique de l'OTA dans le sang humain (près de 35 jours), les concentrations dans le plasma sont un biomarqueur utile de l'ingestion sur plusieurs jours; cinq pays ont estimé l'ingestion à partir de ces données comme étant d'une moyenne de 0,9 ng/Kg (Commission Européenne, 1997). La similarité des estimations résultant de ces deux approches différentes donne à penser que les principales sources d'OTA sont connues et prises en compte dans les enquêtes alimentaires.

Dans la filière raisin, jus de raisin et vin, la notion de surveillance n'est pas récente. Dès la Grèce antique, la nomination d'un inspecteur des vins à Athènes représente déjà les activités d'inspection pour contrôler une denrée qui est souvent altérée.

6.2. Réglementation

Pour déterminer des limites maximales des résidus (LMR) dans les aliments il faudrait tenir compte de différents facteurs (AFSSA, 1999):

- La toxicité de la molécule et le degré d'exposition de l'Homme
- La connaissance du niveau et de la fréquence de contamination des aliments et les habitudes alimentaires
- La nature de la denrée susceptible à la contamination
- La distribution de la contamination au sein de la denrée qui est très souvent hétérogène
- La disponibilité de méthodes d'analyse fiables

Pour l'OTA, seuls 11 pays dont 4 européens (l'Autriche, le Danemark, la France et la Grèce (Höhler, 1998)) ont pu préciser des concentrations limites maximales concernant l'OTA dans les produits alimentaires (Tableau I.8)

Tableau I.8: Les concentrations limites de l'OTA dans les produits alimentaires à travers le monde

Pays	Produit	Concentration limite ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou ppb)	Référence
Autriche	Blé, seigle	5	Creppy, 2002
Danemark	Porc	25	Creppy, 2002
	Rognons de porc	10 (texte officiel)	FAO, 1997; Leszkowicz, 1999
	Céréales (produits)	5 (texte officiel)	Creppy, 2002
France	céréales	5	
Grèce	Café brut	20	FAO, 1997
Italie (ministère de la santé)	Bière	0,2	Ministro della sanità, 1999
EU	Céréales brutes (y compris riz et sarrasin)	5	Byrne, 2002 et Journal Officiel de l'Union

	Céréales transformées	3	Européenne, 2005 (2005)
	Raisin sec	10	
	Café torréfié et café moulu à l'exception du café soluble	5	
	Café instantané, café soluble	10	
Suisse	Céréales	2	FAO, 1997
Chypre	Produits laitiers	0,5	FAO, 1997
Republique Tchèque	Tous les aliments	20	Lezkowicz, 1999
	Aliments pour enfants	5	
	Aliments pour nourrissons	1	
Roumanie	Tous les aliments	5	Creppy, 2002
Israël	Céréales (produits), légumineuses (produits)	50	Leszkowicz, 1999
Brésil	Riz, orge, haricot, maïs	50	Leszkowicz, 1999
Uruguay	Riz, orge, haricot, café, maïs	50	

Au sein de la filière raisin, la législation européenne a pu fixer une concentration limite pour le raisin sec qui s'élève à 10 µg/Kg. Concernant le vin et le jus de raisin, l'élaboration des normes ont passé par différents stades. La principale difficulté pour ces produits était l'évaluation de la dose journalière acceptable. Dans le cas du vin, de nombreuses études ont finalement permis de fixer cette grandeur à 5 ng/Kg/poids corporel/jour. C'est sur cette base que les instances européennes fixeront une teneur maximale en OTA dans les vins. Jusqu'à la fin 2002, la valeur susceptible d'être retenue était de 0,5 µg/L et a fait l'objet au niveau

communautaire du règlement "CE n° 472/2002". Depuis, plusieurs études se sont déroulées et ont permis d'élever cette valeur. Il était alors préconisé de la fixer à 2µg/L (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV)) au cours de l'année 2003 avant de l'abaisser à 1 µg/L au cours de l'année 2004. La nouvelle réglementation européenne concernant l'ochratoxine A vient d'être publiée. Le règlement européen n°123/2005 de la Commission européenne a fixé le 26 janvier 2005 la teneur maximale à 2 µg/kg (ou litre) pour les vins (rouge, rosé et blanc) et tout autres boissons à base de vin et ou de moûts de raisin, à l'exception des vins de liqueur et des vins titrant plus de 15 % d'alcool (Crespy, 2005). Les teneurs en OTA ont été également fixées à 2 µg/L pour le jus de raisin et ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué (Journal Officiel de l'union Européenne, 2005).

6.3. Stratégies de luttes contre la contamination à l'OTA

Pour pouvoir lutter contre les moisissures et les mycotoxines, il faut savoir à quel moment elles se développent. Ainsi, il est possible de définir 5 moments privilégiés au cours de l'élaboration du produit: lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation et enfin lors de la consommation (Leszkowicz, 1999). A chaque maillon de la chaîne alimentaire, différentes approches peuvent être adoptées afin de limiter la contamination en mycotoxines. Il s'agit de la prévention ou de la curation selon le stade considéré.

La prévention est sans aucun doute le meilleur moyen permettant de contrôler la contamination par les mycotoxines. Cependant, la contamination est parfois présente et des procédures de détoxification doivent être mises en œuvre afin de pouvoir rendre utilisable le produit contaminé en alimentation humaine ou animale. Les procédures de décontamination sont basées sur l'élimination: physique, chimique ou biologique (Park, 1993).

Tous ces moyens de luttes contre les mycotoxines se trouvent gérés par un système de surveillance et par une réglementation élaborée par des organismes nationaux ou internationaux compétant en matière de gestion du risque alimentaire.

6.3.1. Mesures préventives

Diverses stratégies peuvent exister afin d'essayer de limiter ce développement fongique ainsi que la production de mycotoxines. Ces moyens s'inscrivent dans le cadre du bon choix des pratiques culturales, des moyens de récoltes, de stockage et de transformation. Un guide

pratique de la prévention des mycotoxines contaminant les grains et l'alimentation animale a été en effet publié (Trenholm *et al.*, 1988).

Dans la filière raisin, plusieurs avis (Rousseau et Blateyron, 2002) montrent que la maîtrise sanitaire du vignoble est le meilleur moyen de lutte contre l'OTA. Il a été en effet rapporté qu'*A. carbonarius* et *A. niger*, principaux champignons ochratoxinogènes étaient incapables de produire de l'OTA sur des baies intactes et que seuls des dommages physiques (dommages mécaniques ou par la pluie avant récolte (WHO, 2002)) ou physiologiques peuvent provoquer le développement du champignons et l'infestation de la pulpe (Zimmerli et Dick, 1996). Toutefois Battilani et Pietri (2002) ont insisté sur le caractère invasif d'*A. carbonarius* et sa capacité à pénétrer la baie même sans présence de dommage au niveau de la cuticule.

Utilisation de produits chimiques

Des essais entrepris par l'ICV ont montré que la maîtrise du ver de la grappe peut entraîner une réduction de 80 % de la contamination en OTA par rapport à un vin témoin contenant plus de 2 µg/L. La prophylaxie, grâce à des traitements insecticides, est donc la première méthode de lutte contre la contamination à l'OTA du vignoble. Ces traitements insecticides en préservant l'intégrité de la baie limitent le développement de certains champignons et donc contribuent à de faibles teneurs en OTA au moment de la vendange. Si la prophylaxie n'est pas suffisante d'autres méthodes de lutte contre l'OTA dans le vignoble passent par une lutte efficace contre la flore fongique. L'efficacité de différentes molécules fongicides a été étudiée *in vitro* puis en conditions réelles dans le vignoble. Les résultats des expérimentations *in vitro* (Leroux *et al.*, 2002) montrent que parmi les anti-mildiou, le cymoxanil, le métalaxyl et le fosétyl-Al n'ont pas d'effet sur le développement mycélien d'*Aspergillus* et de *Penicillium* tandis que les fongicides multisites comme le folpel ou le thirame ont une action sur la germination des conidies. Parmi les anti-Botrytis, le fluazinam, le fludioxinil et surtout les anilinopyrimidines (cyprodinil, pyriméthanil) présentent des activités importantes tant sur les spores que sur le mycélium.

In vivo, deux parcelles, une artificiellement contaminée avec *A. carbonarius* et l'autre non contaminée ont été traitées avec les mêmes produits chimiques précédemment énumérés. Pour la première parcelle, les résultats étaient non significatifs mais des teneurs en OTA parfois supérieures ou égales à celles rencontrées sur le moût ont été observées. Les essais sur la parcelle non contaminés semblent confirmer les résultats *in vitro*: à savoir l'efficacité contre *Aspergillus* et *Penicillium* des matières actives pyriméthanil (Scala), fludioxonil et cyprodinil

(Switch). Dans les deux essais, le fosétyl-Al (Mikal) est la seule matière active à avoir régulièrement montré les plus faibles teneurs en ochratoxine A dans les moûts et dans les vins (ITV France, 2003).

Il est également recommandé de maîtriser la pourriture acide, en particulier avec des applications de cuivre et d'éviter l'entassement de la végétation et des grappes. Ces produits chimiques utilisés ont toutefois montré des effets néfastes sur certaines levures lors de la fermentation. Les consommateurs mettent également la pression pour diminuer l'utilisation des produits chimiques ce qui a permis de penser à des solutions alternatives (Fleet, 2003).

Techniques d'exclusions biocompétitives

Dans la nature la flore fongique ayant un potentiel ochratoxinogène se trouve en présence d'une flore compétitive qui peut parfois réduire l'expression de ce potentiel. Il y a aussi la possibilité d'utiliser des microorganismes ayant un effet antagoniste. Dans le cas de l'OTA aucune méthode de ce genre n'a été proposée. Seule quelques études d'interaction ont été menées in vitro entre des microorganismes du milieu naturel, et ont montré que selon les conditions écologiques, certains champignons ochratoxinogènes peuvent augmenter, garder constant ou diminuer leur capacité à produire l'OTA (Lee et Magan, 2000).

Certaines méthodes alternatives à l'utilisation des produits chimiques peuvent être utilisées afin de limiter le développement des champignons sur le raisin. Il s'agit de l'utilisation des levures comme un agent naturel de biocontrôle (Chalutz et Droby, 1998). Il a été en effet démontré que certaines levures (*Metschnikowia pulcherrima*, des espèces de *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus* et *Saccharomyces* ainsi que les espèces de *Zygosaccharomyces*) isolées de la pellicule du raisin présentent une activité antifongique importante (Suzzi *et al.*, 1995; Guinebretiere *et al.*, 2000). Seule l'espèce *Candida oleophila* est enregistrée pour une utilisation commerciale (Droby *et al.*, 1998). Certaines de ces levures ont été montrées productrices de 1,3- β -glucanase qui détruit les parois fongiques. La possibilité des toxines killer à inhiber les champignons est toutefois une piste nécessitant plus d'exploration (Walker *et al.*, 1995).

6.3.2. Mesures curatives (post-récolte)

Toute procédure de décontamination doit répondre à des critères basiques (Bata et Lasztity, 1999):

- La mycotoxine doit être détruite ou inactivée par sa transformation en produits non toxiques
- Les spores fongiques et le mycélium doivent être détruits afin qu'il n'y ait plus de production de nouvelles quantités de mycotoxines
- L'aliment décontaminé doit garder ses valeurs nutritives et sa qualité organoleptique
- La procédure adoptée doit être économiquement faisable. Le coût de la procédure de décontamination doit être plus bas que celui de la denrée contaminée.

6.3.2.1. Physique

Le Procédé technologique

Les suivis de la teneur en OTA lors de la fermentation alcoolique, ont montré l'impact significatif de cette étape technologique sur les teneurs en OTA des vins. En effet, une équipe de l'université du Minho membre du groupe Wine-Ochra-Risk montre qu'au cours de la vinification d'un moût artificiellement contaminé à l'OTA, une disparition réelle de la toxine a lieu surtout pendant la phase du débouillage (lors de la séparation entre les phases liquide et solide). Dans d'autres études, l'OTA est également partiellement éliminée (à 35 %) lors de la fermentation d'un moût de raisin artificiellement enrichi en OTA (4 µg/L) (Collaboration entre IFBM, UMR Xénobiotiques et l'ITV France, 2003). Le marquage au tritium de la molécule OTA a montré qu'aucune métabolisation de la molécule n'a lieu au cours de la fermentation et une simple adsorption de la molécule sur les levures a été supposé (hypothèse). En se basant sur cette hypothèse, des essais réalisés par l'ICV ont montré qu'après 6 mois d'élevage sur lies (essai réalisé sur jus sans prise en compte de la macération), la teneur finale en OTA des vins était inférieure de 10% à celle du témoin élevé traditionnellement (Rousseau, 2003 et ICV, 2003). Le problème semble par ailleurs différent face à une macération classique de baies contaminées au vignoble et des teneurs en OTA plus importantes dans les vins que dans les moûts ont été observées. Des confirmations de ces résultats devront toutefois être faites compte tenu des imprécisions sur les méthodes de dosage de l'OTA.

Le sulfitage précoce du raisin entraîne une diminution nette de la teneur en OTA sur des raisins faiblement contaminés (vins à moins de 0,3 µg/L en OTA) mais n'empêche pas le développement de teneurs élevées à partir d'une vendange altérée. Avec des moyens autorisés en œnologie, il est difficile d'abaisser de plus de 20 à 25 % la teneur en OTA d'un vin naturellement riche.

Parmi les techniques utilisées en fermentation, les traitements de collages ont peu d'effet sur les teneurs en OTA et varient selon les marques des produits de collage utilisés (Rousseau et Blateyron, 2002; Blateyron et Michel, 2003; Rousseau, 2003). Les seuls traitements œnologiques efficaces sont l'utilisation de charbons (85 % d'élimination à une dose de 20 g/hL) (Dumeau et Trioné, 2000; Castellari *et al.*, 2001; Rousseau et Blateyron, 2002) et de caséinate de potassium (82 % d'élimination à 150 g/hl) interdits sur les vins rouges et qui entraînent une dégradation de la qualité tant gustative que commerciale.

Adsorbants non nutritifs

Dans la filière raisin, différentes études encore théoriques ont été récemment réalisées afin de réduire les teneurs en OTA. En effet, le traitement des vins rouges par des lies de vins rouges ou blancs permet d'éliminer de façon significative les teneurs en OTA (respectivement à 63 et 74 % après 80 jours) (Garcia-Moruno *et al.*, 2005).

Radiations γ

L'irradiation des fruits et entre autre le raisin de table, à une dose de 1,5 à 3,5 KGy diminue significativement la charge fongique comparée au témoin. La production de mycotoxines a également diminuée en augmentant la dose d'irradiation et n'est plus détectée à 5 KGy (Aziz et Moussa, 2002).

6.3.2.2. Chimique: utilisation de l'ozone

Il s'agit d'un agent antimicrobien très puissant ayant de nombreuses applications au sein de l'industrie alimentaire. Il a été utilisé pendant des dizaines d'années dans plusieurs pays et a pu recevoir le statut GRAS aux Etats Unis d'Amérique.

Ce gaz a été rapporté utile pour éliminer les mycotoxines des produits agricoles. McKenzie *et al.* (1997) ont pu en effet réduire l'OTA à des teneurs non détectables en 15 secondes et sans la génération de sous-produit en utilisant 10 % (poids) d'ozone. Les seuils de l'activité microbiocidale par l'ozone aqueux (0,3-0,5 mg/L) contre les spores d'*Aspergillus* et de *Penicillium* étaient respectivement de 90 à 180 min et de 5 à 10 min d'exposition respectivement (Naitoh et Shiga, 1982).

De faibles concentrations d’ozone et un court temps de contact sont suffisants pour inactiver notamment les champignons. La susceptibilité des microorganismes à l’ozone varie selon l’état physiologique des cultures, pH, température, humidité, présence d’additifs (acides, surfactants, sucres...). En effet, la diminution de la température augmente la solubilité de l’ozone. Sa stabilité augmente quand le pH diminue (Kim *et al.*, 1999).

L’ozone a également permis d’augmenter la durée de vie de certains fruits (Kim *et al.*, 1999). Un traitement de raisins pendant 20 min à 8 mg/L l’ozone a considérablement réduit le nombre de bactéries, de champignons et de levures (Sarig *et al.*, 1996). Grâce au traitement à l’ozone, la pourriture des raisins à l’issue de l’entreposage à basse température a été réduite et leur durée de vie a augmenté. Stander (1985) a développé un traitement à l’ozone pour les jus de fruits et les vins afin de minimiser la détérioration de leur qualité.

Toutefois, des doses excessives peuvent provoquer l’oxydation de certains ingrédients à la surface des aliments (Rice *et al.*, 1982) et provoque une décoloration et une détérioration de la saveur (Fournaud et Lauret, 1972) due dans certains cas à l’oxydation des lipides (Chen *et al.*, 1987).

6.3.2.3. Méthodes biologiques

Malgré le succès relatif des méthodes précédemment décrites, elles présentent encore une efficacité limitée, un coût élevé et occasionnent d’importantes pertes nutritives et organoleptiques au niveau des produits contaminés. Plusieurs spécialistes considèrent que les méthodes biologiques de décontamination sont les meilleures (Bata et Lasztity, 1999).

Parmi ces méthodes aucune n’a encore été appliquée dans l’industrie alimentaire et entre autre dans la filière raisin.

Par les plantes

Ruhland *et al.* (1994;1996b;1996a) rapporte que les cultures cellulaires de blé, de maïs, tomate, soja et d’autres plantes transforment complètement l’OTA en un nombre de sous produits. Ces réactions consistent en l’hydrolyse de la fonction ester et de la liaison peptidique, méthylation et hydroxylation. Toutes les plantes permettent d’avoir les mêmes produits de transformation. Certaines de ces transformations aboutissent à une perte de la toxicité de l’OTA.

Par les enzymes

Il a été montré que l'utilisation d'enzymes convient fort mieux que les méthodes physiques ou chimiques puisque le substrat est spécifique (Lu *et al.*, 2001).

Une lipase isolée d'une culture d'*A. niger* (non pure) commerciale (Stander *et al.*, 2000) et une carboxypeptidase A (Deberghes *et al.*, 1995; Stander *et al.*, 2001) avaient la capacité de dégrader l'OTA en OT α et phénylalanine. L'OTA peut être hydrolysée par des peptidases non spécifiques en OT α et en phénylalanine (Pitout, 1969). En plus de la liaison peptidique, la liaison lactone de l'OTA pourrait être transformée par des estérases d'origine microbienne (Madsen *et al.*, 1983).

Après ouverture de la liaison lactone, la toxicité de l'OTA vis à vis de *Bacillus brevis* disparaît (Xiao *et al.*, 1996b) et sa demi-vie chez le rat est raccourcie significativement (Li *et al.*, 1997). Toutefois, l'ouverture du noyau lactone de l'OTA est réversible et la toxine peut être régénérée sous des conditions acides (Valenta et Richter, 1998).

Par les microorganismes

Plusieurs microorganismes ont la capacité de convertir l'OTA en OT α , un composé moins toxique (Tableau I.9). *A. niger* pourrait aussi dégrader l'OT α en un composé inconnu, où le noyau isocoumarine semble serait ouvert mais dont le mécanisme réactionnel reste non élucidé (Varga *et al.*, 2000).

Tableau I.9: Microorganismes capables de dégrader l'ochratoxine A.

Microbes	références
Microbes du rumen des animaux (surtout la fraction protozoaire)	Hult <i>et al.</i> , 1976; Galtier et Alvinerie, 1976; Kiessling <i>et al.</i> , 1984; Akiyama, 1997
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Westlake <i>et al.</i> , 1987
<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium sp.</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Hwang et Draughon, 1994 Skrinjar <i>et al.</i> , 1996
<i>Phenylobacterium immobile</i>	Wegst et Lingens, 1983

<i>A. niger, A. fumigatus, A. japonicus</i>	Varga <i>et al.</i> , 2000
<i>A. niger, A. versicolor, A. wentii, A. ochraceus</i>	Abrunhosa <i>et al.</i> , 2002
<i>Pleurotus ostriatus</i>	Engelhardt, 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus sp., Bacillus subtilis, B. licheniformis</i>	Böhm <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhizopus sp.</i> (plus de 65% en 16 jours) <i>R. stolonifer, R. microsporus, R. homothallicus, R. oryzae</i>	Varga <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus sanfransisco, Saccharomyces cerevisiae</i>	Piotrowska et Zakowska, 2000
<i>Pseudotaphrina kochii</i> (microflore d'un invertébré: colioptère)	Shen et Dowd, 1991

Certains microorganismes (*Aspergillus* de la section Nigri, *Penicillium*, *Botrytis*, *Rhizopus*...) appartenant à l'environnement du raisin ont été montrés capables d'éliminer la mycotoxine *in vitro* sur plusieurs milieux synthétiques (Abrunhosa et al., 2002). Cette capacité pourrait être prise en considération lors des études sur l'infestation par l'OTA des produits de la filière raisin, jus de raisin et vin.

7. CONCLUSION

La contamination des aliments à l'ochratoxine A résulte d'une activité métabolique secondaire de différentes espèces fongiques des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Molécule stable et persistante, très toxique pour l'homme et pour animaux, sa présence récemment découverte dans les produits de la filière raisin n'est pas passée inaperçue dans le monde scientifique.

Différentes études lancées dès 1996 ont essayé de déterminer les teneurs en OTA dans différents produits de la filière. Différentes contaminations ont été détectées notamment sur les raisins secs qui présentent des concentrations très élevées. Vins et moûts étaient également soumis au test et les teneurs en OTA variaient selon la localisation géographique. Fonction de la latitude, la contamination augmentait du nord au sud et était à son apogée dans le bassin méditerranéen.

Les climats chauds, supposés favorables au développement de la flore fongique ochratoxinogène auraient pu expliquer cette contamination méditerranéenne si les vins du nouveau monde produits dans des climats aussi chauds n'étaient pas très faiblement contaminés. Variétés et terroirs pourraient alors probablement intervenir dans cette contamination. La contamination était aussi croissante des vins rouges, aux rosés aux blancs. Les procédés technologiques ont été supposé être la cause de ces différences. Développement fongique ou extraction de l'OTA à partir de la pellicule des cépages rouges lors de la macération, étaient les principales hypothèses, ni confirmées ni infirmées mais émises pour expliquer ce fait.

La qualité du raisin était également étudiée et un bon état sanitaire des grappes permettrait de produire un vin faiblement contaminé en l'OTA.

Pour la flore fongique ochratoxinogène au sein de cette filière, différentes suppositions ont tout d'abord adopté la flore céréalière, *P. verrucosum* et *A. ochraceus*. D'autres études préliminaires ont plutôt soupçonné certains membres des *Aspergillus* de la section Nigri tel qu'*A. carbonarius* isolés de raisin secs.

Jusqu'à 2001, date du démarrage du projet "Wine-Ochra-Risk", et à l'opposé de la filière céréale où plusieurs jalons ont été déjà posés dans la compréhension de l'origine de la contamination à l'OTA, la réflexion menée dans la filière raisin demeurait encore hésitante et surtout hypothétique et le projet de législation au sein de la filière était en perspective mais pas encore réalisable vu le manque de données. Jusqu'à nos jours, les stratégies curatives proposées à la filière, demeurent limitées, et seuls le charbon actif et quelques traitements de collages non adaptés au vin rouge ont pu éliminer l'OTA.

Sur la base de ces hypothèses, notre étude a été lancée et des choix stratégiques des régions étudiées en France ont été faits pour mieux cibler les objectifs. Les objectifs principaux de cette thèse sont donc de déterminer la contamination à l'OTA dans les vignobles français en précisant les facteurs dont elle dépend pour pouvoir mieux prévenir sa production sur la vigne, et de mettre au point de nouvelles méthodes biocuratives adaptées à la filière pour une meilleure gestion du risque post-récolte.

CHAPITRE II.

CHAMPIGNONS OCHRATOXINOGENES DU RAISIN ET PROBLEME DE L'OCHRATOXINE A DANS DES VIGNOBLES FRANÇAIS

Introduction

La culture de la vigne s'est au cours des millénaires propagée dans le monde entier. Connue en Phénicie et en Egypte d'il y a 3000 à 4000 ans avant J.C., elle s'est ensuite répandue en Grèce (2000 ans avant J.C.), En Italie, en Sicile et en Afrique du Nord (1000 ans avant J.C.).

Son arrivée en France s'est tout d'abord vu dans le sud, le long de la Narbonnaise et date de 500 ans avant J.C. Les moines du moyen-âge ont contribué à l'évolution de la maîtrise de cette culture et la noblesse a définitivement fixé l'entretien des vignobles comme une culture traditionnelle.

Aujourd'hui la France, pays de grande tradition vitivinicole, possède le 1/9 du vignoble mondial et le quart du vignoble de l'union Européenne. Elle se situe au 2^{ème} rang mondial (après l'Espagne et à égalité avec l'Italie) et son secteur viticole rapporte 17 % des 45 milliards d'euros de livraison agricole. Les français sont en plus considéré avec les italiens comme les plus gros consommateurs de vin dans le monde (environ 60 Litres/an).

De tout temps, cette culture avait connu l'attaque de plusieurs agents environnementaux. Aléas climatiques (gelées, grêle...) ou vecteurs de maladies (oiseaux, insectes, arachnides, gastéropodes, bactéries, ...), ont pu causer des ravages sur la vignes et les baies de raisin.

Les champignons étaient parmi ces agents ravageurs. Certains ont un caractère pathogène et leur présence sur la vigne se manifeste de façon visibles par différentes altérations. D'autres ont la capacité d'altérer de façon invisible la vigne (Battilani *et al.*, 2003) en produisant des métabolites toxiques telle que l'ochratoxine A.

Dés 1996, l'OTA a été détectée dans plusieurs échantillons de vin à travers le monde (Zimmerli et Dick, 1996) et les études se sont dès lors enchaînées pour mieux localiser le problème et déterminer les niveaux de contamination. Moûts, vins, jus de raisin et raisin secs avaient subit le dosage de cette molécule qu'on trouvait présente à des quantités plus ou moins importantes selon leur origine.

Ayant des propriétés cancérogène, tératogène, immunosuppressive et probablement neuro- et génotoxiques, l'OTA a été également reliée à plusieurs maladies humaines. Sa présence dans le sang de plusieurs individus sains ou malades à travers le monde montre la grande exposition des humains à cette molécule. La présence de l'OTA dans cette filière constitue un sérieux problème à la fois économique et sanitaire surtout en Europe et en France.

En 2001, un projet européen a démarré visant une meilleure compréhension de l'origine de ce problème en déterminant les points critiques de maîtrise au sein des vignobles pour mieux gérer le problème.

Notre étude a été lancée dans ce cadre et concerne la France, partenaire de ce projet européen. Tout au long de cette partie, les résultats concernant les vignobles français seront présentés, commentés et discutés pour une meilleure compréhension du problème de l'OTA.

Plan de travail

Au cours de ce travail, 10 vignobles ont été choisis et sont localisés dans 4 régions vitivinicoles françaises: en Poitou Charente, en Languedoc-Roussillons, en Provence-Alpes-Côte-d'Azur et en Alsace. Huit cépages ont été retenus, l'Ugni Blanc, le Riesling et le Muscat d'Alexandrie qui sont des cépages blancs, le Cinsault, le Syrah, le Cabernet-Sauvignon, le Carignan, et le Grenache qui sont des cépages rouges.

Les échantillons de raisin ont été collectés sur 3 campagnes successives dans les 10 vignobles et à trois stades de maturité du raisin (un mois après la nouaison, à la véraison et à la vendange).

Tout au long de notre étude, 6 stations météorologiques situées le plus près possibles des vignobles étudiés nous ont fourni les relevés journaliers de température, d'humidité relative et de pluviométrie entre le mois d'avril et le mois de septembre.

La localisation géographique de chacun des vignobles sélectionné ainsi que les stations météorologiques correspondantes sont représentés dans le tableau suivant (tableau II.1).

Tableau II.1: Emplacement des vignobles sélectionnés et des stations météorologiques correspondantes

Cépage	Vignoble	Région	Département	Ville	Station météo
Ugni blanc (UB)	1	Poitou-Charentes	Charente-Maritime	Rouillac	Rouillac
Muscat d'Alexandrie (Mu)	2	Languedoc-Roussillon	Pyrénées-orientales	Rievesaltes	Perpignan
Cabernet-Sauvignon (SA)	3		Pyrénées-orientales	Rievesaltes	Perpignan
Syrah (A)	4		Aude	Narbonne	Narbonne
Syrah (B)	5		Aude	Narbonne	Narbonne
Syrah (C)	6		Aude	Narbonne	Narbonne

Carignan (CA)	7		Aude	Coursan	Narbonne
Grenache noir (G)	8		<i>Gard</i>	Tavel	Avignon
Cinsault (CN)	9	Provence- Alpes-Côtes d'Azur	Var	Pierrefeu	Cuers
Riesling (R)	10	Alsace	Haut Rhin	Turckheim	Turckheim

A partir des 10 grappes collectées sur chaque vignoble, les champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été isolés, dénombrés, identifiés et conservés. Leur potentiel ochratoxinogène a été également testé *in vitro* sur milieu Czapek Yeast extract Agar (CYA) et les teneurs en OTA dans les grappes cueillies à été déterminée.

Résultats et Discussion

La description des populations fongiques totales et ochratoxinogènes parmi les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, isolés des différents cépages de raisin collectés dans différentes régions vitivinicoles françaises, selon les trois stades de maturité et sur 3 campagnes viticoles successives sera présentée dans ce qui suit.

1. Description de la population fongique totale

Pendant les trois campagnes successives de collecte, un total de 2467 isolats a été récupéré sur les raisins des 10 vignobles français. Cette population se répartie comme suit: 721 isolats récupérés en 2001, 711 isolats en 2002 et 1035 isolats en 2003.

Indépendamment des années:

- Le genre *Penicillium* est toujours minoritaire (environ 20%) comparé au genre *Aspergillus* (80%). Seuls quelques isolats du genre *Penicillium* ont pu être identifiées: *P. expansum*, *P. spinulosum*, *P. glabrum*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. oxalicum*, *P. citrinum*, *P. glandicola* et *P. adametzoïdes*

- Parmi les isolats d'*Aspergillus*, 99% appartiennent à la section Nigri constituée par *A. carbonarius*, *A. niger aggrégats* et *A. japonicus*. Le 1 % restant se compose d'isolats identifiés à *A. flavus*, *A. prasiticus* et *A. fumigatus*.

Alors que *A. japonicus* est toujours minoritaire par rapport aux 2 autres espèces au sein de la section Nigri, *A. carbonarius* dépasse légèrement en nombre les *A. niger aggrégats* en 2001. Ces derniers sont les plus nombreux en 2002 et en 2003 (figure II.1).

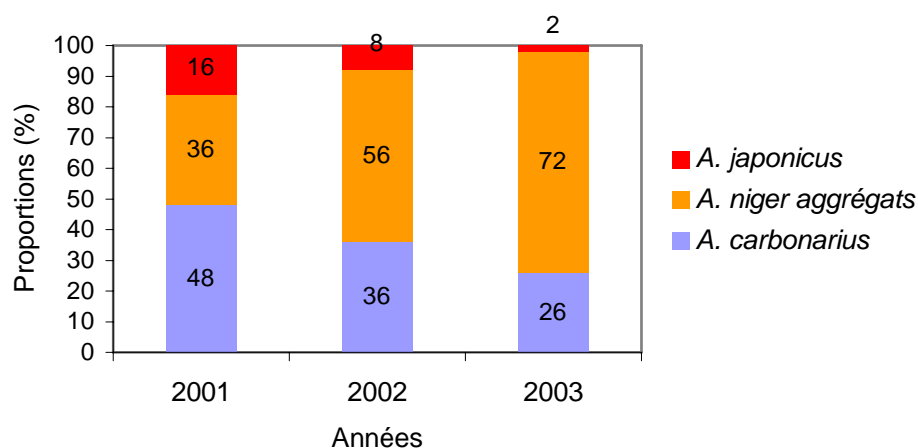


Figure II.1: répartition des espèces du genre *Aspergillus* au sein de la section Nigri sur les 3 années de collecte.

2. Description de la population fongique ochratoxinogène

Aucun *Penicillium* isolé au cours de cette étude ne présente un pouvoir ochratoxinogène détectable.

Sur 1974 isolats d'*Aspergillus* de la section Nigri, 745 sont ochratoxinogènes. La taille (nombre d'isolats collectés à la surface des baies), l'incidence (la proportion de la population ochratoxinogène au sein de la population totale d'une espèce donnée) et le potentiel ochratoxinogène au sein des espèces d'*Aspergillus* noirs sont 3 facteurs déterminants pour juger de leur importance en tant que producteur d'OTA au sein d'une population ochratoxinogène (tableau II.2).

Tableau II.2: Incidence et potentiel ochratoxinogènes au sein des *Aspergillus* de la section Nigri

Espèces	Nombres d'isolats	Incidence ochratoxinogène	Potentiel ochratoxinogène (µg/kg de CYA) (ppb)
<i>A. carbonarius</i>	691	Entre 72 et 100%	[100-7000]
Groupe d' <i>A. niger</i>	1102	<20%	[10-60]
<i>A. japonicus</i>	148	20%	[1-10]

3. Evolution des populations fongiques totales et ochratoxinogènes

3.1. Selon les stades de maturité

Quelle que soit l'année, aucun champignon ochratoxinogène n'est récupéré à la nouaison. A la véraison, peu de champignons ochratoxinogènes sont isolés et c'est en majorité l'espèce *A. carbonarius*. La plus importante contamination fongique est remarquée à la vendange, stade auquel 66 % des champignons totaux et 90 % des ochratoxinogènes sont isolés. A ce stade, 96 % des isolats ochratoxinogènes sont des *Aspergillus* de la section Nigri, parmi lesquels *A. carbonarius* était présent à 98 % en 2001 et 2002 et seulement à 48 % en 2003. Durant cette année (2003), 50 % de la population ochratoxinogène est représenté par *A. niger* agrégats.

3.2. Selon les régions

3.2.1. Régions du Poitou-Charentes et de l'Alsace

Présentation des régions

La région du Poitou-Charentes est située au Centre-Ouest de la France. Le vignoble issu de cette région se trouve au niveau du département de la Charente dans la ville de Rouillac (figure II.2). La région de l'Alsace est située au Nord-est de la France. Le vignoble étudié se trouve au département du Haut-Rhin au niveau de la ville de Turckheim (figure 4).

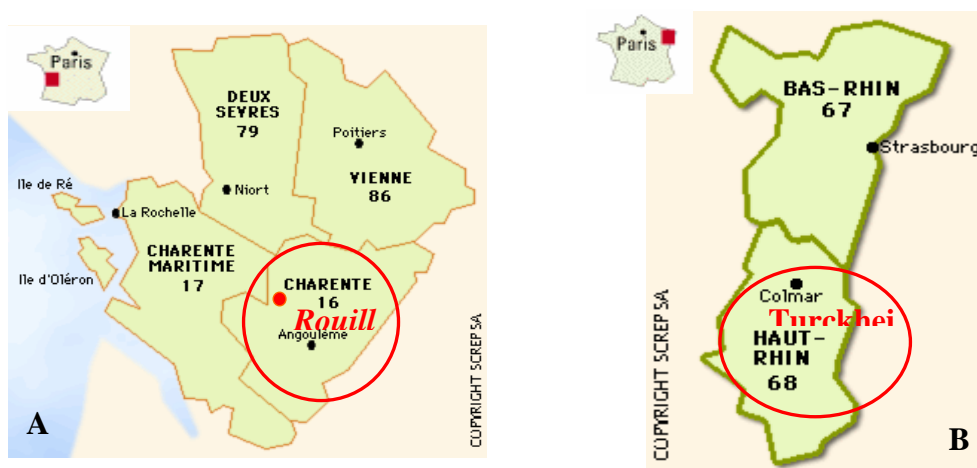


Figure II.2: Localisation des vignobles étudiés dans les régions du Poitou-Charentes (A) et de l'Alsace (B)

Des données climatiques de pluviométrie, de température et d'humidité relative ont été collectées dans les stations de Rouillac (Charente) et de Turckheim (Alsace), tout au long de cette étude. Les données représentées dans les figures suivantes (figure II.3 A et II.3 B) constituent des données moyennes caractérisant les deux régions sur les 3 années d'étude.

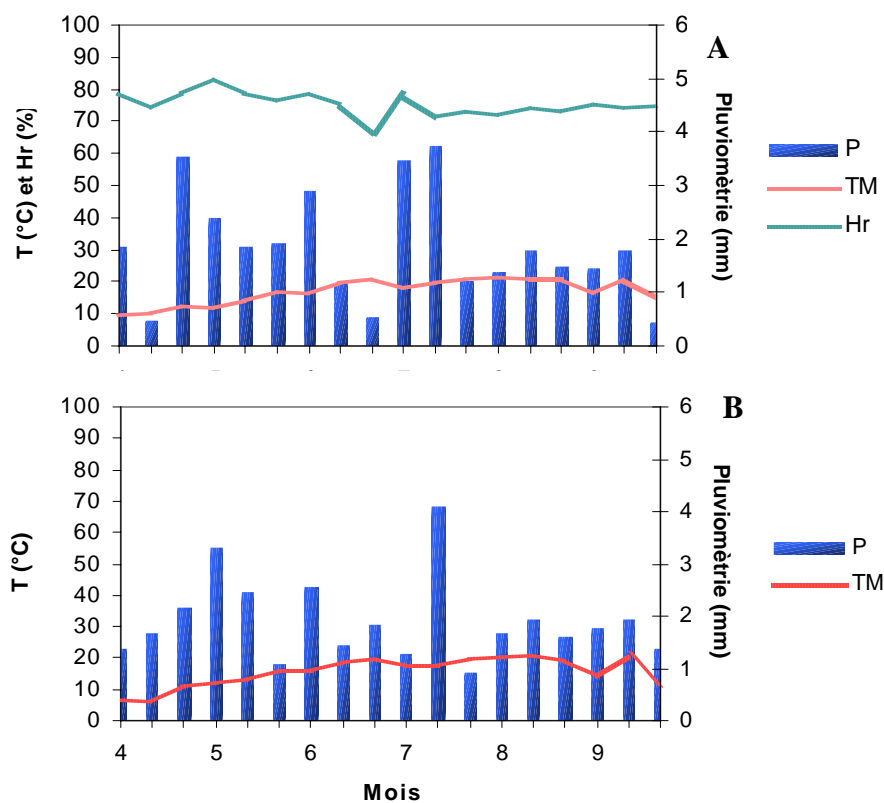


Figure II.3: Température, humidité relative et pluviométrie dans les régions du Poitou-Charentes (ville de Rouillac) (A) et de l'Alsace (Turckheim) (B).
(P: pluviométrie; TM: température moyenne; Hr: humidité relative)

Le Poitou-Charentes bénéficie d'un climat océanique grâce à son ouverture sur la façade atlantique. Ces hivers sont relativement doux et ses étés sont tempérés. La région de l'Alsace est caractérisée par un climat continental.

Description des populations fongiques et des teneurs en OTA

Que ce soit dans le vignoble en l'Alsace ou celui en Poitou-Charentes, la population fongique totale est réduite (entre 2 et 12 isolats en PC et de 4 à 56 en Alsace pour les 3 années). Seulement 3 isolats ont un pouvoir ochratoxinogène. L'OTA n'est pas détectée dans les grappes de raisin issues de ces régions.

3.2.2. Bassin méditerranéen

Situé au Sud de la France, le bassin méditerranéen est considéré comme étant le berceau de la culture de la vigne et le plus ancien vignoble de France. Cette plante y fournit des produits remarquables qu'on ne trouve pas dans les autres pays viticoles: vins généreux naturellement alcooliques, vins de table ayant des titres alcoolimétriques volumiques élevés et une faible acidité, raisins de table très variés avec la possibilité de produire des raisins secs notamment en Méditerranée orientale.

Deux régions sont situées dans le bassin méditerranéen: le Languedoc-Roussillon (LR) (Sud) et La Provence-Alpes-Côte-d'Azur (PACA) (Sud-Est).

3.2.2.1. La région de Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA)

Présentation de la région

Cette région est située dans le Sud-Est de la France. Le vignoble étudié se trouve le département du Var, dans la ville de Pierrefeu (figure II.4).



Figure II.4: Localisation du vignoble en PACA (département du Var, ville de Pierrefeu)

Le Var est un département côtier, situé en Provence. Le climat de cette région est très doux avec une insolation très forte. Les mois les plus secs sont juin et juillet. Les hauteurs mensuelles de précipitations sont régulièrement croissantes d' Août à octobre. (figure II.5).

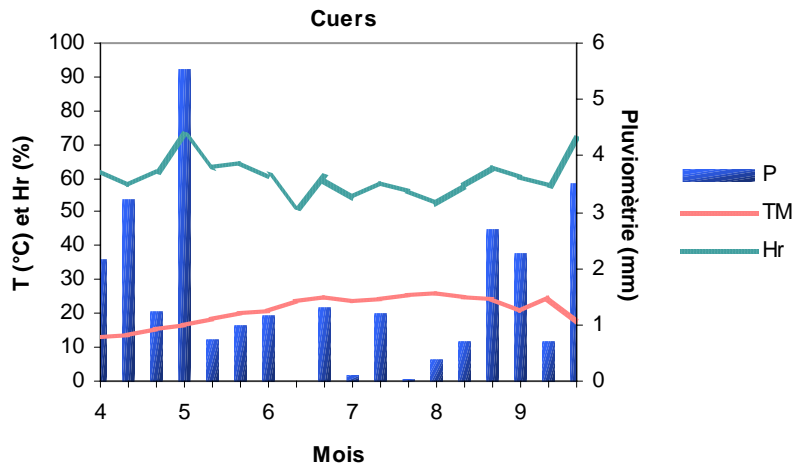


Figure II.5: Données climatologiques collectées au niveau de la station Cuers (prés de la ville de Pierrefeu) (P: pluviométrie; TM: température moyenne; Hr: humidité relative)

Description des populations fongiques et des teneurs en OTA

Pour la variété CN du département PACA, aucun champignon ochratoxinogène n'a été isolé en 2001, seulement 3 *A. carbonarius* en 2002 et 13 *A. niger agrégats* en 2003. Le contenu en OTA de cette variété était de 0.18 ppb en 2002 et de 0.11 ppb en 2003.

3.2.2.2. Région du Languedoc-Roussillon

Présentation de la région

4 départements sont recensés au sein de cette région: Pyrénées orientales, Aude, Hérault et Gard. Ces départements ont été souvent désignés dans la littérature comme les «4 gros producteurs» récoltant certaines années près de la moitié de la récolte française. De nos jours leur importance se maintient autour de 30 %. Le vignoble de cette région compte 28.6 % de ses surfaces en AOC, ce qui en fait la deuxième région productrice française après le Bordelais.

Au cours de notre étude on s'est intéressée à 3 de ces départements, les Pyrénées orientales (échantillons récupérées dans la ville de Rivesaltes), l'Aude (villes de Narbonne et Coursan) et le Gard (ville de Tavel) (figure II.6).



Figure II.6: Localisation des vignobles étudiés au sein de la région Languedoc-Roussillon

Une moyenne (sur les 3 années) des données climatiques au Languedoc-Roussillon est présentée dans la figure II.7 et permet de caractériser la région en terme de pluviométrie, de température et d'humidité relative.

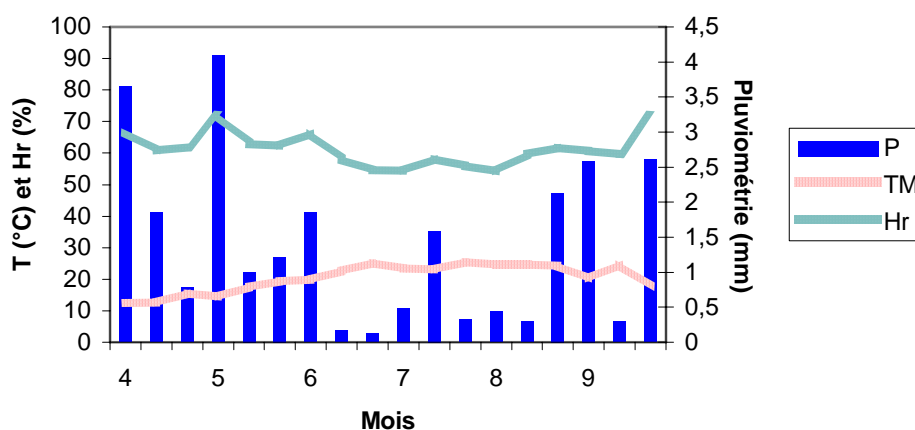


Figure II.7: Données climatologiques pour la région du Languedoc-Roussillon (P: pluviométrie; TM: température moyenne; Hr: humidité relative)

Description des populations fongiques et des teneurs en OTA

Les cépages de cette région présentaient la plus forte contamination fongique comparées aux autres régions.

La population ochratoxinogène au niveaux de ces cépages sont à majorité d'*A. carbonarius*, présent à environ 98 % en 2001 et 2002 et à 52 % en 2003. Au cours de cette année 48% de la population ochratoxinogène était constitué par *A. niger* agrégats. Les concentrations les plus

importantes en OTA étaient détectées dans les variétés CA en 2001 (0,38 ppb), S en 2002 (2,78 ppb) et SA en 2003 (0,46 ppb). Ces teneurs étaient les plus fortes comparées à celles des autres cépages des autres régions.

3.2.3. Comparaison entre les différentes régions

Quelque soit l'année, les régions de l'Alsace et de la Charente n'étaient pas du tout contaminées à l'OTA, alors que les raisins de la région méditerranéenne présentent le maximum de colonisation fongique et de mycotoxines.

Si on compare les données météorologiques moyennes sur les 3 années représentant le macro-climat au sein de chaque région étudiée (tableau II.3), nous pouvons remarquer que la somme des pluies augmente en allant de la Méditerranée à l'Alsace en passant par la Charente, alors que la température baisse.

Tableau II.3: Paramètres climatiques moyens caractérisant la Méditerranée, la Charente et l'Alsace (données récupérées dans des stations au cours des 3 années d'étude)

	Bassin Méditerranéen	Charente	Alsace
Somme des pluies (somme moyenne sur les 3 années) (mm)	26,7	33	34
Température moyenne (°C)	22,5	17	15,5
Humidité relative (%)	59,5	75	40

Le climat méditerranéen, comparé au continental (Alsace) et à l'atlantique (Charente), avait probablement favorisé le plus de contamination à l'OTA des raisins.

En effet, le climat méridional ou méditerranéen est caractérisé par des températures élevées, avec un ensoleillement important, voire excessif, facteur de chaleur et de sécheresse estivale. Le cycle végétatif de la vigne est plus long dans ce climat et les raisins sont plus concentrés en Sucres. Le climat océanique, est caractérisé par des températures douce plus faibles que le méditerranéen, avec un ensoleillement moyen et des précipitations annuelles très bien réparties pendant le cycle végétatif. Pour le climat septentrional ou continental, les températures moyennes sont relativement fraîches, avec un ensoleillement moyen, des précipitations bien réparties, assez fortes notamment sous forme d'orage d'été. Dans ce climat

le cycle végétatif de la vigne est plus court. Les densités de plantation sont plus importantes dans cette région permettant une meilleure répartition d'absorption de l'eau du sol et une diminution de l'humidité environnant la vigne. Sous ce type climatique tempéré, les raisins sont peu riches en sucres et relativement acides.

L'humidité faible au niveau de l'Alsace (conséquence direct du climat continental, mais aussi du relief et du mode de culture) associée aux faibles températures pourraient limiter le développement des champignons et la production d'OTA. Malgré l'humidité du climat océanique, le développement fongique faible et l'absence d'OTA au niveau de la Charente pourraient être due aux faibles températures de cette région et probablement à d'autres facteurs méso-climatiques propre à la région.

Ainsi le macro-climat avait un impact significatif sur la charge fongique et sur la contamination à l'OTA des raisins. En plus des facteurs température, humidité et pluviométrie, la composition en sucre et l'acidité du substrat raisin conséquence directe du climat pourrait être un facteur déterminant au niveau de la mycotoxinogénèse.

3.3. Selon les variétés au niveau du Bassin Méditerranéen

Au sein du Bassin Méditerranéen, le LR en comparaison avec PACA, présente la plus forte contamination fongique et les teneurs les plus élevées en OTA sont observées parmi ces cépages.

A PACA, la contamination demeure basse mais pourrait selon les années être similaire ou parfois un peu plus importante que certains cépages faiblement contaminés du LR.

Au sein du LR, des différences ont été également observées pour les cépages dans différents départements de la région mais aussi au niveau d'un même département.

La taille de la population fongique ochratoxinogène et les teneurs en OTA des raisins, sur un même cépage pendant les 3 années d'étude ou sur les différents cépages pour une même année, n'étaient pas toujours liées. Ainsi pour une large population ochratoxinogène ne correspond pas toujours les teneurs les plus élevées en OTA (Figure II.8 et II.9).

La population fongique isolée du raisin et dont le pouvoir ochratoxinogène a été testé *in vitro*, ne manifeste pas systématiquement ce pouvoir au niveau du vignoble, ce qui pourrait expliquer l'absence de relation entre l'importance de la colonisation des baies par les champignons potentiellement ochratoxinogène et les teneurs en OTA des raisins.

Les facteurs climatiques sont également très variables, et celles récupérées 2 semaines avant les vendanges n'ont pas pu expliquer clairement les différentes contaminations des raisins d'une année à l'autre et pour une même année au sein d'un même département.

Au sein d'une même région, la variabilité des facteurs liés au méso- et au micro-climat et au type de cépage pourrait intervenir pour déterminer la contamination fongique et à l'OTA des raisins.

Ces facteurs sont très variables, très diversifiés et pourraient également interagir pour favoriser ou non l'expression du potentiel ochratoxinogène des champignons présents.

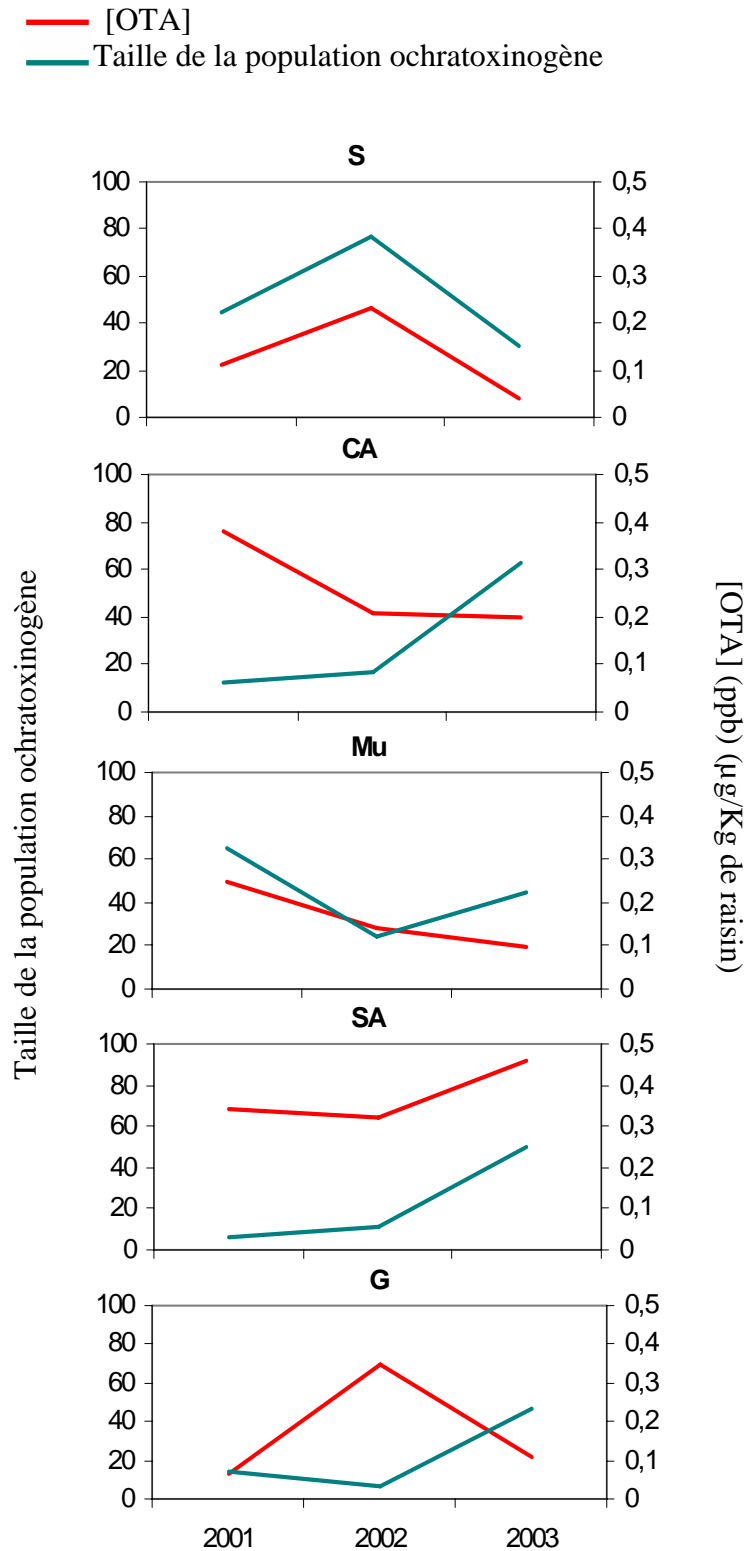


Figure II.8: Evolution de la populaion fongique ochratoxinogène et de l'OTA pendant les 3 années (2001, 2002, 2003) pour différents cépages

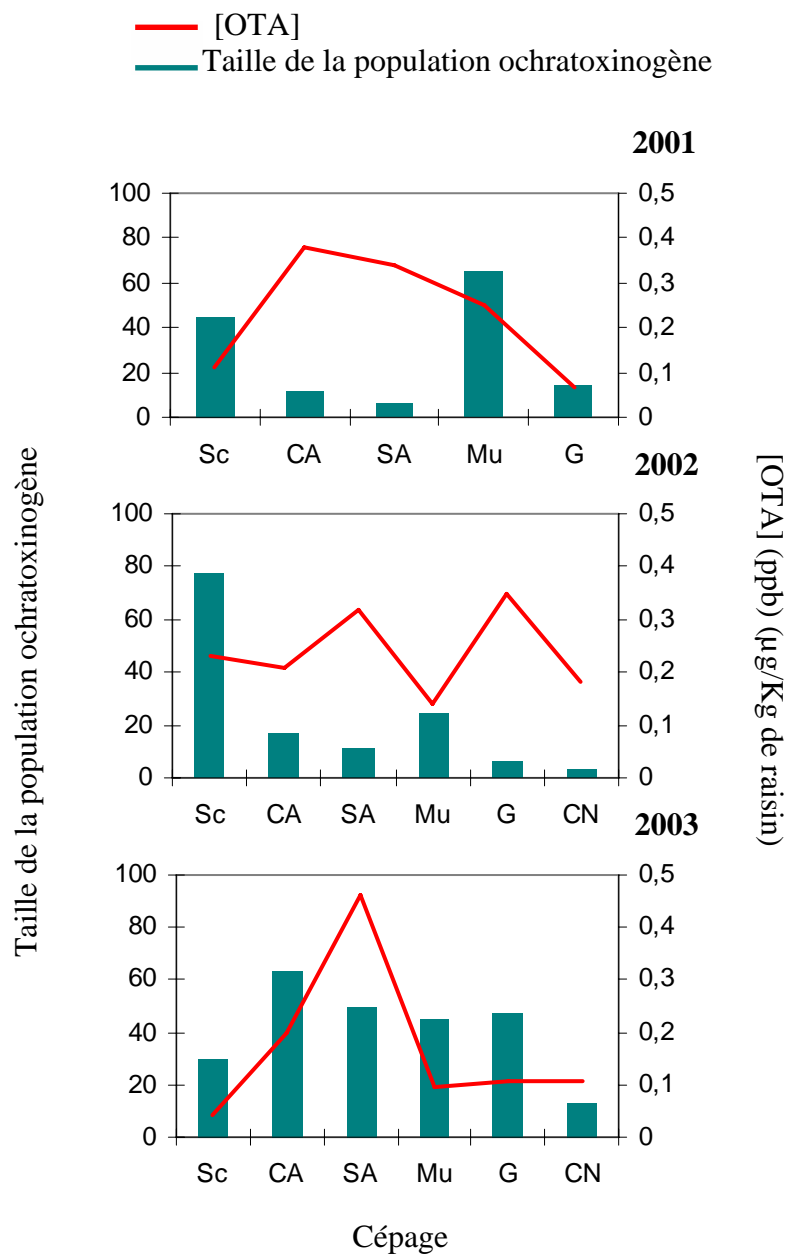


Figure II.9: Evolution de la population fongique ochratoxinogène et de l'OTA pour les différents cépages du bassin Méditerranéen et pour chaque année

Conclusion

A l'issue de cette étude, la nature de l'agent causal impliqué dans la contamination à l'OTA des vignobles français a été déterminée. Il s'agit principalement de l'espèce *Aspergillus carbonarius* suivi d'*A. niger* aggrégats. L'occurrence de l'agent causal sur les baies, l'expression de son potentiel à produire l'OTA, son incidence et son potentiel ochratoxinogène sont des éléments déterminants dans l'importance de la contamination à l'OTA des raisins. Ces propriétés de l'agent causal sont à la fois déterminées par des facteurs intrinsèques liés à l'espèce fongique et à des facteurs extrinsèques liés à l'environnement.

Parmi ces facteurs extrinsèques, les conditions physico-chimiques (température, humidité relative, disponibilité en eau, substrat) sont d'une importance capitale. Ces facteurs sont étroitement liés au climat en relation avec la situation géographique et les saisons au sein d'une même région ainsi qu'aux propriétés du substrat servant au développement du champignon et ont contribué à déterminer les moments critiques dans la contamination à l'OTA dans les vignobles.

Ainsi, le climat méditerranéen en comparaison avec les climats continental (Alsace) et atlantique (Poitou-Charente) est le plus favorable à l'occurrence des champignons ochratoxinogènes et à la production de l'OTA dans les raisins.

La saison des vendanges et la composition physico-chimique des baies pendant cette période ont pu favoriser une flore ochratoxinogène et une contamination importante des raisins à l'OTA.

Toutefois, d'autres facteurs peuvent également intervenir, interagir et générer certaines différences au sein d'une même région. Les différences observées au sein du bassin méditerranéen entre La Provence-Alpes-Côtes d'Azur et le Languedoc-Roussillon, ainsi qu'entre les différents départements de cette dernière région peuvent illustrer la variabilité des facteurs mis en œuvre dans un modèle complexe tel qu'un vignoble.

Le relief, les vents, le sol, les modes de conduite de la vigne et certains événements naturels destructeurs des végétations, tels que la grêle et les écarts brusques de températures pourraient également affecter la croissance fongique et la production de l'OTA.

Certains facteurs biologiques, liés à la niche écologique des raisins, déterminant l'interaction entre microorganismes et la présence de prédateurs pourraient également intervenir.

L'utilisation de certains agents chimiques fongicides dans le cadre de lutttes phytosanitaires ou de certains alcools pour améliorer la maturation des baies pourrait affecter la croissance de la flore fongique à potentiel ochratoxinogène et probablement l'expression de ce pouvoir.

Comment ces facteurs chimiques ou facteurs de stress d'origine anthropogéniques agissent-ils sur le comportement des champignons ochratoxinogènes? Cette question sera abordée dans le chapitre suivant.

Article 1:

Fungal flora and ochratoxin A production during wine grape maturation in French vineyards during three years.

International Journal of Food Microbiology. En Presse.

Hend BEJAOU¹, Florence MATHIEU¹, Patricia TAILLANDIER², and Ahmed LEBRIHI^{1*}

Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS)

Equipe : Génie des Systèmes Microbiens.

¹ENSAT/INPT: 1, Av. de l'Agrobiopôle BP107, Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France

²ENSIACET/INPT: 5, rue Paulin Talabot, BP 1301, 31106 Toulouse Cedex 1, France

* Corresponding author. Tel.: +212 (0) 5 62 193 944; fax: +212 (0) 5 62 193 901.

E-mail address: lebrihi@ensat.fr

Abstract

A survey was conducted in France over three years (2001-2003) in 10 vineyards from four winemaking regions with different geographical locations and climatic conditions. *Aspergillus* and *Penicillium* were isolated from the grapes. During 2001 and 2002, from setting to harvest, the total numbers of fungal isolates were respectively 721 and 711 increasing in 2003 to reach 1035. The *Aspergillus* genus was essentially represented by *Nigri* section (99%) and was predominant (80% \pm 4.6) when compared to *Penicillium* (20% \pm 4.6). Regardless of sampling year,

32.5% ($\pm\sigma = 1.26$) of the fungal isolates were OTA producers and 93% ($\pm\sigma = 2.65$) belonging to black aspergilli. The ochratoxigenic potential of the isolates and their occurrence on grapes revealed that *A. carbonarius* was the main OTA producer on

French grapes. At harvest time, the fungal population was maximal and this was the most critical period influencing OTA contamination. Grapes from Languedoc-Roussillon region were most infested with ochratoxigenic fungi and had the highest concentrations of OTA. All these results could be of prime importance for further preventive action against ochratoxigenic species in vineyards to limit the contamination of grapes and grape products in France.

Keywords: Ochratoxin A; grapes; Black aspergilli; *A. carbonarius*; *A. niger* aggregate.

1. Introduction

In the last few years, OTA has received increasing interest from both scientific communities and food committees because of its nephrotoxic (Krogh et al., 1974; Mortensen et al., 1983) teratogenic (Arora et al., 1981; Mayura et al., 1989), genotoxic (Dirheimer, 1998), immunosuppressive (Haubeck et al., 1981; Creppy et al., 1983) and carcinogenic (Boorman, 1989) properties. Its ingestion by humans, which occurs mainly through different plant-based foods and beverages, could lead to deterioration of liver or kidney function (Sweeney and Dobson, 1998).

Grapes and derived products such as dried vine fruit (McDonald et al., 1999), grape juices and wines (Scott and Kanhere, 1995; Zimmerli and Dick, 1996; Jorgensen, 1998; Burdaspal and Legarda, 1999; Visconti et al., 1999; Otteneder and Majereus, 2000) have been reported as potentially contaminated with OTA. Provisional estimates of the Codex Alimentarius Commission, based on limited European data, suggested that red wine is the second major source of human exposure to OTA, following cereals and preceding coffee and beer (Walker, 1999). Swiss authors were the first to detect OTA in table wines collected from various

European countries (Zimmerli and Dick, 1996) and red wines had higher concentrations than white ones (Ottender and Majerus, 2000). Two genera raised particular attention as the source of OTA, *Penicillium* and *Aspergillus* (Varga et al., 2001). Among the *Aspergillus*, the section *Nigri* was responsible for OTA production (Cabañes et al., 2002; Sage et al., 2002; Pechavy et al., 2003) and the species *A. niger* aggregate and *A. carbonarius* were considered to be particularly important (Abarca et al., 2001; Cabañes et al., 2002). According to different surveys grape products from the Mediterranean regions of south Europe (Burdaspal and Legarda, 1999; Battilani et al., 2003; Belli et al., 2004) and north Africa (Filali et al., 2001) were the most contaminated by OTA. In France, two preliminary studies revealed the presence of OTA in samples of grapes, musts and wines recovered from the South (Ospital et al., 1998; Sage et al., 2002).

This study was intended to assess the potential for ochratoxin A contamination of French grapes. It was done on a large sampling pattern of grapes recovered from different French vineyards in four winemaking regions with a variability of climatic conditions during three years. Screening the presence of OTA-producing species in *Penicillium* and *Aspergillus* section *Nigri*, following the dynamic of these fungi during growing season and determining OTA contents in grapes were the principle objectives of this survey.

2. Materials and Methods

2.1. French Study area

The French mainland has almost a regular hexagonal form with 551,602 Km² area. From North to South, it extends between the parallels 51°5'27'' and 42°20' (Latitude North) and from West to East between the meridians 5°56' (Longitude West) and 7°9' (Longitude East). This large sweep shelters a big variety of climatic zones.

Ten vineyards located in 4 French winemaking regions with different climatic conditions were chosen in this study (see figure 1): Poitou-Charentes (PC) (vineyard 1), Languedoc-Roussillon (LR) (vineyards 2 to 8), Provence-Alpes Côtés d'Azur (PACA) (vineyard 9), and Alsace (Als) (vineyard 10). Eight varieties were analysed: Ugni Blanc (UB) from PC, Riesling (R) from Als, Cinsault (CN) from PACA and from LR, 5 varieties were considered: Sauvignon (SA), Muscat (Mu), Syrah (S), Carignan (CA) and Grenache (G). For the Syrah variety, three areas were considered (a, b and c). All the varieties analysed except Ugni Blanc, Riesling and Muscat were red vines.

2.2. Samples collection

Samples were taken during three growth stages: green berry, early veraison and ripe berry (harvest time). For each vineyard and each stage, 10 bunches were collected by following the two diagonals. After their rapid transport to the laboratory in cool boxes, mycological analyses were immediately done. The remaining samples were frozen at -20°C for subsequent analysis.

2.3. Mycological analysis of grapes

Five randomly choosed berries from each bunch were put onto the surface of the DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol) agar (Oxoid) (Cahgnier, 1998) and plates incubated at 25°C for 7 days. Samples were examined daily with a stereomicroscope and all *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated on CZ (CZAPEK) (Cahgnier, 1998) medium and purified on CYA (CZAPEK Yeast extract Agar). All fungi isolated were identified by morphological characters according to the most accepted criteria of classification (Raper and Fennell, 1965; Klich and Pitt, 1988; Pitt and Hocking, 1997).

2.4. Ochratoxigenic ability of the isolates

OTA production ability of 2467 isolates was tested on CYA using the method of Bragulat et al. (1998). OTA was analysed by HPLC and ochratoxigenic potential was expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ CYA. 86 isolates were deposited into ITEM and IMI collections.

2.5. Ochratoxin A analysis in grapes

Each year, at harvest time, the 10 samples recovered from each vineyard were weighed and crushed for 2 minutes at room temperature. The juice was recovered after centrifugation and its exact volume was measured. 10 ml were adjusted to pH 7.8 with KOH 2 M and diluted to make a final volume of 20 ml with PBS buffer (r-Biopharm, St Didier Au Mont D'Or, France). The diluted sample was loaded onto an OchraPrep (r-Biopharm, St Didier Au Mont D'Or, France) immunoaffinity column operating at a steady flow rate of 2 ml min⁻¹. The immunoaffinity column was washed with 20 ml of sterile distilled water, and then dried with an air strain. OTA was eluted by applying successively 1.5 ml of methanol/acetic acid (98:2) and 1.5 ml of sterile distilled water. The eluted extract was further analysed by HPLC and OTA concentrations expressed in $\mu\text{g Kg}^{-1}$ grapes.

2.6. High performance liquid chromatography (HPLC)

OTA was detected and quantified by reversed-phase HPLC. The analysis was performed

using a BIO-TEK HPLC System (Milan, Italy) equipped with a Solvent delivery system 525, column thermostat 582, autosampler 465, diode array detector 545V, acquisition data Kroma System KS3000 and Spectra System FL3000 fluorescence detector ($\lambda_{\text{ex}}=332$ nm; $\lambda_{\text{em}}=466$ nm). The analytical column was a 150 x 4.6 mm, 5 μm , C18 reversed-phase ODB Uptisphere fitted with a guard column (10x4 mm) having the same stationary phase. During analysis, the column was maintained at 30°C, and OTA was eluted with a mobile phase consisting of a mixture of HPLC grade acetic acid in water 0.2 % (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 1 ml min⁻¹. Analysis of OTA in grape juices was done over 45 min with a linear gradient from 10 % to 50 % of B over the first 30 min followed by a linear gradient to 90 % of B from 30 to 35 min, then a steady flow of 90 % of B for 8 min finally reduced to 10 % for 2 min. Analysis of OTA produced by grape isolates was done using a run time of 20 min and an isocratic method [A (59%)-B (41%)]. Ochratoxin A was identified by its retention time according to a standard (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and quantified by measuring peak area according to a standard curve. The detection limit was 0.025 $\mu\text{g l}^{-1}$. All analysis were done in triplicate.

3. Results

3.1. Total fungi isolates

During three years, genera of penicillia and aspergilli on wine French grapes were systematically isolated, counted and identified. In 2001 and 2002, the total fungal isolates were respectively 721 and 711 increasing in 2003 to reach 1035. Penicillia represented only 20% (± 4.6) and the species included *P. expansum*, *P. spinulosum*, *P. glabrum*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. oxalicum*, *P. citrinum*, *P. glandicola* and *P. adametzoides*.

The *Aspergillus* genus was predominant (80% ± 4.6) and especially those belonging to the *Nigri* section (Black aspergilli) (99%). Among the remaining aspergilli (1%), isolates of *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. fumigatus* were sometimes found. Black aspergilli were represented by three populations: *A. carbonarius*, *A. japonicus* and *A. niger* aggregate. Except for *A. japonicus*, all these species were biseriata. *A. carbonarius* was microscopically recognised and distinguished by conidial size and ornamentation. All the other black biseriata aspergilli isolates will be referred as *A. niger* aggregate. Of the total black aspergilli isolated, *A. japonicus* was in the minority, representing 16, 8 and 2% respectively in 2001, 2002 and 2003. From 2001 to 2003, *A. niger* aggregate increased (36, 56 and 72%) whereas *A. carbonarius* decreased (48, 36 and 26%).

3.2. *Ochratoxigenic fungal isolates*

For all isolates, the capacity for producing ochratoxin A was determined on a solid laboratory medium (CYA) after 7 days at 25°C. Whatever the sampling year, 32.5 % (± 1.26) of the total fungal isolates were ochratoxigenic. The OTA producing capacity of the isolates deposited in the ITEM and IMI collections are represented in table 1.

Over the three years a total number of 1974 black aspergilli were isolated. 745 of them were found to produce OTA (i.e. 37% regardless of the year). Whatever the year, among 148 *A. japonicus* tested, OTA producers never exceeded 20% with OTA production of between 0.001 and 0.01 $\mu\text{g g}^{-1}$ CYA. For 691 isolates of *A. carbonarius*, OTA producers represented respectively 72% and 80% in 2003 and 2001 and reached 100% in 2002, with OTA production of between 0.1 and 7 $\mu\text{g g}^{-1}$ CYA. Among 1102 of *A. niger* aggregate, ochratoxigenic isolates never exceeded 20% and had OTA production of between 0.01 and 0.06 $\mu\text{g g}^{-1}$ CYA.

3.3. Fungi population evolution

3.3.1. During the growing season

Temporal changes in total and ochratoxigenic black aspergilli during the growing season are shown in Fig. 2. At the green berry stage, no OTA producer isolates were found regardless of year. In early veraison, a few OTA producer fungi were recovered and predominantly *A. carbonarius*. At harvest time, in all three sampling years, fungal contamination highly increased. About 66% (± 11) of the total isolates and 90% (± 3.1) of the ochratoxigenic ones were isolated. At this time, 96% (± 0.5) of these ochratoxigenic isolates were black aspergilli. *A. carbonarius* species were 98% (± 0.67) in 2001 and 2002 and 48% in 2003. Ochratoxigenic *A. niger* aggregates were only found in 2003 and reached 50% of the total ochratoxigenic black aspergilli isolates.

3.3.2. Regional variations and varieties

Eight grape varieties from four winemaking regions were analysed. The most fungal isolates were from the Languedoc-Roussillon region (ranged between 91 and 132), followed by CN from Provence-Alpes Côte d'Azur (between 17 and 56), R from Alsace (between 0 and 56) and finally UB from Poitou-Charentes (between 2 and 17) (Fig. 3).

No ochratoxigenic fungi were isolated on the UB variety and only three on Riesling one. On those two grapes varieties OTA was never detected.

On CN variety, no ochratoxigenic isolates were found in 2001, 3 *A. carbonarius* in 2002 and 13 *A. niger* aggregates in 2003. OTA content in this variety was about 0.18 ppb in 2002 and 0.11 ppb in 2003.

On Languedoc-Roussillon varieties, ochratoxigenic isolates were in majority represented by *A. carbonarius* (98% (± 2)) in 2001 and 2002 and by 52% *A. carbonarius* and 48% *A. niger* aggregate in 2003. The highest OTA concentrations in grapes from this region were observed in 2001 in CA (0.38 ppb), in 2002 in S (2.78 ppb) and in 2003 in SA (0.46 ppb).

4. Discussion

In our study, *Aspergillus* and *Penicillium* genera were isolated as they are potential OTA producers in various foodstuffs (Varga et al., 1996; Abarca et al., 1997; Sweeny and Dobson, 1998). In grapes, the predominance of *Aspergillus* compared to *Penicillium* was observed among total (80% versus 20%) and ochratoxigenic (93% versus 7%) isolates. It is known that *Penicillium* species appear more often in temperate and cold climates such as in northern Europe (Pitt and Hocking, 1997; Frisvad et al., 1999) whereas *Aspergillus* species are commonly associated with warmer and tropical regions (Pitt and Hocking, 1997; Pittet, 1998). Creppy et al. (1991) also outlined that ochratoxicosis in France was connected to aspergilli whereas in Germany or Scandinavia it could be linked to penicillia (Creppy et al., 1991). Although commonly reported in cereal and cereal products as principle OTA producers (Pitt, 1987; Frisvad, 1989; Frisvad and Filtenborg, 1990), *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus* have never been isolated on French grapes. This observation was already demonstrated for grapes from south of France (Sage et al., 2002) and from Argentina (Da Rocha Rosa et al., 2002). *P. verrucosum* has never been mentioned as part of the normal microbiota of grapes (Cabañes et al., 2002; Sage et al., 2002; Serra et al., 2003; Da Rocha Rosa et al., 2002), whereas, *A. ochraceus* was already isolated among *Aspergillus* genus, on Brazilian (6%) (Da Rocha Rosa et al., 2002), Spanish (2.5%) (Belli et al., 2004), Portuguese (<1%) (Serra et al., 2003) and Italian (<0.6%) (Battilani et al., 2003) berries.

In our study, among *Aspergillus* species, the black aspergilli were the most common (99%). This group was also predominant on Italian (97%) (Battilani et al., 2003), Spanish (97%) (Belli et al., 2004) and Portuguese (90%) (Serra et al., 2003) grapes. In 2003, the total fungal isolates highly increased (+44.5%) principally due to the increase in *A. niger* aggregate. Their highest growth rate and their tolerance to high temperatures (higher than 37°C) (Battilani et al., 2003), registered in weather stations in 2003, could explain their tendency to increase.

According to our study, the low number of *A. japonicus* species, the few ochratoxigenic isolates recovered and their low OTA-producing potential showed that *A. japonicus* was unimportant in OTA French grape contamination.

The number of *A. carbonarius* (230 ±26 per year), the high frequency of ochratoxigenic isolates (between 70 and 100%) and their potential to produce OTA show that this species is the most OTA producer on grapes in France. Previous studies showed its invasive character to colonise and penetrate berries even without skin damage (Battilani and Pietri, 2002). *A. carbonarius* also reported as the main OTA producer in Spanish (Abarca et al., 2001; Cabañes et al., 2001), Portuguese (Serra et al., 2003) and Italian grapes (Battilani et al., 2003). Its ochratoxigenic potential was not only occasioned by its intrinsic toxigenic character but also due to its aggressiveness (Battilani et al., 2002).

The consistent presence of *A. niger* aggregate on grapes during the growing season and their important number compared to *A. carbonarius* could explain their importance. However, the lower frequency of ochratoxigenic *A. niger* aggregate (20%) and their lower ability to produce OTA compared to *A. carbonarius*, make them of second importance in OTA contamination. According to the literature 4%, 16.6% and 30% of *A. niger* aggregate isolated respectively on Portuguese (Serra et al., 2003), Argentinean and Brazilian (Da Rocha Rosa et al., 2002) grapes were potential OTA producers.

During the growing season, the harvest time was considered as a critical period for fungal development. This was also reported on Portuguese grapes (Serra et al., 2003) and on Spanish berries (Belli et al., 2004). Acidity decrease, sugar accumulation and cuticle embrittlement in grapes may explain fungal abundance. At this time, about 90% of ochratoxigenic isolates were from ripe berries and 92% were *A. carbonarius*. This has also been observed in Portuguese vineyards (Serra et al., 2003).

According to regions, in the western (Poitou-Charentes) or Eastern (Alsace) vineyards, limited fungal population was found. Over the three years, *A. carbonarius* was absent. Ochratoxigenic fungi isolated in those regions were also not relevant and only 3 *A. niger* aggregate from Alsace have been confirmed as OTA producers. Moreover, very low concentrations of OTA were measured in grapes from Poitou-Charentes (oceanic climate) and Alsace (continental climate).

French Mediterranean southern vineyards (LR and PACA) had a large fungal flora, especially of black aspergilli. These fungi were reported to be resistant to high sun exposure and to very hot (frequently achieving temperatures of 40°C during summer time) and dry environments with low rainfall levels characterising this climate (Serra et al., 2003). The presence of OTA on grapes from this area and the important ochratoxigenic isolates confirmed the high contamination in the Mediterranean region. High levels of OTA in wines were previously reported in South Europe (Battaglia et al., 1996; Zimmerli and Dick, 1996) and especially in

Mediterranean areas (Zimmerli and Dick, 1996). However samples from PACA were less contaminated by ochratoxigenic fungi than those from LR and presented less OTA concentrations. This difference could not only be due to species involved on grapes but also to variety, soil and growing area.

In conclusion, *A. carbonarius* followed by *A. niger* aggregate play a major role in OTA contamination of French grapes. Harvest time is the critical time where almost all ochratoxigenic fungi were detected and the highest amounts of OTA were measured in grapes. Southern Mediterranean regions and especially Languedoc-Roussillon were the most contaminated with OTA.

Acknowledgement

This work was supported by grants from the European Union (QLK1-CT-2001-01761) and French “Ministère de la jeunesse de l'éducation et de la recherche” (AQS N°:02 PO571). The authors thank Patricia Nouvet for her technical assistance.

References

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellà, G., Accensi, F., Cabanes, F.J., 1997. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *Journal of Food Protection* 60, 1580-1582.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J., 2001. Ochratoxin A- producing black aspergilli in dried vine fruits. In: *Book of abstracts Bioactive fungal metabolites Impact and Exploitation*. Swansea, Wales, pp. 38.
- Arora, R.G., Fröelén, H., 1981. Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. II ochratoxin A induced teratogenic effects in relation to the dose and stage of ingestion. *Acta Agriculturae Scandinavica* 22, 535-552
- Battaglia, R., Hatzold, T., Kroes, R., 1996. Conclusion from the workshop on ochratoxin in food, organized by ILSI Europe in Aix-en-Provence, 10-12th January 1996. *Food Additives and Contaminants* 13, 1-3.
- Battilani, P., Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *Plant pathology* 108, 639-643.

- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z., 2003. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of food protection* 66, 633-636.
- Belli, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S., 2004. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 38, 72-77.
- Boorman, G., 1989. Ed. NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in: F344/N Rats (Gavage Studies) (NIH Publication No. 89-2813); National Toxicology Program, U.S. Department of health and human services: Research Triangle Park, NC.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Accensi, F., Cabañes, F.J. New screening method for ochratoxigenic molds in pure cultures. *Acta veterinaria Scandinavica*. 1998, 22, 515.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M., 1999. Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. *Alimentaria* 36, 107-113.
- Cabañes, F.J., Accensi, F. Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguéz, S., Pons, A., 2001. *Aspergillus carbonarius* is a source of ochratoxin A contamination in wine. In: Book of abstracts “Bioactive Fungal Metabolites – Impact and exploitation” p 51 Swansea, wales.
- Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.I., Abarca, M.I., Castella, G., Minguéz, S., Pons, A., 2002. What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology* 79, 213-215.
- Cahagnier, B., 1998. *Moisissures des aliments peu hydratés*. Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp.85-88.
- Creppy, E.E., Stormer, F.C., Rösenthaller, R., Dirheimer, G., 1983. Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin alpha on immune response in mice. *Infection Immunology* 39, 1015-1018.
- Creppy, E.E., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Counord, J., Castegnaro, M., Bartsch, H., Montchamont, P., Fouillet, B., Chambon, P., Dirheimer, G., 1991. Human ochratoxicosis in France. IARC scientific publication N°115, International agency for research of cancer, Lyon, France, pp 145-151.
- Da Rocha Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Mgnoli, C.E., Dalcero, A.M., 2002. *Food additives and contaminants* 19, 4, 408-414.

- Dirheimer, G., 1998. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Revue Méditerranéenne Vétérinaire (Toulouse)* 149, 605-616.
- Filali, A., Oumrani, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benyada, A., Creppy, E.E., 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food additives and Contaminants* 18, 565-568.
- Frisvad J.C., 1989. The connexion between penicillia and aspergilli and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 452-457.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In : Samson, R. A., Pitt, J. I. (eds.), *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Plenum, New York, pp 373-384.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Lund, F., Samson, R.A., 1999. The homogenous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion, in integration of modern taxonomic methods for *Aspergillus* and *Penicillium* classification, ed. by Samson, R.A., Pitt, J.I., Harwood academic, Reading, UK, pp 259-277.
- Haubeck, H.D., Lorkowski, G., Kölsh, E., Röschentaler, R., 1981. Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 1040-1042.
- Jørgensen, K., 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15, 550-554.
- Klich, M. A., Pitt, J. I., 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde.
- Krogh, P., Hald, B., Giersten, P., Myken, F., 1974. Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments. *Applied Microbiology* 28, 31-34.
- MacDonald, S.; Wilson, P.; Barnes, K.; Damant, A.; Massey, R.; Mortby, E.; Shepherd, M.J., 1999. Ochratoxin A in dried vine fruit: Method development and survey. *Food additives and contaminants* 16, 253-260.

- Mayura, K., Edwards, J.F., Maull, E.A., Philips, T.D., 1989. The effects of ochratoxin A on postimplantation rat embryos in culture. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 411-415.
- Mortensen, H.P., Hald, B., Madsen, A., 1983. Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 5 Ochratoxin A in pig blood. *Acta Agriculturae Scandinavica* 33, 235-239.
- Ospital, M., Cazabeil, M., Betbeder, A.M., Tricard, C., Creppy, E., and Medina, B., 1998. L'ochratoxine A dans les vins. *Revue Française d'œnologie* 169, 16-18.
- Otteneder, H., and Majerus, P., 2000. Occurrence of ochratoxin A in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants* 17, 793-798.
- Pechavy, M., Bejaoui, H., Mathieu, F., Nguyen, B. L., Roset, M., Lebrihi, A., 2003. Evolution de la population des champignons toxigènes et suivi de la production d'OTA pendant la maturation des grappes de raisin. V^{II}^{ème} Symposium International d'œnologie, 19-21th june 2003. Bordeaux.
- Pitt, J. I. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 266-269.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London.
- Pittet, A., 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an updated review. *Revue Méditerranéenne. Vétérinaire* 149, 479-492.
- Raper, K.B., Fennell, D.I. 1965. *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore USA.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1306-1311.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio, A., 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 88, 63-68.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R., 1995. Determination of ochratoxin A in beer, *Food Additives and Contaminants* 12, 592-598.

- Sweeny, M.J., Dobson, A.D., 1998. Review: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43, 141-158.
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G., 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 864, 89-101.
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J., Kozakiewicz, Z., 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4461-4464.
- Varga, J., Rigó, K., Téren, J. and Mesterházy, Á., 2001. Recent advances in ochratoxin research I. Production, detection and occurrence of ochratoxins. *Cereal research communications* 29, 85-92.
- Walker, R., 1999. Mycotoxins of growing interest. In: *Proceedings of the third Joint FAO/UNEP International Conference on Mycotoxins*. Tunisia: Tunis.
- Zimmerli, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food additives and contaminants* 13, 655-668.

Appendix

(1)

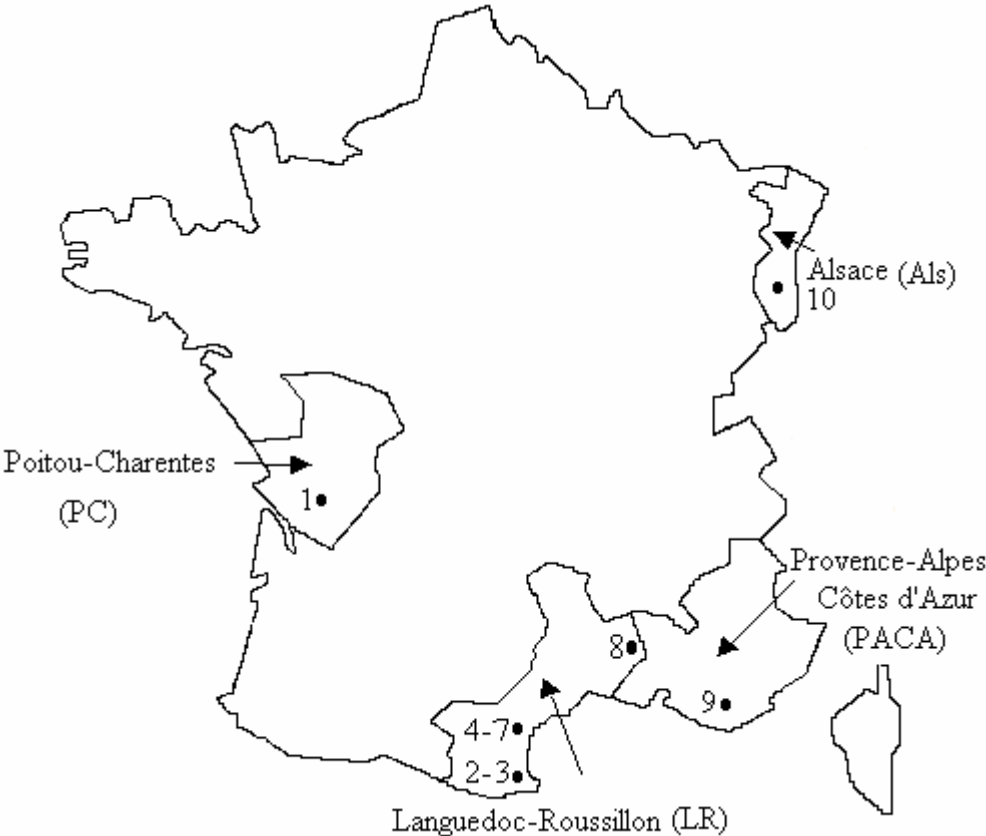


Fig 1: Location of the regions and vineyards (each number represented one vineyard) studied in France.

(2)

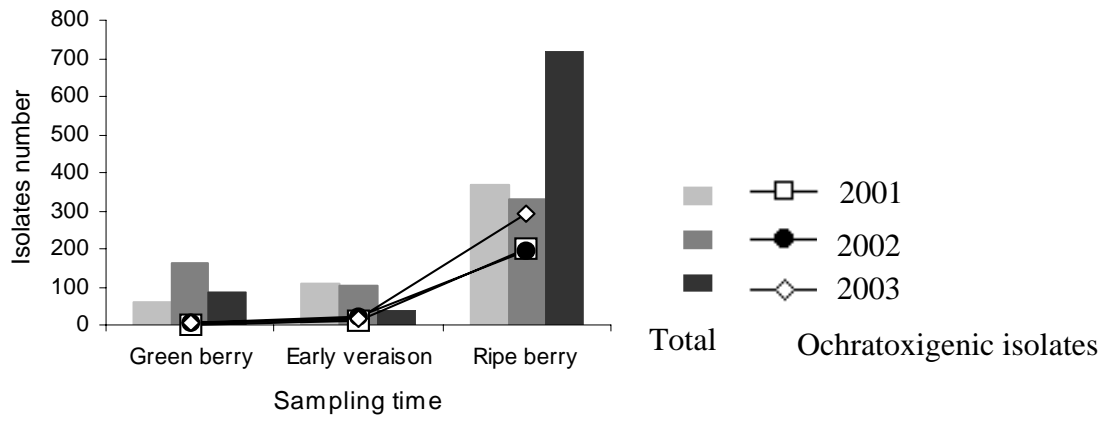


Fig. 2: Evolution of total and ochratoxigenic isolates of black aspergilli during growing season

(3)

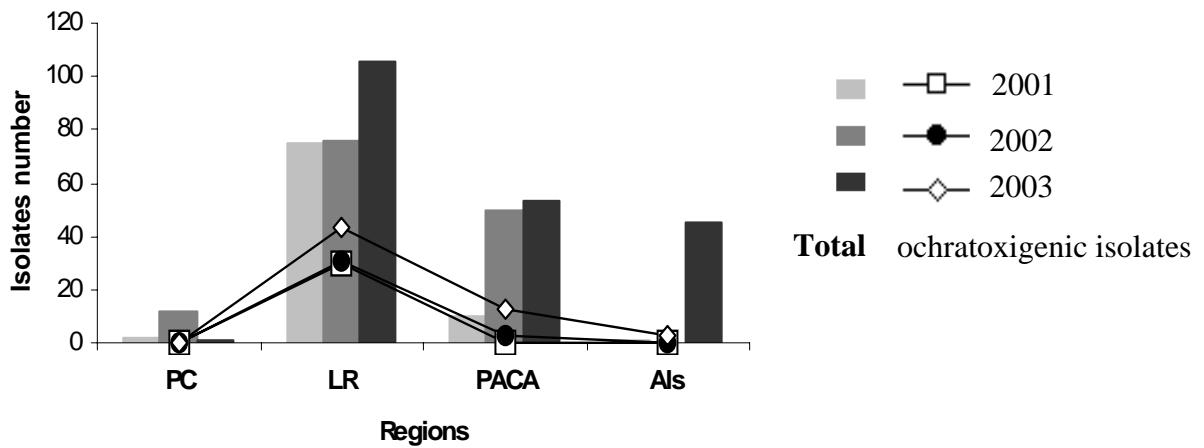


Fig. 3 Distribution of total and ochratoxigenic black aspergilli isolates in different regions during 2001, 2002 and 2003 (fungi isolates number represented in LR are mean values calculated on 7 vineyards)

(4)

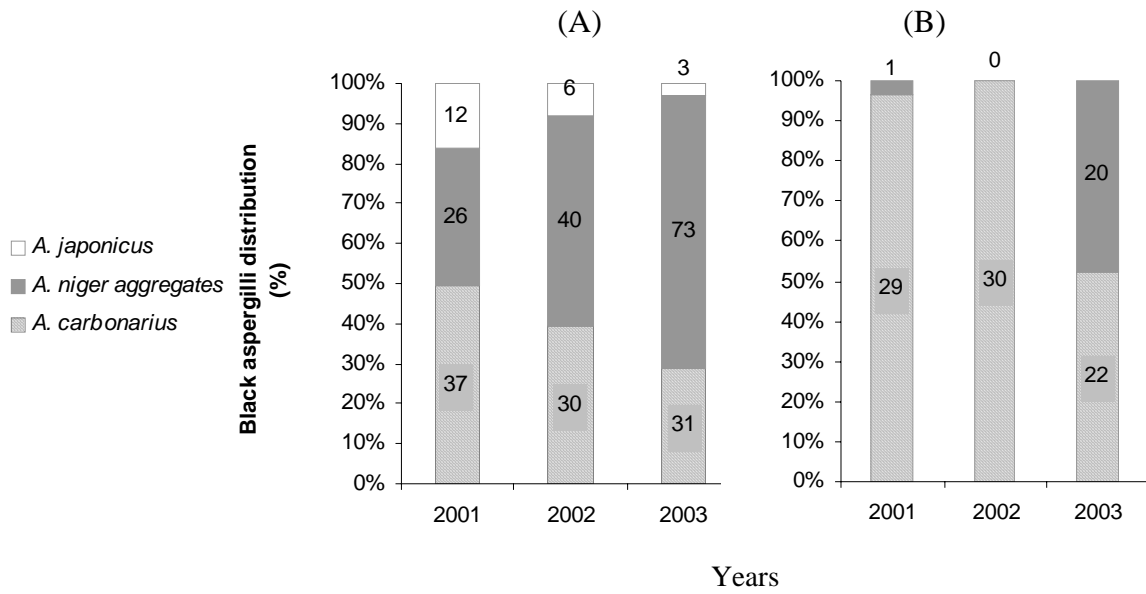


Fig. 4: Black aspergilli species distribution among total (A) and ochratoxigenic (B) isolates in Languedoc-Roussillon region and during 2001, 2002 and 2003.

(values mentioned on the graphics are average isolate numbers calculated on 7 vineyards of LR region)

Table 1 : Deposited isolates in ITEM and IMI collections

Isolate N°	Identification	IMI N°	ITEM N°	OTA production level ($\mu\text{g g}^{-1}$ CYA)
A2215	<i>A.japonicus</i>	389196	5322	0
A411	<i>A.japonicus</i>	389195	5321	0
AX35	<i>A.japonicus</i>	389197	5323	0
B111	<i>A.japonicus</i>	389198	5325	0
B712	<i>A.japonicus</i>	389199	5326	0
C133	<i>A.carbonarius</i>	388568	4781	13,1
C134	<i>A.carbonarius</i>	388490	4796	10,6
C135	<i>A.carbonarius</i>	388569	4782	17
C232	<i>A.carbonarius</i>	388478	4791	3,46
C234	<i>A.carbonarius</i>	388488	4797	8,2
C235	<i>A.carbonarius</i>	388458	4810	1,23
C336	<i>Acarbonarius</i>	388479	4792	3,48
C338	<i>A.carbonarius</i>	388459	4811	0
C432	<i>A.niger</i>	388498	4823	0,25
C513	<i>A.japonicus</i>	389200	5327	0
C518	<i>A.japonicus</i>	389201	5328	0
C535	<i>A.niger</i>	388560	4815	0,11
C536	<i>A.carbonarius</i>	388570	4783	10,86
C633	<i>A.carbonarius</i>	388486	4809	0
C637	<i>A.carbonarius</i>	388480	4793	6,76
C933	<i>A.carbonarius</i>	388484	4798	4
CA122	<i>A.japonicus</i>	389206	5333	0
CA223	<i>A.japonicus</i>	389207	5334	0
CA332	<i>A.carbonarius</i>	388572	4789	25,3
CA532	<i>A.carbonarius</i>	388496	4805	26
CA924	<i>A.japonicus</i>	389208	5335	0
CA932	<i>A.niger</i>	388483	4830	0
CaX34	<i>A.niger</i>	388505	4828	0
CAX38	<i>A.niger</i>	388566	4821	0
CN311	<i>A.japonicus</i>	389205	5332	0

CX33	<i>A.niger</i>	388499	4824	0,09
G132	<i>A.japonicus</i>	389213	5339	0
G221	<i>A.japonicus</i>	389210	5336	0
G231	<i>A.japonicus</i>	388506	4814	0
G431	<i>A.niger</i>	388507	4829	0
G522	<i>A.japonicus</i>	389211	5337	0
G731	<i>A.carbonarius</i>	388573	4790	2,82
G732	<i>A.carbonarius</i>	388494	4806	2,63
G738	<i>A.carbonarius</i>	388495	4807	37,5
G921	<i>A.japonicus</i>	389212	5338	0
G936	<i>A.japonicus</i>	389214	5340	0
GX312	<i>A.niger</i>	388567	4822	0
Mu141	<i>A.carbonarius</i>	388574	4785	4,05
Mu143	<i>A.niger</i>	388561	4816	0
Mu148	<i>A.niger</i>	388502	4826	0
Mu212	<i>A.japonicus</i>	389202	5329	0
Mu245	<i>A.carbonarius</i>	388489		0
Mu246	<i>A.niger</i>	388487	4817	0
Mu247	<i>A.carbonarius</i>	388481	4794	8,78
Mu249	<i>A.niger</i>	38562	4818	0
Mu343	<i>A.niger</i>	388563	4819	0
Mu412	<i>A.japonicus</i>	389203	5330	0
Mu441	<i>A.carbonarius</i>	388575	4786	15
Mu541	<i>A.japonicus</i>	389204	5331	0
Mu543	<i>A.carbonarius</i>	388491	4801	6
Mu642	<i>A.carbonarius</i>	388576	4787	13,16
Mu644	<i>A.carbonarius</i>	388492	4802	14
Mu649	<i>A.carbonarius</i>	388577	4788	9,45
Mu7412	<i>A.carbonarius</i>	388485	4804	7,43
Mu746	<i>A.carbonarius</i>	388493	4803	10,84
Mu747	<i>A.niger</i>	388564	4831	0
Mu848	<i>A.niger</i>	388503	4832	0
Mu943	<i>A.niger</i>	388504	4827	0
MuX42	<i>A.carbonarius</i>	388482	4795	6,5
MuX44	<i>A.niger</i>	388565	4820	0

SA332	<i>A.carbonarius</i>	388497	4799	25
SA411	<i>A.japonicus</i>	389209	5324	0
SA436	<i>A.carbonarius</i>	388500	4808	0
SA636	<i>A.carbonarius</i>	388571	4784	1,64
SA731	<i>A.niger</i>	388501	4825	0
2A138	<i>A.niger</i>	390084		0
2A215	<i>A.japonicus</i>	390080		0
2A235	<i>A.carbonarius</i>	390090		14,96
2B437	<i>A.carbonarius</i>	390093		3,62
2C236	<i>A.carbonarius</i>	390094		1,82
2CA331	<i>A.niger</i>	390089		0
2CA332	<i>A.carbonarius</i>	390092		4,94
2CA432	<i>A.niger</i>	390087		0
2CN331	<i>A.niger</i>	390088		0
2G221	<i>A.japonicus</i>	390083		0
2G621	<i>A.japonicus</i>	390082		0
2MU135	<i>A.niger</i>	390086		0
2MU531	<i>A.carbonarius</i>	390091		2
2SA 511	<i>A.japonicus</i>	390081		0
2SA331	<i>A.niger</i>	390085		0

LIST OF FIGURES AND TABLES

List of figures

Figure 1. Location of the regions and vineyards studied in France. (Each number represented one vineyard)

Figure 2. Evolution of total and ochratoxigenic isolates of black aspergilli during growing season

Figure 3. Distribution of total and ochratoxigenic black aspergilli isolates in different regions during 2001, 2002 and 2003 (fungi isolates number represented in LR are mean values calculated on 7 vineyards)

Figure 4. Black aspergilli species distribution among total (A) and ochratoxigenic (B) isolates in Languedoc-Roussillon region and during 2001, 2002 and 2003.

(Values mentioned on the graphics are average isolate numbers calculated on 7 vineyards of LR region)

List of Tables

Table 1. Deposited isolates in ITEM and IMI collections

CHAPITRE III.

EFFETS DE CERTAINS AGENTS CHIMIQUES FONGICIDES ET ALCOOLS SUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DE L'OCHRATOXINE A PAR LES CHAMPIGNONS

Introduction

Dans l'environnement vitivinicole, les champignons peuvent se trouver en contact avec divers agents chimiques. Parmi ces agents, on trouve les produits phytosanitaires pesticides et fongicides, utilisés pour préserver la vigne contre l'attaque de certains prédateurs et assurer une récolte de bonne qualité. Certains autres agents chimiques peuvent également être présents au vignoble. Par exemple l'éthanol qui a été testé sur la vigne pour augmenter la production d'anthocyanines sur les baies et améliorer leur couleur à la maturation (El Kereamy *et al.*, 2004). A la récolte cet alcool a été également utilisé pour éliminer la flore fongique d'altération des baies et améliorer par conséquent leur conservation (Lichter *et al.*, 2002). Dans l'environnement vinicole et au cours de la première étape fermentaire de la vinification en rouge, où pellicules de raisin et moût se trouvent mélangés, de faibles quantités d'alcools peuvent exister au sein des cuves et peuvent ainsi rentrer en contact avec les champignons.

Ayant différentes activités insecticides, fongicides ou antimicrobiennes antifongiques, les agents chimiques peuvent, selon les doses utilisées interagir avec l'environnement de la vigne pour perturber son équilibre naturel et être la cause directe ou indirecte d'impacts diverses sur la population ochratoxinogène et sur son pouvoir producteur d'OTA. Plusieurs études ont en effet évoqué les agents chimiques comme étant des facteurs importants dans la mycotoxinogène (Le Bars et Le Bars, 1987; Leszkowicz, 1999).

Différents travaux ont montré que certains traitements insecticides appliqués au vignoble peuvent constituer une méthode de lutte contre la contamination à l'OTA (Rousseau et Blateyron, 2002). En effet, en préservant l'intégrité de la baie ces produits peuvent limiter le développement de certains champignons et ainsi contribuer à diminuer les teneurs en OTA au moment de la vendange. Des essais entrepris par l'ICV ont ainsi montré que la maîtrise du vers de la grappe peut entraîner une réduction de 80 % de la contamination en OTA sur un vin témoin contenant plus de 2 µg/L. Certains produits fongicides utilisés au vignoble sont également efficaces contre le développement des champignons et la diminution des teneurs en OTA sur les raisins. L'efficacité *in vitro* de certains fongicides multisites (folpel ou thirame) ont une action sur la germination des conidies et parmi les antibiotrytis, le fluazinam, le fludioxinil et surtout les anilinopyridines (cyprodinil, pyriméthanil) possèdent des activités inhibitrices importantes tant sur les spores que sur mycélium (Leroux *et al.*, 2002).

Des essais réalisés in vivo au sein du vignoble, ont montré l'efficacité contre *Aspergillus* et *Penicillium* des matières actives pyriméthanil (Scala), fludioxinil et cyprodinil (Switch). Le fosétyl-Al (Mikal) est la seule matière active à avoir régulièrement montré les plus faibles teneurs en OTA dans les moûts et dans les vins (ITV France, 2003).

Or, Moss et Frank (1987) ont attiré l'attention sur l'utilisation de certaines concentrations sub-léthales de certains produits chimiques et leur effet stimulateur sur la production de certaines mycotoxines autre que l'OTA et dans un domaine autre que le vignoble. Un mauvais emploi de l'acide propionique a en effet montré une réduction de la croissance d'*A. flavus* mais une production augmentée en aflatoxine (Hacking et Biggs, 1979). Des concentrations de 6 à 8 ppm du fongicide d'action systémique (tridémorphe) ont favorisé la croissance du champignon *Fusarium sporotrichoides* et diminué la synthèse de la toxine T-2. Ce même fongicide utilisé de 30 à 50 ppm a fortement inhibé le champignon et a fortement augmenté la production de la toxine (Moss et Frank, 1985). Aucune donnée concernant les effets stimulateurs de certains produits chimiques d'usage courant en viticulture n'a été mentionnée au niveau de la bibliographie.

Tout au long de ce chapitre on essayera de discuter les effets de l'utilisation des produits chimiques, en l'occurrence certains fongicides (Mikal et Switch) et de certains produits antifongiques tels que les alcools sur la croissance et la production de l'OTA par les champignons ochratoxinogènes au sein de la filière vitivinicole.

L'effet du stress introduit par ces substances chimiques chez certains organismes fongiques et la possibilité de stimuler leur pouvoir ochratoxinogène sera commenté et discuté dans ce qui suit.

Résultats

1. Effets de certains traitements fongicides (Mikal et Switch) utilisé dans le vignoble sur la croissance des champignons ochratoxinogènes et sur la production d'OTA

Au cours de cette étude deux traitements fongicides, Mikal et Switch ont été appliqués sur deux parcelles de vigne, du cépage Syrah. La population fongique totale et ochratoxinogène ainsi que les teneurs en OTA des raisins ont été comparées à une parcelle témoin sur 3 campagnes successives (figure III.1)

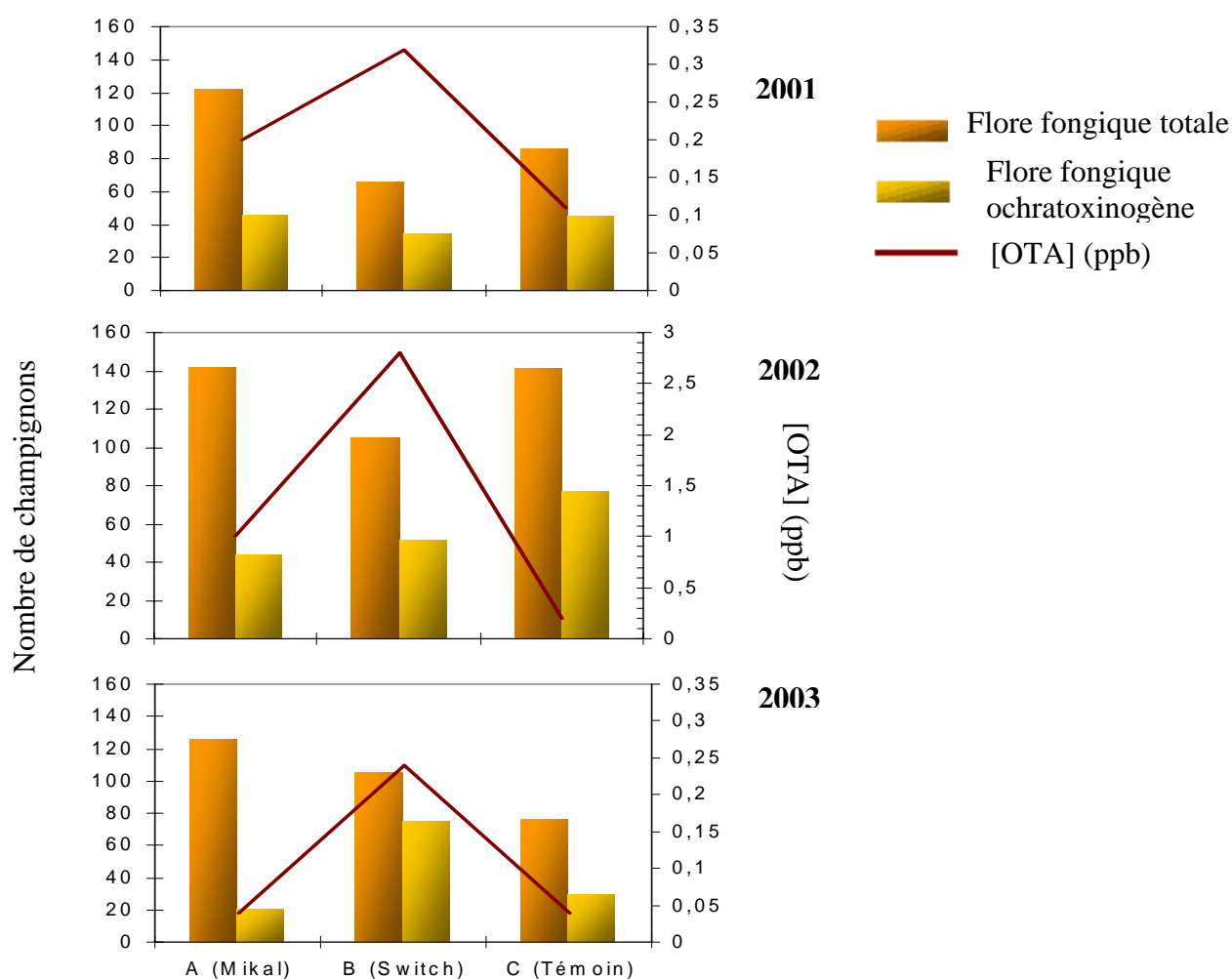


Figure III.1: Effets de traitements fongicides sur le développement de la flore fongique totale et ochratoxinogène et sur la teneur en OTA des raisins

A l'issu de cet essai, nous remarquons qu'avec les mêmes doses utilisées d'une année à l'autre, les résultats sont très différents. La taille des populations fongiques totales et

ochratoxinogènes n'avait aucune relation avec les traitements fongicides utilisés. Les raisins de la parcelle témoin non traitée sont ainsi colonisés par une population fongique de taille similaire, inférieure, voire supérieure à celle colonisant les baies des parcelles traitées. Quelque soit l'année, les raisins traités au Switch et au Mikal sont toujours nettement plus contaminés à l'OTA (de 2 à 3 fois plus) que le témoin. A part en 2003, où le raisin traité au Mikal contient la même quantité en OTA que le témoin.

Ces résultats contradictoires avec ceux mentionnés par l'ICV, considérant que le Switch peut réduire efficacement le nombre des champignons sur le raisin et que le Mikal montre régulièrement un effet dépréciateur des teneurs en OTA des raisins, rejoignent pourtant les réflexions de Moss et Frank (1987) sur la stimulation du pouvoir ochratoxinogène de certains champignons par l'utilisation de certains traitements fongicides. Au-delà des doses utilisées, d'autres facteurs peuvent aussi intervenir (climatiques et autres) pour faire des ces traitements un agent stimulateur de l'ochratoxigénique des populations fongiques autochtones colonisant les baies de raisins.

2. Effets *in vitro* des alcools (éthanol et méthanol) sur la croissance et la production d'OTA par l'espèce *Aspergillus carbonarius*

L'utilisation récente de certains alcools, tel que l'éthanol dans le vignoble et sa présence naturelle dans la cuve de vinification par action fermentaire des levures, nous a amené à réfléchir sur les effets potentiels de ces substances chimiques sur le comportement de la principale espèce ochratoxinogène dans le vignoble français: *A. carbonarius*. Ayant des effets reconnus antimicrobien-antifongiques à certaines doses, l'éthanol et le méthanol ont été tout deux testés pour leurs effets sur la croissance et la production d'OTA par cette espèce. L'expérience est menée *in vitro* sur un milieu CZAPEK Yeast extract Agar et des cinétiques de la croissance du champignon et de la production de l'OTA ont été réalisées sur deux isolats *A. carbonarius* G731 et *A. carbonarius* Mu243, le premier présentant un pouvoir ochratoxinogène 4 fois supérieur au deuxième. Au cours du temps, les diamètres des colonies fongiques sont mesurés afin de suivre la croissance des deux isolats étudiés.

Concernant l'éthanol les résultats suivants ont été obtenus:

Une inhibition importante de la croissance a eu lieu à partir d'une concentration de 2 % d'éthanol et a été faite selon un modèle convexe.

A partir de 1 et jusqu'à 3 % d'éthanol la production d'OTA est stimulée et a atteint les valeurs les plus importantes à la concentration de 2 % où une augmentation de 6 fois pour *A. carbonarius Mu243* et de 13 fois pour *A. carbonarius G731* sont observées. Au delà de 3 % une inhibition totale de la production de l'OTA a été observée.

Une différence entre les deux isolats testés dans leurs réactions vis-à-vis de l'éthanol est toutefois notée. L'espèce fortement productrice d'OTA (*A. carbonarius G731*) a montré une plus importante sensibilité à l'action de l'éthanol que l'espèce moins productrice (*A. carbonarius Mu243*). Le premier isolat est en effet plus affecté dans sa croissance que le deuxième et sa réponse à l'action de cet agent chimique est plus virulente avec des productions en OTA plus importantes.

La même expérience réalisée avec le méthanol a montre une inhibition de la croissance suivant un modèle plutôt concave que convexe et ayant une moindre action que celle occasionnée par l'éthanol. Le méthanol provoque également des réactions stimulatrices de la production de l'OTA moins importantes cependant que celles occasionnées par l'éthanol.

Discussion et conclusion

Au cours de ce chapitre on a réussi à mettre en évidence les effets de certains agents chimiques fongicides ou antimicrobiens (alcools) sur la croissance et la production d'OTA par certains champignons ochratoxinogènes. A certaines concentrations, ces agents peuvent agir en tant que facteurs de stress ou stimuli extérieurs et occasionner des réponses virulentes du champignon qui augmente alors sa production en OTA.

En essayant de s'adapter à son nouvel environnement, le champignon met en place une machinerie de lutte contre l'agent de stress. Etant un produit du métabolisme secondaire, de rôle peu connu et n'ayant pas d'évidentes fonctions dans l'économie de la cellule vivante, l'OTA pourrait être un agent protecteur du champignon contre de tels facteurs de stress.

Les différentes réactions observées pour les deux isolats d'*A. carbonarius* montrent qu'au sein d'une population ochratoxinogène des particularités individuelles dans la réponse au stress peuvent se manifester. L'isolat fortement producteur est plus sensible à l'agression extérieure. Affecté à un degré important dans sa croissance, il a réagit en augmentant fortement sa production en OTA pour mieux probablement se protéger ou réparer les dommages éventuels qui l'ont atteint. Ces réactions des champignons vis-à-vis de l'usage des produits chimiques pourraient être dans certains cas la cause de la production de l'OTA au sein du vignoble (on le voit avec l'utilisation du Switch et du Mikal). Ajoutée aux différents facteurs affectant la mycotoxinogénèse, cette réactivité individuelle des champignons en réponse à des agressions environnantes complique encore plus la maîtrise au vignoble du problème de l'OTA. Cette maîtrise de l'OTA au sein du vignoble proposée par l'ICV (France) à travers une prophylaxie dirigée contre les insectes et les dégâts qu'ils occasionnent sur les baies et qui favorise une attaque fongique ainsi qu'une production de l'OTA, serait en contradiction avec les études de Battilani et Pietri (2003). Ces auteurs pensent en effet que la capacité invasive de l'espèce *A. carbonarius* lui permet d'attaquer les baies saines et de produire de l'OTA. Ils ont également insisté sur l'agressivité du champignon, facteur à prendre en considération dans le processus de contamination en l'OTA dans le vignoble.

Ainsi la contamination en l'OTA dans le vignoble serait probablement inévitable et pourrait même se poursuivre au-delà de la culture au niveau du chape de vinification pendant les premiers stades fermentaires. Ainsi l'alcool présent dans la cuve pourrait stimuler le métabolisme ochratoxinogène d'*A. carbonarius* pendant la macération et contribuer ainsi à la

forte contamination des vins rouges comparés aux rosés et aux blancs, expliqué auparavant par deux principales hypothèses soutenant un développement de champignons ochratoxinogènes ou une action extractrice de l'OTA présente dans les pellicules par l'alcool.

Cette inévitable contamination au niveau des vignobles et la difficulté de la maîtriser au sein de cet environnement complexe, nous amènent à envisager de plus en plus certaines actions de décontamination et la mise au point de procédés efficaces curatifs pour mieux répondre aux exigences sanitaires de qualité au sein de la filière.

Article 2:

Alcohols effects on growth and ochratoxin A production by two isolates of *Aspergillus carbonarius* species.

Soumis à *International Journal of Food Microbiology*

Hend BEJAOU^a, Florence MATHIEU^a, Patricia TAILLANDIER^b, Ahmed LEBRIHI^{a*}

Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS)

Equipe: Génie des Systèmes Microbiens.

^a*ENSAT/INPT: 1, Av. de l'Agrobiopôle BP32607, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, 31326, France*

^b*ENSIACET/INPT: 5, rue Paulin Talabot, BP 1301, 31106 Toulouse Cedex 1, France*

* Corresponding author. Tel.: 0562193944; fax: 0562193901.

E-mail address: lebrihi@ensat.fr (A. Lebrihi).

Abstract

The effects of different concentrations of ethanol and methanol (ranged between 0 and 5%) on in vitro growth and ochratoxin A (OTA) production by two isolates of *A. carbonarius* (*A. carbonarius* G731 and *A. carbonarius* Mu243) on CZAPEK Yeast extract Agar medium were for the first time assessed.

Beyond thresholds, ethanol and methanol presented an antifungal action and delayed *A. carbonarius* growth. However the two alcohols presented different antifungal behaviours and methanol affected growth in a more important way. An increase, a decrease or a total inhibition of OTA also accompanied this decrease in growth. Until 2% alcohol, the stimulation of ochratoxin A production was considered as part of the metabolic machinery of stressed fungi and OTA may be important in protecting and maintaining the integrity of the fungus. Beyond 2%, decreases or total inhibition of OTA production were the consequences of the drastic inhibition effects of alcohols on fungi growth.

At those concentrations, the use of alcohols could be a new hope in preventing OTA production on vine. However, the aggressive character of *A. carbonarius* must be also considered.

Keywords: Ethanol; Methanol; Alcohol stress; *Aspergillus carbonarius*; Ochratoxin A; Fungal growth; Grapes

1. Introduction

According to their nature and amount, alcohols are not neutral agents in their interaction with fungi and could have effects on their growth and metabolism.

Largely known as biocides, between 60 and 90% they are considered antiseptics, exhibiting rapid-broad-spectrum antimicrobial activity against different microorganisms like fungi (McDonnell and Russell, 1999), controlling their mycelial development and spore germination without being sporicidal (Yasuda-Yasuki et al., 1978). Previous authors showed also that grapes dipped in ethanol at 70% eliminated most of the surface fungal (Lichter et al., 2002). Below 50% this action is significantly lower, but even at low concentration of alcohols, impacts on growth and metabolism were still maintained and some terrestrial green plants could secrete toxic alcohols in their defensive strategies against some fungal predator (Daurade-Le Vagueresse et al., 2001). Low amounts of alcohols could have either stimulatory or inhibitory effects on the production of some primary useful (L-malic acid (Tachibana and Shiode, 1966) citric acid (Qadeer et al., 1968)), or secondary dangerous metabolites such as mycotoxins (Basappa et al., 1967; Siriacha et al., 1991).

Ochratoxin A is a mycotoxin formed by the action of some fungi on agricultural crops in the field or during storage (Mortensen et al., 2003). It is considered as a very dangerous substance having carcinogenic, immunosuppressive and hepatotoxic properties (Stormer, 1992). It has been detected in a variety of food products like cereals (Jorgensen et al., 1996), coffee (Pittet et al., 1996), grapes and grape products (Zimmerli and Dick, 1996; McDonald et al., 1999) and could then be a serious health hazard throughout the world (Smith and Moss, 1985).

On grapes, *Aspergillus carbonarius* is considered as the principle ochratoxigenic fungi on French grapes. Colonising the berries in vineyards all along their growth, and especially at maturation, this fungus could produce high amounts of OTA (Bejaoui et al., in press), further recovered in grape juices and wines and depreciating their sanitary qualities (Zimmerli and Dick, 1996).

So, this study was intended to assess for the first time the effects of two alcohols (ethanol and methanol), on growth and OTA production on a solid laboratory medium by two *A. carbonarius* isolates recovered from French grapes.

Gauging those alcohols uses according to their impacts on the ochratoxigenic metabolism, and/or developing preventive strategies against OTA production could be the direct reaches of this study.

2. Materials and methods

2.1. Moulds

Two fungi of *Aspergillus carbonarius* species isolated on French grapes were studied: *Aspergillus carbonarius* G731 and *Aspergillus carbonarius* Mu243. The first isolate was 4-folds more OTA producer than the second.

2.2. Preparation of spore suspensions

Spores, obtained from mycelium grown on CYA medium, 25°C, aged 7 days, were collected. After counting the spores on Thomas cell, the solutions were standardised at 10^7 conidia ml⁻¹.

2.3. Cultivation conditions

Czapek Yeast extract agar (CYA) was prepared by dissolving 30 g of saccharose, 5 g of yeast extract, 50 ml of solution A (obtained by dissolving 40 g of NaNO₃, 10 g of KCl, 10 g of MgSO₄·7H₂O, and 0.2g of FeSO₄·7H₂O in 1 l of distilled water), 50 ml of solution B (obtained by dissolving 20 g of K₂HPO₄ in 1 l of distilled water) and 1 ml of metallic solution (solution C : prepared by dissolving 10 g of ZnSO₄·7H₂O, 5 g of CuSO₄·H₂O in 1 l of distilled water) and 15 g of Bacto-agar in 1 l distilled water.

Ethanol concentrations in the range 0-5% (Wt/Wt) were obtained by mixing appropriate volumes of absolute ethanol (purity \geq 99.8%, Prolabo, France) with cooled CYA medium in 9cm-Petri dishes at about 45-50°C.

Cultivations were carried out on sterile 9cm-Petri dishes containing 20 ml of CYA medium per plate. All experiments were performed in triplicates for a maximum duration of 16 days.

2.4. *fungus growth*

Each species studied was inoculated as a small loop (2 μ l) of spore suspension (10^7 conidia ml $^{-1}$) in the middle of the Petri dishes containing CYA medium added with different amount of alcohols. The diameters of the growing colonies were measured every day. Measurements of all colonies were made in two directions at right angles to each other (Trinci, 1969; Gervais et al., 1988). Colony diameters were then plotted against time and the linear regression was calculated in order to estimate the growth rate (K_D) in mm day $^{-1}$ for each isolate and under each alcohol's concentration.

The effect of the different concentrations of alcohols on the mycelial growth was studied through the inhibition index (II) defined as:

$$II = ((K_{D \text{ control}} - K_{D \text{ treated}})/K_{D \text{ control}})100$$

2.5. *ochratoxin A production*

From each fungus conidia suspension, 0.1 ml was displayed on 9cm-petri dishes containing different concentrations of alcohols.

2.5.1. *Sample preparation*

Ochratoxin A production by the 2 fungal isolates of *A. carbonarius* was followed during the time. OTA was extracted according to Bragulat et al. (1998) and was then analysed by HPLC.

2.5.2. *Detection and quantification of OTA*

OTA was detected and quantified by reversed-phase high performance liquid chromatography. The HPLC apparatus consisted of a solvent delivery system and fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 466 \text{ nm}$) and UV detectors. The analytical column used was a 150 x 4.6 mm Uptisphere 5 μ C18 ODB fitted with a guard column of 10 x 4 mm. The mobile phase consisted of a mixture of HPLC grade acetonitrile/water/acetic acid (100/99.8/0.2) at a flow rate of 1 ml min $^{-1}$ and the column temperature was at 30°C. Kroma 3000 (Biotek) was the data acquisition system. Injections were made with an autoinjector (BIO-TEK, Milan, Italy) and the injection volume was of 80 μ l. Ochratoxin A was identified by its retention time (33 min) according to a standard obtained from Sigma (Steinheim, Germany) and quantified by measuring the peak area.

2.6. Statistical analysis

All analysis were done in triplicate. SPSS, version 11.5.1, for windows was used for the statistical analysis of the data. Significant differences in the mean values were reported at P values of <0.05 .

3. Results

3.1. Effects of methanol and ethanol on fungal growth

Filamentous molds grew on CYA medium forming circular colonies. Fig. 1 represents colony diameters plotted versus time for each isolate of *A. carbonarius* and at different concentrations of ethanol and methanol. This plot showed a straight line (the correlation coefficient (R^2) ranged between 0.985 and 0.999) after an initial lag period. This lag phase is the time required for the colony to grow beyond the inoculation zone (3mm).

At low concentrations of methanol (0.1%) and ethanol (0.1% and 0.5%), inhibition of growth was very weak and growth rate was not affected (Fig. 1). Inhibition indexes (II), presenting decreases in growth rates compared to controls, are summed up in Table 1. We can observe that regardless the isolate tested, fungal growth rates versus ethanol concentrations had a convex shape (Fig. 2). Important decreases in growth rates began at 2% ethanol where the drop was linear.

At increasing methanol concentrations, fungal growth rates took rather a concave pattern. Important decreases in growth rates were observed from 1% and were then stabilised from 3%. Ethanol and methanol had then two different antifungal behaviours. Being for the first convex and for the second concave, methanol seemed to be a more important antifungal agent. However at the highest concentration tested (5%) the two alcohols had the same inhibition effect. Although the same tendency was observed for the two fungal isolates in their growth pattern in presence of alcohols, *A. carbonarius* G731 seemed to have been affected to a more extent than *A. carbonarius* Mu243. Indeed at the same concentrations of methanol or ethanol, more important decreases in growth were observed for *A. carbonarius* G731.

3.2. Effects of methanol and ethanol on ochratoxin A production

During this study, OTA production by each fungal isolate was followed over the time and for each alcohol concentration. It is seen that from the fourth day of incubation, maximum levels of OTA were reached and were kept constant regardless of time and of fungal isolate (result not shown).

OTA production at the fourth day obtained for each fungal isolate and at the different alcohols concentrations is shown in Fig. 2. It can be observed that ethanol and methanol concentrations stimulated OTA production for both isolates with a maximal effect at 2%. At this concentration, stimulation by methanol was about 2 and 7.5 folds respectively for *A. carbonarius* Mu243 and *A. carbonarius* G731; for ethanol, it was respectively of 6 and 13 folds (Table 2). So, ethanol had a stronger stimulating effect than methanol and affected more the strong producer (*A. carbonarius* G731) than the weak producer (*A. carbonarius* Mu243). At 1%, both alcohols enhanced OTA production only for the isolate *A. carbonarius* G731. Beyond 2%, OTA production decreased with increasing of alcohols concentrations and was totally inhibited at 3% for methanol and at 5% for ethanol for both isolates. Nevertheless, the isolate *A. carbonarius* G731 still had a stimulated production in comparison with the control at 3% ethanol confirming the stronger effect on this isolate.

4. Discussion

This study has shown that above thresholds, ethanol and methanol affected growth rates and ochratoxin A production by *A. carbonarius*. In previous studies, Holzberg et al. (1967), has also suggested a threshold concentration for ethanol in its effect on fungal growth. For lowest alcohols concentrations, growth was initially delayed in the lag phase but early restored. The fungi has probably succeeded to adapt rapidly to alcohol's presence and to make normal growth. Some authors also suggested the possibility of alcohol's utilisation as a carbon source by the mycelium. (Dantigny et al., 2004).

Moreover, at those growth thresholds, OTA production was not affected. The fungi growing in a normal way presented also a normal secondary metabolism. Above those thresholds, increasing levels of alcohols had antifungal activities against *A. carbonarius* species. This result is consistent with previous findings where alcohols had antimicrobial activity against fungi, inhibiting sporulation and spore germination (Russell et al., 1994). Methanol at 3% has also shown as inhibitor of the germination of *A. niger* spores (Navaratnam et al., 1998), and different concentrations of ethanol (ranged between 0 and 6%) had inhibitor effects on the growth of different fungi genera (*Aspergillus*, *cladosporium*, *Eurotium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium* and *Rhizopus*) (Dantigny et al., 2004).

Comparison between the two alcohols used in our study revealed that at low concentrations, ethanol was a weaker antifungal agent than methanol. This result is in agreement with different authors describing the greater tolerance to ethanol than methanol by many cells and explained by the inhibitor effects of their corresponding aldehydes (issued

from alcohol's oxidation) (Rodney, 1989). However, at the highest concentration tested in our study (5%), ethanol could have the same inhibition effect than methanol and was even in many instances reported in literature as a slight greater inhibitor (Hansch and Dunn, 1972). Furthermore, according to our results, ethanol and methanol-induced inhibition followed respectively convex and concave patterns. Indeed, previous studies (Dantigny et al., 2004) have proposed a mathematical model describing fungal growth in presence of ethanol. This model equation had either a convex or concave shape for the aspergilli tested, but had rather a convex shape for *A. niger*, the most phylogenitically related species to *A. carbonarius* (Abarca et al., 2004). However Ghosh and Tayagi (1979) and Holzberg et al. (1967) has suggested a linear decreasing pattern for growth rate in its relation to ethanol. This was also observed in our study for the same alcohol from the concentration of 2%.

Thereby, *A. carbonarius* exposed to alcohols as chemical stress agents would probably suffer damage (Mishra, 1993). Cytotoxic effects of ethanol on plasma membrane (Ingram and Buttke, 1984; Casey and Engledew, 1986) and its inhibition to the uptake of various nutrients (glucose (Leão and Van uden, 1982), maltose (Loureiro-Dias and Peinado, 1982), amino-acids (Leão and Van uden, 1984)), could provide physiological basis of ethanol induced inhibition of growth. Baykousheva (1988) has also demonstrated alcohol's ability to perturb the structure of biological membranes thus interfering with the process of protein translocation through lipid layers. Alcohols could also intervene to decrease the biological activity of some extracellular enzymes (Casey and Ingledew, 1986; Baykousheva, 1988) and could occasion abnormal mitotic spindle apparatus in *A. nidulans* (Harsanyi et al., 1977). Alcohol's could also interact with the genome and genetic analysis of ethanol-tolerant wine yeast strains has led to conclusion that a number of genes are involved in limiting proliferation of the cells in the presence of ethanol (Jemenez and Benitez, 1987). However, in our study, the use of alcohols, not only affected growth but also OTA production by *A. carbonarius*. Those denaturing and damaging effects of alcohols on cells could have subsequent interference with the metabolism.

According to the concentrations tested OTA production was then either increased, decreased or totally inhibited. The increase in OTA production by *A. carbonarius* observed in our experiments is consistent with previous studies showing the enhancer effect of 2% ethanol on aflatoxin production (by approximately 5 folds over that of the control) by *Aspergillus oryzae* (Basappa et al., 1967).

In other examples, the considerable reduction in the growth rate of a fungus under nutrient unbalanced conditions was also reported as frequently accompanied by the production of

secondary metabolites (Turner, 1971; Bu'lock, 1974). It was also shown (Lee and Magan, 1999) that the reduction in growth of *Aspergillus ochraceus* when competing with certain species under certain conditions could stimulate ochratoxin production. This phenomenon was explained by the attempting of *A. ochraceus* to maintain occupation of nutrient areas and preemptive exclusion of competitors from the niche occupied. *Fusarium* species has also significantly increased fumonisin production when interacting with different other fungi (Marin et al., 1998). So enhancing mycotoxins production could probably be a key component of the toxigenic fungi strategy to defend its area and ensure its survival under stressing conditions. Indeed, those mycotoxins could have physiological role and thus may protect the fungus from stress agents (Jennings, 1993). Citrinin was then recently confirmed as a sun protectant agent for its producer: *Penicillium verrucosum* (Stormer et al., 1998).

Although with no obvious role in the internal economy of the organism (Turner, 1971, Turner and Albridge, 1983), different other secondary metabolites may have subtle protective functions (Jennings, 1993). Indeed, melanins has protected fungi possessing them against ultraviolet radiation (Arpin and Bouillant, 1988), Peptides are also known to bind metal ions and *Schizosaccharomyces pombe* produce phytochelatin in response to the presence of toxic metals (Jennings and Burke, 1990).

However increased methanol and ethanol concentrations occasioned a drastic decrease in growth followed by either a decrease or a total inhibition of OTA. In fact, Some authors reported similar results, where 3% methanol and ethanol decreased *A. flavus* infection (by 42%) and aflatoxin accumulation (by 85%) in high moisture maize kernels (Siriacha et al., 1991). At those concentrations, methanol and ethanol have both antifungal and antitoxigenic activities. Those concentrations could then be interesting to prevent *A. carbonarius* development on grape berries and ochratoxin A production.

Over this study, both isolates: *A. carbonarius G731* and *A. carbonarius Mu243*, had overall expressed similar behaviours towards alcohols in growth or in OTA production. However, individual differences between those two isolates were observed and are noteworthy. Firstly, *A. carbonarius G731* was affected in growth to a more extent than *A. carbonarius Mu243*, and has secondly reacted by increasing its OTA production to higher levels. This isolate seemed then to be more sensitive to alcohols and reacted by secreting higher OTA amounts to probably more protecting itself from the stress agent. Differences between microorganisms to tolerate ethanol present in their surroundings media are also reported (Ingram and buttke, 1984).

Moreover, an initial difference in the toxigenic character of the two isolates is to be considered, as *A. carbonarius* G731 was 4-folds more OTA producer than *A. carbonarius* Mu243. Hence, the higher the toxigenic potential of the isolate was, the more important its sensitivity and reactivity against exterior stimuli in stressing environments.

Furthermore, *A. carbonarius* was also described by Battilani and Pietri (2002) as an aggressive fungi. When colonising grape berries, this species could then produce more OTA amounts. This aggressive character of *A. carbonarius* on grapes must be considered when using those alcohols on vine to eventually preventing OTA on grapes.

Acknowledgement

This work was supported by grants from the European Union (QLK1-CT-2001-01761) and French “Ministère de la jeunesse de l'éducation et de la recherche” (AQS N°:02 PO571).

References

- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J., Cabañes, F.J., 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 33-49.
- Arpin, N., Bouillant, M. L., 1988. Métabolites secondaires fongiques: diversité de structures mais unité de fonction, la protection. *Cryptogamie Mycologie* 9, 267.
- Basappa, S. C., Jayaraman, S., Sreenivasamurthy, V., Parpia, H. A. B., 1967. Effect of B-group vitamins and ethyl alcohol on aflatoxin production by *Aspergillus oryzae*. *Indian Journal of Experimental Biology* 5, 4, 262-263.
- Battilani, P., Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes. *European Journal of Plant Pathology* 108, 639-643.
- Baykoucheva, S., 1988. Secretion of proteins by *Bacillus subtilis* 168 grown in the presence of membrane active agents (alcohols). *Journal of Chromatography A* 440, 379-383.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., In press. Fungal flora and ochratoxin A production during wine grape maturation in French vineyards during three years. *International Journal of Food Microbiology*.
- Bu'lock, J., 1974. Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development in the filamentous fungi, vol I, *Industrial Mycology* (J. E. Smith and D. R. Berry, ed.) Edward Arnold, London, pp. 33.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Accensi, F., Cabañes, F.J., 1998. New screening method for ochratoxigenic molds in pure cultures. *Acta Veterinaria Scandinavica* 22, 515.

- Casey, G. P., Ingledew, W. M., 1986. Ethanol tolerance in yeasts, *CRC critical Reviews in Microbiology* 13, 219-280.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Radoi, F., Bensoussan, M., Zwietering, M., 2004. Modelling the effect of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. *International Journal of Food Microbiology* In press.
- Daurade-Le Vagueresse, M. H., Romiti, C., Grosclaude, C., Bounias, M., 2000. Coevolutionary toxicity as suggested by differential coniferyl alcohol inhibition of ceratocystis species growth. *Toxicon* 39, 203-208.
- Gervais, P., Bensoussan, M., Grajek, W., 1988. Water activity and water content: comparative effects on the growth of *Penicillium roquefortii* on solid substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27, 389-392.
- Ghosh, T. K., Tyagi, R. D., 1979. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate.1. Batch versus continuous systems. *Biotechnology and Bioengineering* 21, 1387.
- Hansch, C., Dunn, W. J., 1972. Linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs. *Journal of Pharmacological Sciences* 61, 1-19.
- Harsayani, Z., Granek, I. A., Mackenzie, D. W., 1977. Genetic damage induced by ethyl alcohol in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research* 48, 51-73.
- Holzberg, I., Finn, R. K., Steinkraus, K. H., 1967. A kinetic of the alcoholic fermentation of grape juice, *Biotechnology and Bioengineering* 9, 413.
- Ingram, L. O., Buttke, T. M., 1984. Effects of alcohols on microorganisms. *Advances in microbiol physiology* 25, 253.
- Jennings, D. H., Burke, R. M., 1990. Compatible solutes the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytologist* 116, 277.
- Jennings, D. H., 1993. Understanding tolerance to stress: laboratory culture versus environmental actuality. *Mycology Series*, 10 (Stress Tolerance of Fungi). Marcel Dekker, New York, pp. 1-11.
- Jimenez, J., Benitez, T., 1987. Genetic analysis of highly ethanol tolerant wine yeasts. *Current Genetics* 12, 421-428.
- Jorgensen, K., Rasmussen, G., Thorup, I., 1996. Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danich population. *Food Additives and Contaminants* 13, 95-104.
- Leão, C., Van Uden, N., 1982. Effects of ethanol and other alcohols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 403.
- Leão, C., Van Uden, N. 1984. Effect of ethanol and other alkanols on general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 24, 2601.

- Lee, H. B., Magan, N., 1999. Environment factors influence on in vitro interspecific interactions between *Aspergillus ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. *Mycopathologia* 146, 43-47.
- Lichter, A., Zutkhy, Y., Sonogo, L., Dvir, O., Kaplunov, T., Sarig P., and Ben-Arie, R., 2002. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 24, 301-308.
- Loureiro-Dias, M. C., Peinado, J. M., 1982. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 4, 721-724.
- McDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., mortby, E., Shepherd, M. J., 1999. Ochratoxin A in dried vine fruit: Method development and survey. *Food Additives and Contaminants* 16, 253-260.
- Marin, S., Sanchis, V., Rull, F., Ramos, A. J., Magan, N., 1998. Colonisation of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *Journal of Food Protection* 61, 1489-1496.
- McDonnell, G., Russell, D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 1, 147-179.
- Mishra, P., 1993. Tolerance of fungi to ethanol. In: Jennings, D. H. (Ed.), *Mycology Series*, 10 (Stress Tolerance of Fungi). Marcel Dekker, New York, pp. 189-208.
- Mortensen, G. K.; Strobel, B. W.; Hansen, H. C., 2003. Determination of zearalenone and ochratoxin A in soil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376,1, 98-101.
- Navaratnam, P., Arasaratnam, V., Balasubramaniam, K., 1998. Channeling of glucose by methanol for citric acid production by *Aspergillus niger*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14, 4, 559-563.
- Pittet, A., Tornare, D., Huggett, A., Viani, R., 1996. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44, 3564-3569.
- Qadeer, M. A., Khan, K. M., Chughtai, M. I. D., Ashraf, M., 1968. Effect of alcohols on the biosynthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Pakistan Journal of Biochemistry* 1, 1-2, 41-48.
- Rodney, P.J., 1989. Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* 11, 3, 130-153.
- Russell, A. D., Hugo, W. B., 1988. Perturbation of homeostatic mechanisms in bacteria in pharmaceuticals. In: R., Whittenbury, G. W., Gould, J. G., Banks, R. G., Board (Ed.),

- Homeostatic mechanisms in microorganisms. Bath University Press, Bath, England, pp. 206-219.
- Siriacha, P., Kawashima, K., Ching Duang, S., Tonboonek, P., 1991. Effects of alcohols on the infection of *Aspergillus favus* and the control of aflatoxin contamination in high moisture maize. *Mycotoxins* 34, 39-42.
- Smith, J. E., Moss, M. O., 1985. *Mycotoxins. Formation, Analysis and significance*, John Wiley and sons, Chichester.
- Stormer, F. C., Sandven, P., Huitfeldt, H. S., Edward, W., Skogstad, A., 1998. Does the mycotoxin citrinin function as a sun protectant in conidia from *Penicillium verrucosum*? *Mycopathologia* 142, 43-47.
- Tachibana, S., Shiode, J., 1966. The mechanism of L-malic acid fermentation using *Aspergillus oryzae*. II. The simulating effects of ethanol and glycol. *Hakko Kogaku Zasshi* 44, 9, 588-593.
- Trinci, A.P.J., 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology* 57, 11-24.
- Turner, W. B., 1971. *Fungal metabolites*. Academic press, London.
- Turner, W. B., Aldridge, D. C., 1983. *fungal metabolites II*. Academic Press, London.
- Yasuda-Yasaki, Y., Namiki-Kanie, S., Hachisaka, Y., 1978. Inhibition of germination of *Bacillus subtilis* spores by alcohols. In: G., Chambliss, J. C., Vary (Eds.), *Spores VII*. American Society for Microbiology, Washington, D. C, 113-116.
- Zimmerli, B., Dick, R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 13, 655-668

Appendix

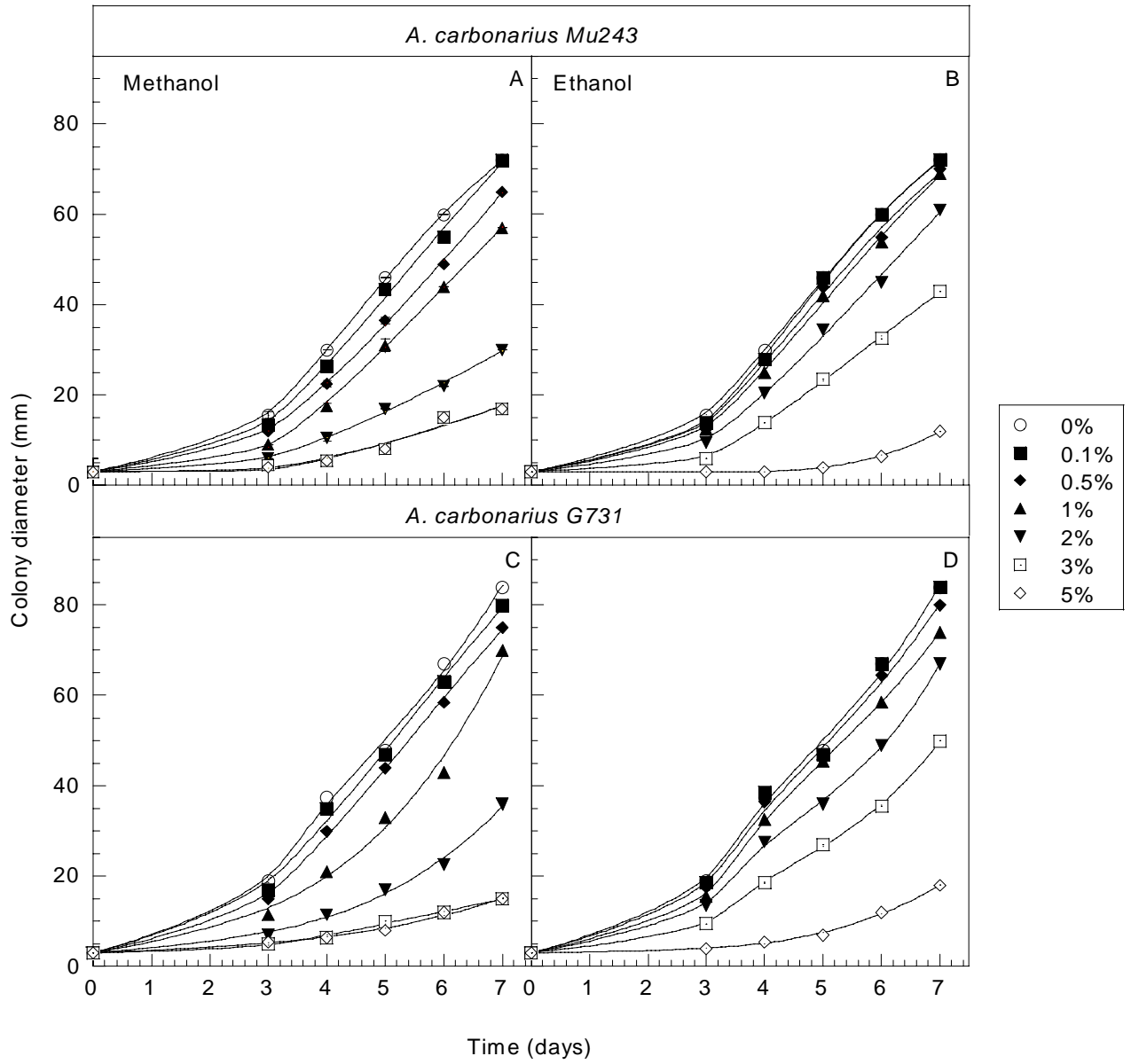
(Table 1)

Alcohols (%)	Inhibition indexes (II)			
	<i>A. carbonarius</i> Mu243		<i>A. carbonarius</i> G731	
	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol
0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0
0,5	8	0	5	0
1	15	0	31	7
2	59	11	66	25
3	77	36	86	45
5	77	79	86	90

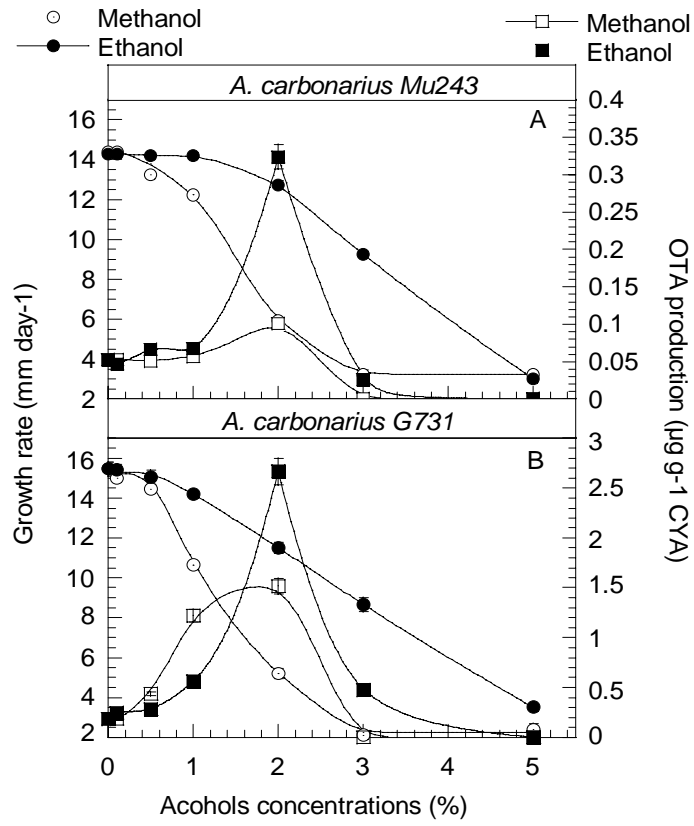
(Table 2)

[OTA]sample/[OTA]control				
<i>A. carbonarius</i> Mu243 <i>A. carbonarius</i> G731				
Alcohols (%)	Methanol	Ethanol	Methanol	Ethanol
0,1	1	1	1	1
0,5	1	1	2	1
1	1	1	6	3
2	2	6	7,5	13
3	0	0,5	0	2
5	0	0	0	0

(Fig. 1)



(Fig. 2)



Appendix

List of tables and figures

List of tables

Table 1

Inhibition indexes for fungal growth according to methanol and ethanol concentrations

Table 2

Comparisons between OTA produced by the two fungal isolates in samples (in presence of alcohols) and in controls

List of figures

Fig. 1. Colonies diameters of two isolates of *A. carbonarius* *Mu243* and *A. carbonarius* *G731* versus time according to different concentrations of methanol and ethanol ranged between 0 and 5%.

Fig. 2. Growth rates and ochratoxin A production by *A. carbonarius* *Mu243* and *A. carbonarius* *G731* versus methanol and ethanol concentrations.

CHAPITRE IV.

PROCEDES BIOLOGIQUES DE DECONTAMINATION DE L'OCHRATOXINE A DANS LES MOUITS DE RAISIN

Introduction

L'ochratoxine A est un métabolite secondaire produit par des moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Il est parfois impossible d'éviter leur croissance qui est par ailleurs imprévisible. Celle-ci peut avoir lieu tout au long des maillon de la chaîne de production et selon les circonstances, de l'OTA est produite par ces moisissure et se retrouve dans le produit alimentaire. La décontamination serait alors très importante à mettre en œuvre pour pouvoir gérer le risque de la contamination à l'OTA.

Jusqu'à présent, les procédés de décontamination relatés sont basés sur l'élimination physique, chimique ou biologique (Park *et al.*, 1993).

Au sein de la filière raisin, très restrictive dans sa réglementation vis-à-vis de l'usage de certains produits chimiques ou l'introduction de certains microorganismes, très peu de méthodes ont été proposées. Parmi les méthodes physiques, l'utilisation de l'irradiation γ sur des raisins de table a permis de diminuer la charge fongique et la quantité d'OTA à une dose de 5 KGy (Stander, 1985).

L'utilisation de certains procédés chimiques tel que l'ozone (agent antimicrobien très puissant) sur du raisin lors de sa conservation ou sur jus de raisin et vin a permis d'éliminer la flore fongique d'altération et de préserver leur qualité sanitaire (Aziz et Moussa, 2002).

Toutefois, cet agent chimique pourrait affecter la qualité des produits traités par oxydation de certains de leurs composants (Fournaud et Lauret, 1972; Rice *et al.*, 1982).

Les seuls traitements œnologiques testés, proposent l'utilisation du charbon actif (80 % d'élimination à une dose de 20 g/hL) (Dumeau et trioné, 2000; Castellari *et al.*, 2001; Rousseau et Blateyron, 2002) et des caséinates de potassium (82 % d'élimination à 150 g/hL). Ces traitements sont interdits sur le vin rouge et entraînent de plus une forte dégradation hautement préjudiciable sur sa qualité tant gustative que commerciale.

Tout au long de ce chapitre, nous présentons des processus biologiques de décontamination de l'OTA basés sur l'utilisation de certains microorganismes appartenant au biotope de la vigne ou d'usage courant dans les procédés de vinification.

Résultats

1. Elimination de l'OTA par les *Aspergillus* de la section Nigri

1.1. Dégradation

40 isolats d'*Aspergillus* de la section Nigri, 16 *A. carbonarius*, 15 *A. niger* aggrégats et 9 *A. japonicus*, ont été testés pour leur capacité à éliminer l'OTA en milieu CYB (CZAPEK Yeast extract Broth) et sur milieu simulant le jus de raisin (SGM) contaminés à 2 mg/L d'OTA.

Après 12 jours d'incubation à 25°C, on remarque une forte diminution de la teneur en OTA, encore plus importante dans le milieu SGM que dans le milieu CYB. La composition du SGM proche de celle de l'habitat naturel de ces microorganismes pourrait expliquer cette forte différence. Les isolats d'*A. niger* aggrégats sont ceux qui présentent les plus grandes capacités à éliminer la mycotoxine des 2 milieux de cultures utilisés.

La comparaison des chromatogrammes CLHP des témoins (culture sans OTA en présence du champignon) et des essais (culture avec de 2 mg/L d'OTA), montre que les *Aspergillus* de la section Nigri sont capables de métaboliser l'OTA en un produit de dégradation l'OT α .

Trois isolats *A. carbonarius* SA332, *A. niger* GX312 et *A. japonicus* AX35 sont choisis pour réaliser des cinétiques de dégradations sur milieu SGM. Quelque soit l'espèce testée, un même métabolisme de dégradation a été observé. Alors que l'OTA diminue dans le milieu, l'OT α augmente et ce n'est qu'au 22^{ème} jour de culture qu'une réduction de la quantité d'OT α est observée et qu'il y a apparition d'un nouveau produit non encore identifié qu'on a appelé arbitrairement HE.

1.2. Adsorption

Pour cette expérimentation, un milieu SGM contaminé à 2 mg/L d'OTA estensemencé par les trois précédents isolats d'*Aspergillus* noirs (*A. carbonarius* SA332, *A. niger* GX312, *A. japonicus* AX35) à une concentration 10 fois plus importante que celle adoptée dans les expériences précédentes.

Dés l'inoculation du milieu par les spores nous observons une élimination instantanée de l'OTA du milieu. Cette élimination est de 10 % pour *A. niger*, 28 % pour *A. japonicus* et 45 %

pour *A. carbonarius*. Aucun produit de dégradation n'est détecté jusqu'à 30 heures pour *A. niger* et *A. carbonarius* et 14 heures pour *A. japonicus*. Cette élimination est d'autant plus importante que les concentrations en spores sont élevées. Dans un jus de raisin naturel contaminé à deux concentrations en OTA (2 mg/L et 10 µg/L) etensemencé par des spores mortes après traitement à la chaleur, on observe ce même phénomène d'élimination instantané de l'OTA et parfois même de façon plus importante que les spores vivantes.

L'appréciation spectrophotométrique de la couleur du jus après introduction des spores montre que les espèces *A. niger* et *A. japonicus* préservent le plus la couleur du jus par rapport à l'espèce *A. carbonarius*.

L'élimination rapide de l'OTA après inoculation du milieu de spores mortes ou vivantes et l'absence de sous produits de dégradation montrent qu'il s'agit d'un phénomène passif et non pas d'une métabolisation de la toxine. Cette élimination pourrait ainsi être une adsorption. Les spores dormantes, gonflées ou germées pourraient assurer cette adsorption.

En se référant aux propriétés physico-chimiques de l'OTA et de la surface des spores, cette adsorption pourrait être le fruit d'une interaction hydrophobe ou d'une attraction entre charges opposées entre l'OTA et la surface des spores.

Ce phénomène d'adsorption jamais évoqué au niveau de la bibliographie, pourrait être intéressant pour l'élimination de l'OTA dans les moûts.

2. Elimination de l'OTA par des microorganismes de l'environnement vinicole

Des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *S. bayanus* et des bactéries lactiques *Oenococcus oeni*, flore d'intérêt technologique lors des fermentations œnologiques, sont testées respectivement sur des milieux liquides YPG et MRS pour leurs capacités à éliminer l'OTA. Pour les levures et les bactéries le même test est également mené sur le milieu simulant le jus de raisin (SGM). Tous ces milieux sont initialement contaminés à une concentration de 2 mg/L d'OTA.

La bactérie lactique *Oenococcus oeni* parvient à éliminer 21 et 27 % de l'OTA initialement introduite. Plusieurs types de bactéries lactiques mentionnées dans la littérature possèdent également la capacité à éliminer l'OTA, telles que: *Lactobacillus acidophilus* dans le yaourt et sur milieu MRS (Skinjar *et al.*, 2002; Piotrowska et Zakowska, 2002a), *Lactobacillus plantarum*, *L. sanfrancisco* et *L. brevis* testés sur une pâte boulangère (Piotrowska et Zakowska, 2002a et 2002b).

Dans nos expériences, de l'OT α est détectée dans le milieu indiquant que la bactérie lactique a dégradé l'OTA.

Pour les levures, les potentiels d'élimination de l'OTA sont variables. Cependant aucun produit de dégradation n'est présent. L'utilisation de ces mêmes levures après traitement à la chaleur montre une élimination instantanée de l'OTA atteignant 90 %. Ainsi, les levures *S. cerevisiae* et *S. bayanus* éliminent l'OTA par un processus d'adsorption.

La comparaison entre l'efficacité d'élimination de l'OTA par des levures traitées à la chaleur et des écorces de levures commerciales a été également réalisée. Les concentrations testées sont de 0,2 et à 6,7 g/L, correspondant respectivement aux teneurs maximales autorisées pour les écorces et à la quantité de levure présente en cuve en fin de la fermentation alcoolique. Ecorces de levure et levures traitées à la chaleur (HC) ont montré une élimination intéressante des teneurs en OTA malgré la plus importante efficacité des cellules traitées à la chaleur.

Ainsi, l'utilisation des écorces en tant qu'agent activateur des fermentations alcooliques peut aussi contribuer à la baisse des teneurs en OTA dans les cuves de fermentation. Les levures vivantes présentes dans les cuves à une concentration de 6,7 g/L en fin de fermentation peuvent également diminuer les teneurs en OTA. Toutefois elles sont beaucoup moins efficaces que si elles sont traitées à la chaleur.

Conclusion

Les *Aspergillus* noirs, flore principale de l'environnement naturel de la vigne ainsi que les levures et les bactéries lactiques, microorganismes d'intérêt dans les processus technologiques de vinification peuvent soit adsorber soit dégrader l'OTA.

Les *Aspergillus* de la section Nigri, ochratoxinogènes ou pas ont un pouvoir important dans l'élimination de l'OTA présente dans des milieux synthétiques ou dans du jus de raisin naturel. Ce pouvoir doit être pris en considération dans le vignoble où les microorganismes ochratoxinogènes peuvent à la fois être la source de contamination et de décontamination de l'OTA et contribuer ainsi à gérer le risque de la présence de la toxine au sein de la filière. Le pouvoir adsorbant attribué aux espèces noires du genre *Aspergillus* contribue probablement à la baisse de la contamination des moûts contenant certainement une charge sporadique issue du vignoble.

La capacité des *A. niger* agrégats suivis des *A. japonicus* à éliminer de façon importante l'OTA par dégradation et par adsorption sans trop affecter la couleur des jus, le label GRAS discerné au premier et l'ochratoxingénicité du deuxième rarement évoquée dans la littérature, font de ces deux espèces un nouvel espoir dans la décontamination de l'OTA au sein de la filière.

Les levures et les bactéries lactiques, microorganismes d'intérêt œnologique, sont respectivement capables d'adsorber et de dégrader l'OTA. Si à l'état vivant, les levures pourraient abaisser les teneurs en OTA des moûts en fin de fermentation alcoolique, traitées à la chaleur, elles ont alors de bien meilleures capacités de décontamination.

Article 3:

Biodegradation of ochratoxin A by Nigri section *Aspergillus* species isolated from French grapes: a hope for OTA decontamination in grape juices and musts. Soumis à *FEMS Microbiology Letters*

Article 4:

Black aspergilli conidia: new biological adsorbent for ochratoxin A in grape juices. Soumis à *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Article 5:

Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. Accepté dans *Journal of Applied Microbiology*

Article 3:

Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a hope for OTA decontamination in grape juices and musts.

Hend Bejaoui^a, Florence Mathieu^a, Patricia Taillandier^b Ahmed Lebrihi^{a*}

Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS)

Département : Génie des Systèmes Microbiens.

^aENSAT/INPT: 1, Av. de l'Agrobiopôle BP32607, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, 31326, France

^bENSIACET/INPT: 5, rue Paulin Talabot, BP 1301, 31106 Toulouse Cedex 1, France

* Corresponding author. Tel.: 33562193944; fax: 33562193901.

E-mail address: lebrihi@ensat.fr (A. Lebrihi).

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a very dangerous mycotoxin frequently reported in different foods and beverages such as grapes, grape juices and wines. Detoxifying those products is then of prime importance to protect consumer health and biological approaches are the most promising. In this report, forty black aspergilli species (*Aspergillus carbonarius*, *A. niger* aggregate, *A. japonicus*) isolated on French grapes, were assessed for ochratoxin A degradation capacities in CZAPEK Yeast extract Broth (CYB) and in a Synthetic Grape juice Medium (SGM) contaminated with OTA at 2mg l^{-1} ($5\mu\text{M}$). It was clearly observed that in both media those fungi had OTA degradation ability to $\text{O}\alpha$. However, differences between media used and species tested during OTA degradation were noted. In SGM and CYB 77% and 45% of the isolates respectively able to degrade more than 80% of OTA. Despite a better growth on SGM, the specific OTA degradation was higher on CYB for most of the isolates. Kinetics studies carried out on SGM with 3 black aspergilli species showed different degradation rates of OTA. After 9 days of incubation, $\text{O}\alpha$ was decreased whereas an unknown compound appeared. *A. niger* could be the first interesting species for OTA detoxification processes followed by *A. japonicus*.

Key words: Detoxification; Ochratoxin A; Ochratoxin α ; Black aspergilli; Grape juice; Must

1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a very dangerous fungal secondary metabolite exhibiting nephrotoxic, immunosuppressive, teratogenic and carcinogenic properties [1]. It is produced by a number of ubiquitous molds of *Penicillium* and *Aspergillus* genera that contaminate agricultural commodities either before harvest or during storage [2,3]. Ochratoxin A is detected in different food products such as cereals [4], coffee [5], beer [6], dried vine fruits [7] grapes, grape juices and wines [8].

According to Codex Alimentarius Commission, 15% of the total intake of OTA is due to wine [9], that is also considered as the second major source of OTA intake after cereals [10]. Moreover, grape juices were shown to contain more OTA than some wines and so contribute to OTA intake by children [11]. OTA contamination in grapes and grape products could then be considered as a serious health problem. To understand the origin of this OTA

contamination, efforts were carried out in different countries, especially in the European ones, in order to strictly control it (Vth PCRD Project).

Prevention of OTA production and/or detoxification of those contaminated products are then of prime importance to protect consumer health [12]. Several physical and chemical methods have been proposed to remove mycotoxins [13]. Although some of those methods could be promising (ozone [14], alkaline hydrogen peroxide [15], Gamma irradiation [16]), others are not recommended for practical decontamination (hypochlorite treatment [17], ammoniation [18], heat treatment [19]). Biological approaches have now being widely studied [20], but none of them were especially focused on grape juices decontamination.

According to studies done in French vineyards, black aspergilli were the main microorganisms belonging to the biotop of grapes and colonizing berries from setting to harvest [21]. Our objective in this work was to do a large screening on black aspergilli isolated on French grapes, in order to see their capacity to degrade OTA in a laboratory medium (CYB) and for the first time in a simulating grape juice one (SGM).

Kinetics of OTA and of its degradation metabolites as well as comparisons between OTA degradation profiles by *A. carbonarius*, *A. niger* and *A. japonicus* in SGM were achieved for the first time during this survey.

2. Materials and methods

2.1. Isolates

Forty fungi belonging to three species of black aspergilli (*Aspergillus carbonarius*, *A. japonicus* and *A. niger*) isolated on French grapes were used.

2.2. Culturing media

For fungi isolates both a modified CZAPEK Yeast extract Broth medium (CYB) and Synthetic Grape juice Medium (SGM) were used.

Synthetic grape juice (SGM) was prepared by dissolving: 70g glucose D(+) (Fisher Labosi), 30g fructose(D-) (Sigma), 7g tartaric acid (L-) (Rectapur-Prolabo), 10g malic acid (L-) (Fisher Labosi), 0.67g (NH₄)₂HPO₄ (Prolabo-Rhône Poulenc), 0.67g KH₂PO₄ (Acros), 1.5g MgSO₄·7H₂O (Acros), 0.15g NaCl (Fisher Labosi), 0.15g CaCl₂ (Acros), 0.0015g CuCl₂ (Prolabo), 0.021g FeSO₄·7H₂O (Riedel-de Haën), 0.0075g ZnSO₄·7H₂O (Fisher Labosi) and 0.05g hydrated catechin (Sigma); in 1 l distilled water and the pH was adjusted at 3.8-4.0 with KOH 2N.

A modified CZAPEK Yeast extract Broth medium (CYB) was prepared by dissolving: 30g: saccharose; 5g: yeast extract; 50 ml: solution A ((for 500 ml) (NaNO₃:20g; KCl:5g; MgSO₄.7H₂O: 5g; FeSO₄.7H₂O:0.1g)); 50 ml: solution B((for 500 ml): K₂HPO₄:10g); 1 ml: solution C ((100 ml): ZnSO₄.7H₂O:1g, CuSO₄.5H₂O: 0.5g:)) in one liter distilled water.

These laboratory media were supplemented with ochratoxin A at a concentration of 2mg l⁻¹ (5μM).

2.3. Fermentation conditions

The OTA degradation capacity was undertaken in 2 ml appropriate medium (CYB or SGM), under agitation (240 rpm), at 25°C, during 12 days. Each medium was inoculated at 1% from a conidial suspension (10⁷ conidia ml⁻¹). Final dry weight was determined using dried mycelium after centrifugation and was expressed in g l⁻¹. The specific OTA degradation capacity was calculated by dividing the total amount of degraded OTA by final dry weight (mg g⁻¹).

Kinetic studies of OTA degradation and OTα production for three *Aspergillus* isolates (*A. carbonarius* SA332, *A. japonicus* AX35 and *A. niger* GX312) were conducted during batch fermentation in 20 ml of SGM media in Erlenmeyer flasks, at 25°C under agitation (240 rpm).

A negative control (control 1), an OTA contaminated medium without fungi, was used to calculate OTA removal percentage. A positive control (control 2), a fungal culture in a medium without OTA, was also used.

All assays were performed in triplicates.

2.4. OTA extraction

For all samples, after removal of fungal mycelium, 1 ml of supernatant was extracted twice with ethyl acetate (v/v), then evaporated until dry and dissolved in 0.5 ml of methanol before HPLC analysis.

2.5. Detection and quantification of OTA and OTα

OTA and OTα were detected and quantified by reversed-phase high performance liquid chromatography. The HPLC apparatus consisted of a solvent delivery system and fluorescence (λ_{ex} = 332 nm; λ_{em} = 466 nm) and UV detectors. The analytical column used was a 150 x 4.6 mm Uptisphere 5 μ C18 ODB fitted with a guard column of 10 x 4 mm. The

mobile phase consisted of a mixture of HPLC grade acetonitrile/water/acetic acid (100/99.8/0.2) at a flow rate of 1 ml min⁻¹ and the column temperature was at 30°C. Kroma 3000 (Biotek) was the data acquisition system. Injections were made with an autoinjector (BIO-TEK, Milan, Italy) and the injection volume was of 80µl. Ochratoxin A was identified by its retention time (33 min) according to a standard obtained from Sigma (Steinheim, Germany). OTα was identified at 17 min according to a standard prepared by total degradation of OTA by carboxypeptidase A (EC3.4.17.1) from bovine pancreas (Sigma, type II-PMSF). OTA and OTα were quantified by measuring the peak area and using standard solutions.

The OTA degradation percentage was calculated according to the following equation: $100 \times [1 - (\text{peak area of OTA} / \text{peak area of OTA in control})]$.

3. Results

3.1. Screening of *Aspergillus section Nigri* isolates for OTA detoxifying activity

Forty *Aspergilli* section *Nigri* (*Aspergillus carbonarius*, *A. niger* and *A. japonicus*) were tested for their ability to degrade OTA in both CYB and SGM. *A. carbonarius* isolates have been chosen due to their low OTA production, and *A. niger* and *A. japonicus* isolates because they were not ochratoxigenic. All these isolates cultured on both media (CYB and SGM) initially contaminated with OTA (2 mg l⁻¹) showed significant capacities to degrade the mycotoxin after 12 days of incubation time. For all those species OTα, an OTA degradation metabolite, was produced (data not shown). Figure 1 shows the percentage of OTA degradation for all isolates on both media. OTA degradation more frequently occurred in SGM than in CYB with respectively 77% and 45% of the isolates able to degrade more than 80% of OTA. In SGM, all isolates degraded at least 30% of OTA whereas in CYB some isolates could not at all decrease the initial concentration of mycotoxin. *A. niger* was the best one to degrade OTA, followed by *A. japonicus* and *A. carbonarius*. Nevertheless fungal growth was quite different on the two media. Specific OTA degradation was so calculated and shown in figure 2. Despite a better growth on SGM, the specific OTA degradation was higher on CYB for most of the isolates.

3.2. Kinetics of ochratoxin A degradation by three isolates of *Aspergillus section Nigri* species on SGM.

Kinetics of OTA degradation by one isolate from each species arbitrary chosen : *A. carbonarius* SA332, *A. niger* GX312 and *A. japonicus* AX35, were examined in OTA (5µM) SGM (fig 3).

Regardless of the species tested, OTA was degraded and hydrolysed to OTα. After the ninth day of incubation, the amounts of OTα decreased and an unknown compound appeared (data not shown). Particularities in kinetics for each species are noteworthy. In fact, during the first three days of incubation, *A. niger* degraded OTA relatively slowly (20%) compared to *A. carbonarius* (55%) and *A. japonicus* (80%). However, after the third day, OTA degradation by *A. niger* became the most rapid and reached 99% after 5 days. At this time, *A. carbonarius* and *A. japonicus*, reduced OTA from 83% and 89% respectively.

4. Discussion

In this study, we examined the OTA degrading activities of 40 isolates of black aspergilli on 2 media, CYB and SGM. OTA removal was observed for almost all black aspergilli isolates and degradation levels reached in some cases 98-99%.

Regardless of the species, OTA was hydrolysed to OTα, which has lower toxicity [22]. This OTA metabolism was previously observed for different microorganisms like protozoa (in gastrointestinal tracts of ruminants) [23,24], bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* [25], *Phenylobacter immobile* [26], and fungi *A. niger* [27,28] and black aspergilli isolated on Portuguese grapes [29]. Differences between OTA degradation capacities were observed between the species and for the same isolate depending on the medium. The higher OTA degradation always obtained in SGM than in CYB can be attributed to the better fungal growth in SGM. The nearest composition of SGM to grapes, the natural habitat of black aspergilli, could be an important factor to fungal development. A carboxypeptidase, previously found to be able to hydrolyse OTA to OTα [30], may be involved in OTA degradation. However, no data could be found in literature about this enzyme characterization for black aspergilli. To explain the higher specific degradation activity observed in CYB, 2 hypothesis could be done. Firstly, a higher quantity of enzyme is synthesized by fungal cells in CYB. Secondly, in case of an extracellular enzyme, this medium is more favourable to a greater activity.

In view of potential application of *Aspergillus* sp. for biological decontamination of grape juice, kinetics studies were performed in SGM. For the 3 species, OTA was totally degraded in OTα, but with different profiles. Despite of the initial lag phase *A. niger* was the quicker species : in 5 days 99% of OTA has been degraded. For a total OTA degradation, this

species could be interesting. In the case where a partial degradation is wished the species *A. carbonarius* or *A. japonicus* could be used to reduce OTA concentration under the legal limit ($2 \mu\text{g l}^{-1}$).

The three species of black aspergilli were then able to degrade OTA to an unknown compound that could be probably due to an attack of the isocoumarin ring as previously reported by Galtier and Alvinerie [23]. However this pathway is still unknown.

Although Hwang and Draughon [25] found that *A. niger* was unable to degrade OTA, Varga et al. [28] and Abrhunosa et al. [28] found among these species isolates able to decrease OTA amounts in initially contaminated media. These last results are consistent with ours; in both studies all isolates have been obtained from grapes. Furthermore the species *A. niger* was one of the few fungi, which has received the GRAS status from the U.S. Food and Drug Administration (due to its low toxigenicity) and could then be interesting to further uses in biological elimination of OTA in grape juices and musts. However, *A. japonicus* frequently used in fungal biotechnology could also be of interest as it has been reported as ochratoxigenic only 2 times [31,32]. Our isolate exhibited a potential degradation capacity as interesting as *A. niger*.

Acknowledgement

This work was supported by grants from the European Union (QLK1-CT-2001-01761) and French “Ministère de la jeunesse de l'éducation et de la recherche” (AQS N°:02 PO571).

References

- [1] Smith, J. E. and Moss, M.O. (1985) Mycotoxins. Formation and significance. Wiley, Chichester.
- [2] Moss, M. O. (1996) Mode of formation of ochratoxin A. Food Addit. Contam. 135, 5-9.
- [3] Galtier, P. (1999) Biotransformation and fate of mycotoxins. J. Toxicol-Toxin. Rev. 18, 295-312.
- [4] Jorgensen, K., Rasmussen, G. and Thorup, I. (1996) Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. Food Addit. Contam. 13, 95-104.
- [5] Pittet, A., Tornare, D., Huggett, A. and Viani, R. (1996) Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column clean-up procedure. J. Agr. Food Chem. 44, 3564-3569.

- [6] Visconti, A., Pascale, M. and Centonze, G. (2000) Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 888, 321-326.
- [7] Mac Donald, S., Wilson, P. Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E. and Shepherd, M., J. (1999) Ochratoxin A in dried vine fruit: Method development and survey. *Food Addit. Contam.* 16, 253-260.
- [8] Zimmerli, B. and Dick, R. (1995) Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and swiss data. *J. Chromatogr. B* 666, 85-99.
- [9] Anonymous (1999) Position paper on ochratoxin A, Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Thirty-first session, The Hague, The Netherlands, 22-26 March 1999, CX/FAC 99/14.
- [10] Anonymous (1998) Opinion on ochratoxin A. European Commission DG XXIV, CS/CNTM/MYC14.
- [11] Zimmerli B and Dick R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13, 655-668.
- [12] Anonymous (1997) Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Revised position Paper on Ochratoxin A. CX/FAC, 98/16.
- [13] Sinha, K. K. (1998) Detoxification of mycotoxins and food safety. In: *Mycotoxins in Agriculture and food Safety*; Sinha, K. K., Bhatnagar, D., Eds., Marcel Dekker: New York, pp381-406.
- [14] McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., Norred, W. P., Voss, K. A., Plattner, R. D., Kubena, L. F. and Philips, T. D. (1997) Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem. Toxic.* 35, 807-820.
- [15] Foulter, S. G., Trivedi, A. B. and Kitabatake, N. (1994) Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. *J. AOAC Int.* 77, 3, 631-637.
- [16] Refai, M. K., Aziz, N. H., El-Far, F. and Hassan, A. A. (1996) Detection of ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* in feedstuffs and its control by γ -radiation. *Appl. Radiat. Isotopes* 47, 617-621.
- [17] Castegnaro, M., Berek, J., Freymy, J. M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, E. G. and Telling, G. M. (1991) Laboratory decontamination and destruction of carcinogens

in laboratory wastes: some Mycotoxins, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- [18] Chelkowski, J., Szebiotko, K., Golinski, P., Bachowski, M., Godlewska, B., Radomyrska, W. and Wiewiorowska, M. (1982) Mycotoxins in cereal grain .5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Nahrung* 26, 1-7.
- [19] Boudra, H., Le bars, P. and L Bars, J. (1995) Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1156-1158.
- [20] Sweeny, M. J. and Dobson, A. D., W. (1998) Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 141-158.
- [21] Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A. (2005) Fungal flora and ochratoxin A production during wine grape maturation in French vineyards during three years. *Int. J. Food Microbiol.* (in press).
- [22] Harwig, J. (1974) Ochratoxin A and related metabolites. In : Purchase, I. F. H. (Ed.), *Mycotoxins*, Elsevier, Amsterdam, pp. 345-367.
- [23] Galtier, P. and Alvinerie, M. (1976) In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbiol microflora. *Ann. Rech. Vet.* 7, 91-98.
- [24] Hult, K., Teilling, A. and Gatenbeck, S. (1976) Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 443-444.
- [25] Hwang, C. A. and Draughon, F. A. (1994) Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Food Protec.* 57, 410-414.
- [26] Wegst, W. and Lingens, F. (1983) Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiol. Lett.* 17, 341-344.
- [27] Xiao, H., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A. and Ling, Y. Z. (1996) Metabolites of ochratoxins in rat urine and in culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 648-655.
- [28] Varga J, Rigó K and Téren J (2000) Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* 59:1-7.
- [29] Abrunhosa, L., Serra, R. and Venancio A. (2002) Biodegradation of ochratoxin A by Fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 25, 7493-7496.
- [30] Deberghes, P., Betbeder, A. M., Boisard, F., Blanc, R., Delably, J. F., Krivobok, S., Steiman, R., Seigle-Murandi, F. and Creppy, E. E. (1995) Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycotoxin Res.* 11, 37-47.

- [31] Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, A. T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z. (2003) Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *J. Food Protec.* 66, 633-636.
- [32] Dalcerro, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiachiera, S. M., Palacio, G., Rosa, C. A. R. (2002) Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Add. Contam.* 19, 1065-1072.

Appendix

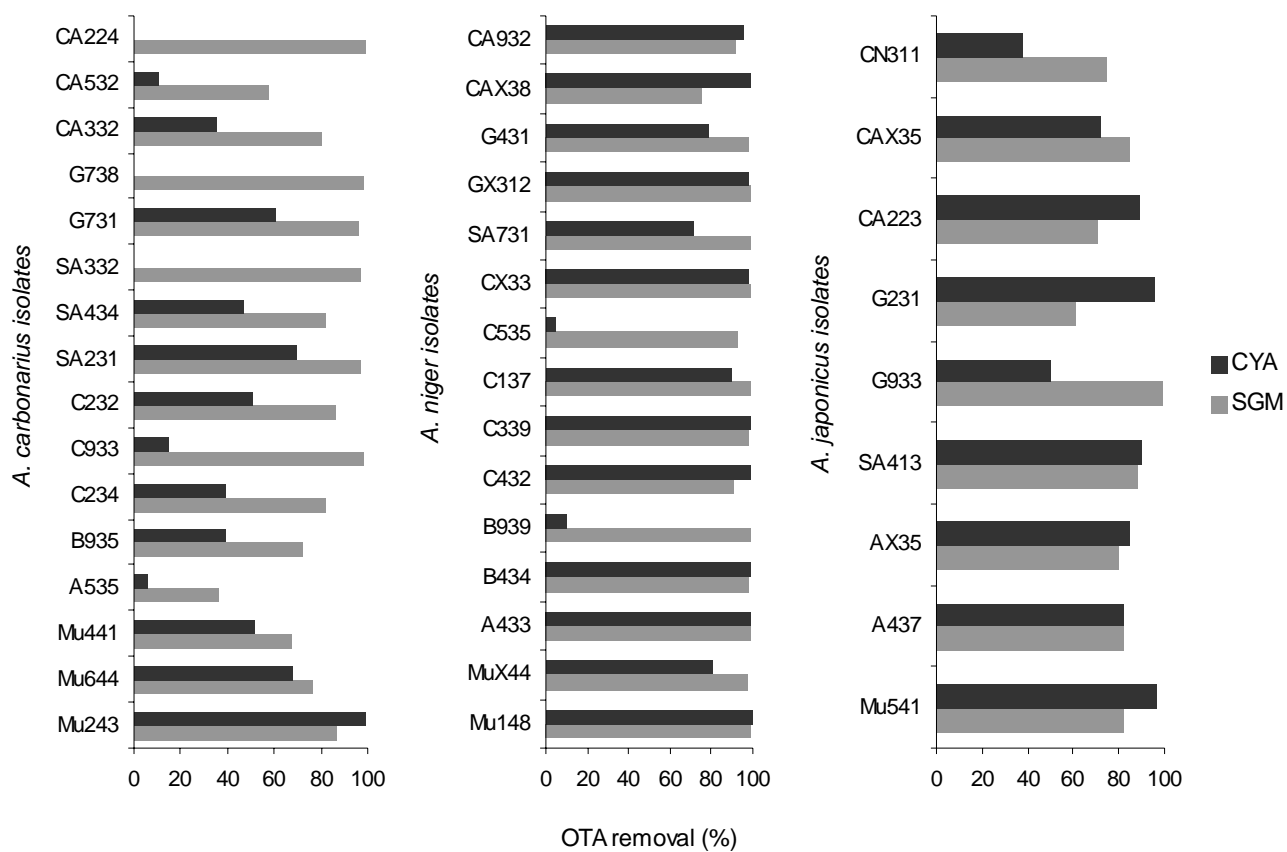


Fig. 2

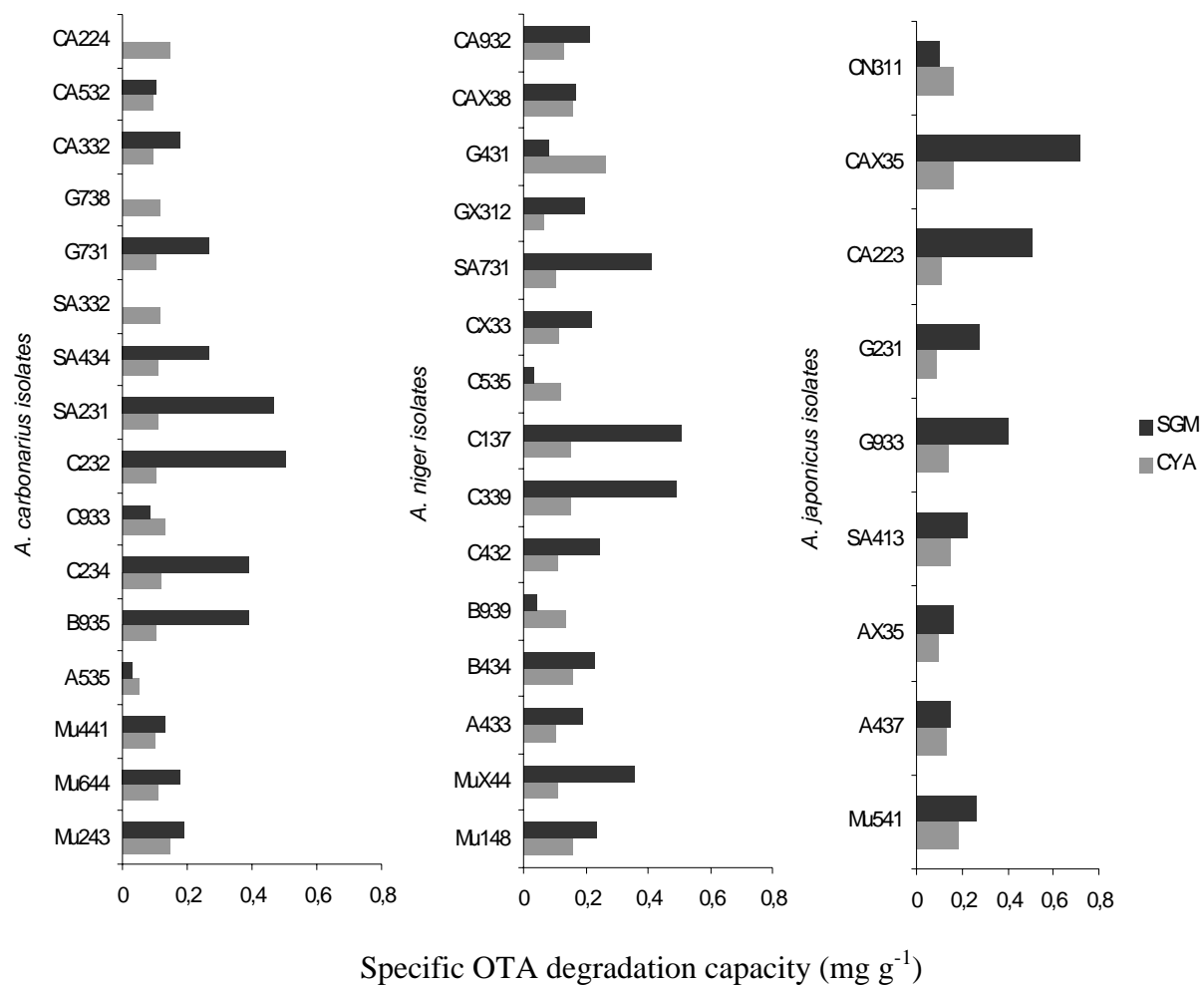
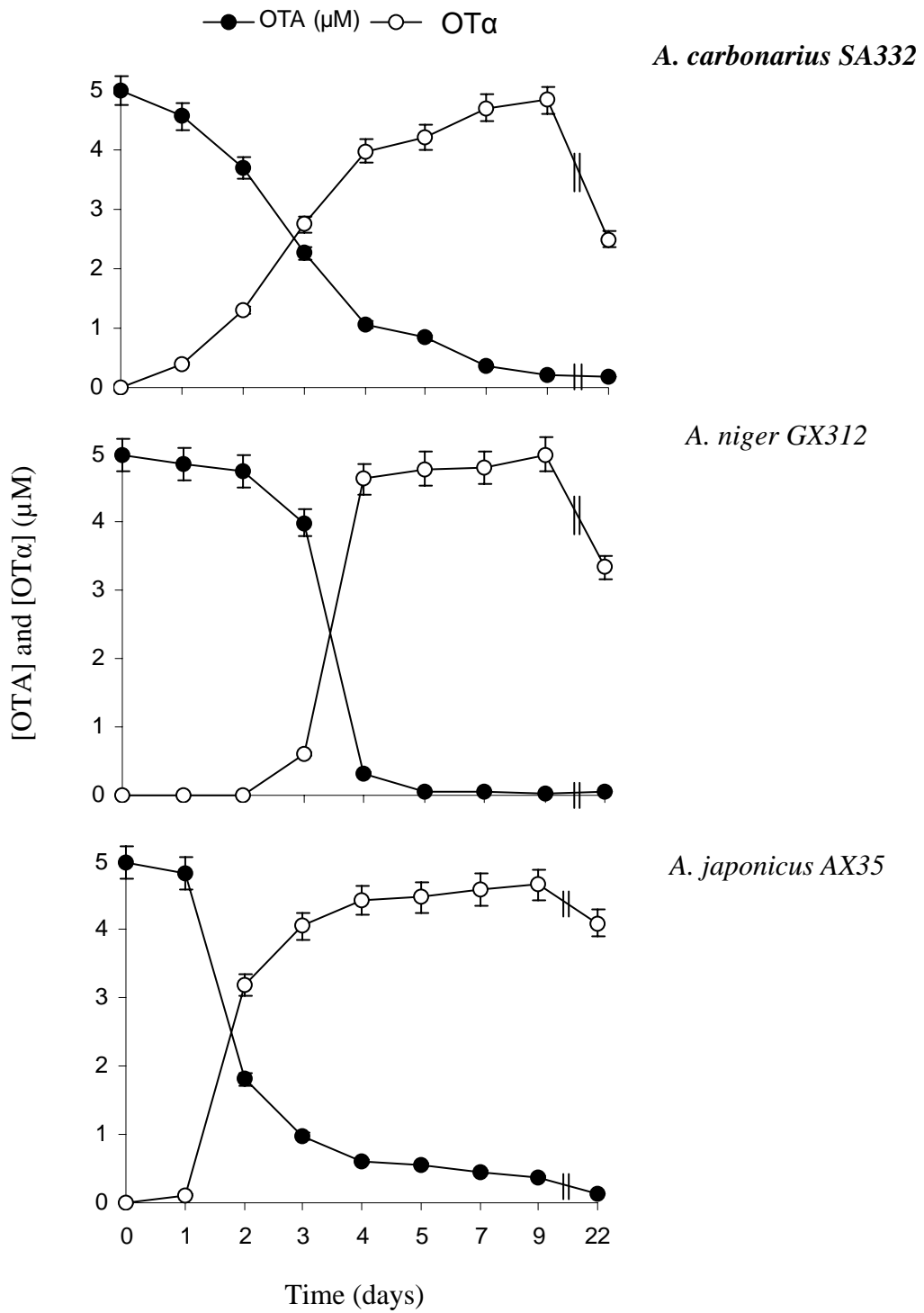


Fig. 3



List of figures

Figure 1. OTA removal (%) by the 40 isolates of black aspergilli species (*Aspergillus carbonarius*, *A. niger* and *A. japonicus*) in CYB and SGM initially contaminated at 2mg l⁻¹.

Figure 2. Specific OTA degradation activity (mg g⁻¹) of 40 isolates of black aspergilli (*Aspergillus carbonarius*, *A. niger* and *A. japonicus*) in CYB and SGM initially contaminated at 2mg l⁻¹.

Figure 3. Kinetics of OTA and OTa in presence of *A. carbonarius*, *A. niger* and *A. japonicus* on SGM containing initially 5 µM OTA.

Article 4:

Conidia of black aspergilli as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts

H. BEJAOU^a, F. MATHIEU^a, P. TAILLANDIER^b and A. LEBRIHI^{a*}

Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS)

Département : Bioprocédés et Systèmes Microbiens

^aENSAT/INPT: 1, Av. de l'Agrobiopôle BP32607, Auzeville-Tolosane,
Castanet-Tolosan, 31326, France

^bENSIACET/INPT: 5, rue Paulin Talabot, BP 1301, 31106 Toulouse Cedex 1, France

* Corresponding author. Telephone: 05 62 19 39 44. Fax: 05 62 19 39 01. E-mail:
lebrihi@ensat.fr

ABSTRACT

Biological removal of ochratoxin A (OTA) by living and heat-treated dead conidia of black *Aspergillus* isolates representing the species *Aspergillus niger*, *A. carbonarius* and *A. japonicus* in synthetic and natural grape juices was found to be a two-stage phenomenon. Several lines of evidence suggest that the first observed stage was passive, metabolism was not required and OTA adsorption on conidia of black aspergilli could be involved. This removal was fast, without delay just after conidial inoculation both in synthetic and natural grape juices. Moreover, even non-viable, heat-treated conidia were capable of removing OTA. Finally, no OTA degradation products were detected. In the second observed stage, removal of OTA was linked to degradation by live conidia only. Ochratoxin alpha, a degradation product of OTA was detected in the medium after incubation for 30 and 14 hours for biseriate (*A. niger* and *A. carbonarius*) and uniseriate (*A. japonicus*) black aspergilli, respectively when well-developed mycelium appeared. Comparisons between the three black *Aspergillus* isolates tested showed that *A. carbonarius* detoxified grape juice most effectively. However, this species often produces OTA. *A. niger* and *A. japonicus* isolates were also effective and because those species are not systematically OTA producers, they could be interesting for further OTA detoxification processes in grape juices and musts.

KEYWORDS: ochratoxin A; conidia of black aspergilli; *Aspergillus niger*; *Aspergillus japonicus*; *Aspergillus carbonarius*; adsorption; detoxification; grape juices; musts

INTRODUCTION

Ochratoxin A (OTA) is a naturally occurring secondary metabolite of mould fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* genera (1,2). It is affecting agricultural products all over the world and causing harmful effects on human and animal health due to its highly toxic properties (mutagenic, teratogenic, carcinogenic) (3,4). The presence of OTA in grapes and grape products was reported for the first time in 1995 (5). Since then, different studies were undertaken to understand this contamination origin over the world and also in France (6). Several studies (6, 7, 8, 9) showed that *Aspergillus* section Nigri isolates (*A. carbonarius*, *A. niger* and *A. japonicus*) are thought to be the primary source of OTA in grapes, especially *A. carbonarius*. Wines are considered as the second major source of OTA intake after cereals (10) and grape juices are shown to contain more OTA than some wines and so contribute to OTA intake by children (8). Recently, the OTA limit in wine (2 µg/L) is defined by the Commission Regulation (EC) N° 123/2005, of January 2005, amending Regulation (EC) N° 466/2001 as regards ochratoxin A. So, methods for OTA detoxification are highly needed for

compliance with tolerances and guidelines to protect consumer health. Different attempts have been made to find measures to combat this mycotoxin. Physical, chemical and biological methods were studied (12), but few of these have practical applications. Some are targeting to degrade OTA in different laboratory media, while some others tried to adsorb it. Different microorganisms belonging to grapes microbiota such as *Aspergillus* section Nigri isolates were reported as able to degrade OTA (13-15), whereas both chemical (fining agents (16)) and biological agents (heat treated yeasts (17)) had the capacity to adsorb it. Although some of those adsorbents could be of interest (17) some others have little effect on the removal of OTA and in many cases the quality of wines is severely damaged (16,18).

For the first time the capacity of conidia of black *Aspergillus* isolates to adsorb ochratoxin A in both synthetic and natural red grape juices was evaluated. Kinetics of OTA removal and OT α production were done during this survey to clarify the mechanism of OTA removal/degradation by conidia of black aspergilli. Grape juice quality related to colour after conidial inoculation was also assessed.

MATERIALS AND METHODS

Strains. Three *Aspergillus* section Nigri isolates, *Aspergillus carbonarius* SA332 (IMI388497) *A. japonicus* AX35 (IMI389197) and *A. niger* GX312 (IMI388497) isolated on French grapes were used. Identification of different strains of black aspergilli was made using macroscopic and microscopic morphological criteria in accordance with appropriate keys (19-22). They were preserved at the Culture Collection of CABI BIOscience (London, UK). According previous study, *A. carbonarius* SA332 is known to be a weak OTA producer, while *A. niger* GX312 and *A. japonicus* AX35 to be not.

Culturing media. A synthetic grape juice medium (SGM) (23, 24) and a natural commercial red one were used.

Synthetic grape juice (SGM) was prepared by dissolving: 70 g glucose D(+) (Fisher Labosi (Elancourt cedex, France)), 30g fructose (D-) (Sigma (Saint Quentin Fallavier, France)), 7 g tartaric acid (L-) (Rectapur-Prolabo (Paris, France)), 10 g malic acid (L-) (Fisher Labosi), 0.67 g (NH₄)₂HPO₄ (Prolabo-Rhône Poulenc (Paris, France)), 0.67 g KH₂PO₄ (Acros (Geel, Belgium)), 1.5 g MgSO₄·7H₂O (Acros), 0.15 g NaCl (Fisher Labosi), 0.15 g CaCl₂ (Acros), 0.0015 g CuCl₂ (Prolabo (Paris, France)), 0.021 g FeSO₄·7H₂O (Riedel-de Haën (Seelze,

Germany)), 0.0075 g ZnSO₄·7H₂O (Fisher Labosi) and 0.05 g hydrated catechin (Sigma); in 1 L distilled water and the pH was adjusted at 4 with KOH 2N.

SGM was supplemented with OTA at 2 mg/L, while grape juice was contaminated at two concentrations of 2 mg/L and at 10 µg/L.

Preparation of spore suspensions. Living spores of the three *Aspergillus* section Nigri isolates were obtained from mycelium grown on CZAPEK Yeast extract Agar (CYA) medium, at 25°C, aged 7 days. Before use, spores were carefully washed with physiological water to remove any contaminants. Dead conidia were obtained through boiling living spores in distilled water for 15 minutes.

Adsorption and degradation conditions. Kinetic studies of OTA adsorption, OTA degradation and OTα production were performed for the three *Aspergillus* section Nigri isolates, *A. carbonarius* SA332, *A. japonicus* AX35 and *A. niger* GX312, in 20 mL of SGM containing 2mg/L of OTA, at 25°C, under agitation (240 rpm). As control to calculate OTA removal percentage, we used SGM containing 2mg/L of OTA and inoculated with a water blank without conidia. So this dilution was not significant. All assays were performed in triplicates.

Effect of initial conidial concentration on OTA removal was conducted with *A. japonicus* in SGM containing 2mg/L of OTA. Four different conidial concentrations, 10⁴, 10⁶, 10⁷, and 10⁸ conidia/mL were chosen.

The OTA removal capacity of the three *Aspergillus* section Nigri isolates was undertaken in 20 mL of synthetic and natural red grape juices. Each medium was inoculated with conidial suspensions of each isolate to give a concentration of 10⁷ conidia/mL.

For all samples, after removal of conidia or fungal mycelium, 1 mL from each supernatant was filtered (0.22 µm) and without previous clean-up step analysed by HPLC.

Conidial germination. During adsorption studies in SGM inoculated with the three *Aspergillus* section Nigri isolates, conidial germination was followed (NIKON Eclipse Microscope E600) and photos were taken at 7, 11, 14, 20 and 24 h of incubation time to determine the physiological state of spores. Photos were analysed by the image program VISILOG 5 (NOESIS, Quebec, Canada) to follow conidial germination.

Colour of red grape juice. To assess the tint of the red grape juice before and 5 minutes after introducing fungal conidia, the optical density (OD) was measured at 420 nm (OD_{420}) and at 520 nm (OD_{520}). The tint (T) was determined by the ratio of OD_{420} to OD_{520} ($T = OD_{420}/OD_{520}$) (25).

Detection and quantification of OTA and OT α OTA and OT α were detected and quantified by reversed-phase high performance liquid chromatography. The HPLC apparatus consisted of a solvent delivery system and fluorescence ($\lambda_{ex} = 332$ nm; $\lambda_{em} = 466$ nm) and UV detectors. The analytical column used was a 150 x 4.6 mm Uptisphere 5 μ C18 ODB fitted with a guard column of 10 x 4 mm. The mobile phase consisted of a mixture of HPLC grade acetonitrile/water/acetic acid (100/99.8/0.2) at a flow rate of 1 mL/min and the column temperature was at 30°C. Kroma 3000 (Biotek) was the data acquisition system. Injections were made with an autoinjector (BIO-TEK, Milan, Italy) and the injection volume was of 80 μ L. Ochratoxin A was identified by its retention time (33 min) according to a standard obtained from Sigma (Steinheim, Germany) and quantified by measuring the peak area. The detection limit was 0.025 μ g/L.

The OTA removal percentages were calculated according to the following equation: $100 \times [1 - (\text{peak area of OTA}/\text{peak area of OTA in control})]$. OT α was identified at 17 min according to a standard prepared by total degradation of OTA by carboxypeptidase A (EC3.4.17.1) from bovine pancreas (Sigma, type II-PMSF). OTA and OT α were quantified by measuring the peak area and using standard solutions.

Statistical analysis. All analysis were done in triplicate. SPSS (Headquarters (Chicago, Illinois, USA)), version 11.5.1, for windows was used for the statistical analysis of the data. Significant differences in the mean values were reported at P values of <0.05 .

RESULTS

Ochratoxin A removal in synthetic grape juice (SGM). A synthetic grape juice, initially contaminated with OTA at 2 mg/L, was inoculated with three *Aspergillus* section Nigri isolates, *Aspergillus niger*, *A. japonicus* and *A. carbonarius* at a concentration of 10^7 conidia/mL. It was incubated at 25 °C under agitation and samples from SGM were taken over 57 hours. **Figure 1** represents OTA removal and OT α production versus time for each species tested. Just after conidia of black aspergilli introduction in SGM and well mixing,

decreases in OTA amounts were instantly observed for the three *Aspergillus* section Nigri isolates. Those decreases were about 10% for *A. niger*, 28% for *A. japonicus* and 45% for *A. carbonarius*. Until 30 hours for *A. niger* and *A. carbonarius* and 14 hours for *A. japonicus*, no OTA degradation products were observed. OTA was only detected beyond those times. For two *Aspergillus* section Nigri isolates, *A. japonicus* and *A. carbonarius*, slight increases in OTA amounts were also sometimes observed could indicate a partial release of this mycotoxin in the medium.

Among the three *Aspergillus* section Nigri isolates tested in this study, *A. japonicus* was selected to test the effect of initial conidial concentration (10^4 , 10^6 , 10^7 and 10^8 conidia/mL) on OTA removal from SGM (**Figure 2**). We noted that the higher concentration of conidia introduced in the medium was, the greater the OTA removal. Thus, with 10^4 conidia/mL, OTA adsorption was of 15% to reach 75% with 10^8 conidia/mL.

Conidial germination. OTA adsorption surveys in SGM permit us to observe the physiological states of conidia of *A. carbonarius*, *A. niger* and *A. japonicus* (photos not shown). At 14 hours, conidia of *A. carbonarius* and *A. niger* could either be in a dormant state, swollen or have a germ tube. For conidia of *A. japonicus*, swelling and formation of germ tubes earlier began at around 11 hours. So beyond 11 hours for *A. japonicus* and 14 hours for *A. niger* and *A. carbonarius*, long hyphae were developed and aggregated forming dense fungal mycelium.

Ochratoxin A removal in a natural grape juice. The red natural grape juice used in this assay was contaminated at two different concentrations of OTA: 2 mg/L and 10 µg/L. Living and dead spores from three *Aspergillus* section Nigri isolates were inoculated in the grape juice at the concentration of 10^7 conidia/mL. Samples from grape juice were taken over two hours and analysed for OTA content.

According to the initial OTA concentration in the grape juice (2 mg/L or 10 µg/L) and to black *Aspergillus* isolates tested, differences between OTA adsorption patterns were noted (**Figure 3 and Figure 4**). As soon as conidia of black aspergilli were added to the grape juice contaminated at 2 mg/L (**Figure 3**), OTA was immediately adsorbed on living conidia. So, in a few second later, removal of OTA was already of around 30% by conidia of both *A. japonicus*, and *A. niger* and reached 55% by conidia of *A. carbonarius*. After this instantaneously adsorption, amounts of OTA were kept constant until 120 minutes. For heat-

treated conidia the same removal pattern was observed, but OTA removal was improved and was about 41.5 % for *A. japonicus*, 47.5 % for *A. niger* and 66.5 % for *A. carbonarius*.

For the grape juice contaminated with OTA at 10µg/L (**Figure 4**), OTA removal by living or heat-treated conidia of *A. japonicus* and *A. carbonarius* was instantly observed and reached around 80%. Then, OTA removal was kept constant till 120 minutes, except with heat-treated conidia of *A. carbonarius* on which OTA adsorption reached 96% after 75 minutes. A particular behaviour was observed with both living and heat-treated conidia of *A. niger*, especially in the first minutes. No immediately adsorption occurred on living conidia and only 15% on dead conidia. However, after 40 minutes OTA adsorption on living conidia was around 60% to reach 70% after 60 minutes. With heat-treated conidia, OTA adsorption was improved to 90% after 120 minutes.

We also determined the impact of conidia of black *Aspergillus* isolates on grape juice colour. The tint of the grape juice was assessed before and after introducing living fungal conidia. The tint of the control was about 1.18, whereas it was 1.46, 1.47 and 2.19 after addition of conidia of *A. japonicus*, *A. niger* and *A. carbonarius* respectively, indicating a darker colour of the red juice after addition of black conidia.

DISCUSSION

OTA adsorption studies on conidia of black aspergilli, in both synthetic and natural red grape juices contaminated at 2 mg/L and 10µg/L, showed that this is an instantaneous removal of OTA in many cases for the three *Aspergillus* section Nigri isolates, except for *A. niger* introduced in grape juice contaminated at 10 µg/L. No degradation product like OTα was detected during stages of conidial dormancy, swelling and germ tube but occurred over 30 hours for *A. niger* and *A. carbonarius* and 14 hours for *A. japonicus*. Heat-treated conidia were also able to remove OTA from the natural red grape juice. Those observations suggest that OTA removal is well an adsorption phenomenon. The OTA adsorption was little higher in natural red grape juice than in SGM. This could be related to the different composition of the two media. SGM is closed to grape juice at early veraison, hence would contain less sugar and more acid. Two different concentrations were tested, 10µg/L and 2mg/L. The first one is very closed to a concentration naturally present in some musts that needed biological detoxification. The second, 2 mg/L, obvious it was 1000-times greater than the 2 µg/L limit in wine, allowed, *in vitro*, to better understand the mechanism of OTA removal/degradation (i.e. easier detection of eventual degradation products) and to determine importance of

OTA/conidia ratio. Results showed that the efficacy of OTA adsorption was better with a small OTA/conidia ratio even in the case of the biggest conidia of *A. carbonarius*. OTA adsorption seems to be related both to the size and to the amounts of conidia. For *A. carbonarius* conidia, the biggest one, 10^7 conidia/mL adsorbed 50% of OTA versus only 30% with 10^7 conidia/mL of *A. japonicus*, the smallest. To increase the efficacy of *A. japonicus* conidia, it is necessary to increase the concentration to 10^8 conidia /mL.

To understand interactions involved in this adsorption, properties of both OTA and conidia surfaces should be described. According to the literature, mycotoxin binding was reported as function of their structural characteristics (26), their molecular size and their physico-chemical properties (16). OTA is a complex organic compound, consisting of chlorine containing dehydroisocoumarin linked through the 7-carboxyl group to 1- β -phenylalanine (27). Phenol and carboxyl are the main functional groups of this molecule (28) that could be involved in different adsorption mechanisms. First, OTA is considered with zearalenone as the less polar mycotoxins and could then be bound on hydrophobic surfaces (29) through the phenol group and via interactions of two- π -electron orbital (30). This was already shown for OTA adsorbents like hydrophobic transformed zeolites (31). Second, OTA acidic function is a weak acid with a pKa value for the carboxyl group of the phenylalanine moiety of 4.4 (32). OTA is then partially dissociated at pH 4.0 of grape juices and carries a positive charge introduced by the amine function (NH_3^+).

For conidia, and particularly the airborne types, a hydrophobic nature was reported (33). This hydrophobicity could be due to proteins called hydrophobins (34,35) or to lipids previously found on *Botrytis fabae* conidia (33). Negatively charged carbohydrates were also found on the surface of *Aspergillus fumigatus* conidia (36) Those properties has intervened in adhesion phenomena of living (37) or dead (38) conidia on different natural surfaces (roots (37), fruit cuticles (38))

According to all above properties reported in literature, adsorption phenomenon of OTA on conidia of black aspergilli could be related to hydrophobic interactions. The global positive charge of OTA molecule in acid media (grape juices) could also interact with negatively charged molecules found on fungal conidia. This interaction is likely to be non specific, as many conidia are able to bind non-specifically or without requiring chemical compounds.

According to some of our results, increases in OTA amounts were observed during the adsorption phenomenon. This could be a partial release of the initially bound mycotoxin. This release was also observed for *Fusarium oxysporum* conidia initially adsorbed on root surfaces (37) and during the adsorption of different metal toxicants on fungal conidia (39). Perhaps

conidial interactions were easily broken, as conidia adhesion was previously reported as a relatively weak attachment for *Botrytis cinerea* (38).

After OTA adsorption by conidia of black aspergilli, OTA degradation took place by well-developed mycelium after 14 hours for *A. japonicus* and 30 hours for both *A. niger* or *A. carbonarius*. Thus, OT α , an OTA degradation product, also observed in different previous studies (13,15), increased while OTA disappeared from the grape juice. So, two stages were involved in OTA detoxification by *Aspergillus* section Nigri isolates : adsorption then degradation. Commercially, the only stage very interesting is adsorption because it is fast, avoiding long time contact between fungi and grape juice. So potentially commercial OTA detoxification by using conidia of black aspergilli must be completed before the mycelium is well-developed and degradation starts. Indeed, production of degradation product like OT α even reported less toxic (40), still be harmful for consumer health. Moreover, degradation is useless for detoxification of grape juice in so far as by this stage, the fungus is actually using up all the grape sugars for its own growth. We also noted that even the difference between dead and live conidia was not so important, dead conidia consistently bound more OTA at 2mg/L. In view of commercially detoxification, dead conidia could also only be used to completely prevent germ tub formation and degradation phenomenon.

Among three *Aspergillus* section Nigri isolates tested, conidia of *A. carbonarius* were in many cases the most efficient in adsorbing OTA, regardless of the media used and the OTA concentration tested. In fact, conidia of *A. carbonarius* had the largest diameter (7-10 μm) compared to conidia of *A. niger* (3.5-4 μm) (41) and those of *A. japonicus* (5 μm) (19) and so presented higher surface to bind OTA. However, *A. carbonarius* could not be so interesting for practical detoxification, as it hardly severely deteriorated grape juice colour and because it is known to be particularly significant in the production of OTA on French grapes (6,42) but elsewhere (43-45). We noted that *A. japonicus* and *A. niger* conidia less deteriorated the grape juice colour than the *A. carbonarius* conidia. For *A. niger* and *A. japonicus*, OTA adsorption patterns were different according to the media used and to OTA concentrations tested. However, those two species could be interesting for OTA removal in grape juices and musts as the first has the GRAS label, and the second, frequently used in fungal biotechnology, has been reported as ochratoxigenic only a few times (7,46,47).and both of them less deteriorated grape juice colour than *A. carbonarius*.

Finally the risk of using conidia of OTA producing species in OTA detoxification process (i.e having both OTA production and degradation products like OT α in the medium to be

detoxified) could be drastically eliminated by using OTA non-producing species and dead conidia allowing dormancy state to be prolonged.

For a routinely use of conidia of black aspergilli for lowering OTA levels in grape juices, two points remains to be improved. The first is to do a treatment of spore to eliminate their black colour which affect final juice colour and second, to think about an immobilization of the spores to facilitate their use in industrial scale. OTA decontamination of wine by this process could be promising as so far as the efficiency of conidia of black aspergilli is demonstrated.

SAFETY

Ochratoxin A is a toxic compound that needs to be manipulated with care and with appropriate safety precautions. Decontamination procedures for laboratory wastes have been reported by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (48).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the European Union (QLK1-CT-2001-01761) and French “Ministère de la jeunesse de l’éducation et de la recherche” (AQS N°:02 PO571). The authors thank Patricia Nouvet for her technical assistance.

LITERATURE CITED

- (1) Krogh, P. Ochratoxins. In *Mycotoxins in human and animal health*; Rodricks, J. V., Hesseltine, C. W., Mehlman, M. A., Eds.; Pathox Publisher: Peoria, III, **1977**; pp 489-498.
- (2) Pitt, J. I. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 266-269.
- (3) Krogh, P. Causal associations of mycotoxic nephropathy. *Acta. Microbiol Scand Sect A.* **1978**, *269*, 1-28.
- (4) Kuiper-Goodman, T.; Scott, P. M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* **1989**, *2*, 179-248.
- (5) Zimmerli, B.; Dick, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. *J. Chromatogr. B* **1995**, *666*, 85-99.

- (6) Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. Fungal flora and ochratoxin A production during wine grape maturation in French vineyards during three years. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, (in press).
- (7) Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castella, G.; Cabanes, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2650-2652.
- (8) Bau, M.; Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Minues, S.; Cabanes, F.J. Ochratoxigenic species from Spanish wine and grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *98*, 125-130.
- (9) Cabanes, F.J.; Accensi, F.; Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Castella, G.; Minguéz, S.; Pons, A. What is the source of ochratoxin A in wine?. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *79*, 213-215.
- (10) Anonymous. Opinion on ochratoxin A. European Commission DG XXIV, CS/CNTM/MYC14 **1998**.
- (11) Zimmerli, B.; Dick, R. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* **1996**, *13*, 655-668.
- (12) Sinha, K. K. Detoxification of mycotoxins and food safety. In *Mycotoxins in Agriculture and food Safety*; Sinha, K. K.; Bhatnagar, D., Eds.; Marcel Dekker: New York, **1998**, pp 381-406.
- (13) Varga, J.; Rigó, K.; Téren, J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *59*, 1-7.
- (14) Abrunhosa, L.; Serra, R.; Venancio, A. Biodegradation of ochratoxin A by Fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7493-7496.
- (15) Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A. Ochratoxin A Removal By Microorganisms Isolated From Grape Or Used In Wine Making Process. V^{IIème} Symposium International d'œnologie, June 19-21, 2003, Bordeaux, France. In : *Œnologie 2003*, Eds. ; Lavoisier Tec et Doc, Paris, 2003, pp 685-687.
- (16) Castellari, M.; Versari, A.; Fabiani, A.; Parpinello, G. P.; Galassi, S. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption with chemical fining agents. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3917-3921.
- (17) 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.
- (18) Dumeau, F.; Trioné, D. Influence de différents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. *Rev. Fr. Oenol.* **2000**, *95*, 37-38.

- (19) Abarca, M.L.; Accensi, F.; Cano, J.; Cabanes, F.J. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, **2004**, *86*, 33-49
- (20) Klich, M.A.; Pitt, J.I. (Eds.) A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs CSIRO Division of Food Processing, North Ryde **1988**
- (21) Klich, M.A. (Eds.) Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Utrecht. **2002**
- (22) Pitt, J.I.; Hocking A.D. (Eds) Fungi and food spoilage. Blackie, London. **1997**
- (23) Mitchell, D.; Parra, R.; Aldred, D.; Magan, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 439-445
- (24) Belli, N.; Ramos, A. J.; Coronas, I.; Sanchis, V.; Marin, S. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *98*, 839-844
- (25) Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Glories, Y.; Meaujean, A. *Traité d'œnologie .2. Chimie du vin, stabilisation et traitements*, Edition n°. 5; Dunod, Paris, **1998**; p 207.
- (26) Schatzmayr, G.; Heidler, D.; Fuchs, E.; Binder, E. M. **2002**.
<http://www.freshpatents.com>.
- (27) Van Der Merwe, K. J.; Steyn, P. S.; Fourie, L. Mycotoxins Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.* **1965**, 7083-7088.
- (28) IARC. Ochratoxin A. In *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans : some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*; International Agency for Research on Cancer : Geneva, Switzerland, 1993; Vol 56, pp 26-32.
- (29) Santin, E.; Maiorka, A.; Krabbe, E. L.; Paulillo, A. C; Alessi, A. S. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on the prevention of the toxic effects of ochratoxin A. *J. Appl. Poult. Res.* **2002**, *11*, 22.
- (30) Furuya, E. G.; Chang, H. T.; Miura, Y.; Noll, K. E. A. Fundamental analysis of the isotherm for the adsorption of phenolic compounds on activated carbon. *Sep. Purif. Technol.* **1997**, *11*, 69-78.
- (31) Tomašević-Čanović, M.; Daković, A.; Rottinghaus, G.; Matijašević, S.; Duričić, M. Surfactant modified zeolites-new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous Mesoporous Mater.* **2003**, *61*, 173-180.

- (32) Valenta, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *J. Chromatogr. A* **1998**, *815*, 75-92.
- (33) Fisher, D. J.; Holloway, P. J.; Richmond, D. V. Fatty acid and hydrocarbon constituents of the surface and wall lipids of some fungal spores. *J. Gen. Microbiol.* **1972**, *72*, 71-78.
- (34) Boucias, D. G.; Pendland, J. C.; Latge, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1795-1805.
- (35) Chasan, R. Building hyphae in the air. *Plant Cell* **1991**, *3*, 1048-1050.
- (36) Wasylnka, J.A.; Moore, M. M. Adhesion of *Aspergillus* species to extracellular matrix proteins: evidence for involvement of negatively charged carbohydrates on the conidial surface. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 3377-3384
- (37) Recorbet, G.; Alabouvette, C. Adhesion of *Fusarium oxysporum* conidia to tomato roots. *Lett. Appl. Microbiol.* **1997**, *25*, 375-379.
- (38) Doss, R. P.; Potter, S. W.; Chastagner, G. A.; Christian, J. K. Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 1786-1791.
- (39) Miller, L. P. Binding and release of toxicants by fungus conidia. *Rev. Roum. Biol, série botanique.* **1966**, *11*, 143-14.
- (40) Harwig, J. Ochratoxin A and related metabolites. In: *Purchase*; I. F. H. Eds., *Mycotoxins*, Elsevier, Amsterdam, **1974**; pp. 345-367.
- (41) Pitt, J. I.; Hocking, A. D. *Fungi and food spoilage*, edition no. 2; Eds; Blackie Academic and Professional; Great Britain, **1997**; pp. 385-386.
- (42) Sage, L.; Garon, D.; Seigle-Murandi, F. Fungal mycoflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5764-5768
- (43) Horie, Y. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section Nigri. *Nippon Kingakukai Kaiho.* **1995**, *36*, 73-76.
- (44) Magnoli, C.; Violante, M.; Combina, M.; Palacio, G.; Dalcero, A. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section Nigri in wine grapes in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, *37*, 179-184.
- (45) Serra, R.; Abrunhosa, L.; Kozakiewicz, Z.; Venancio, A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *88*, 63-68.

- (46) Battilani, P.; Pietri, A.; Bertuzzi, A. T.; Languasco, L.; Giorni, P.; Kozakiewicz, Z. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *J. Food Protec.* **2003**, *66*, 633-636.
- (47) Dalcerro, A.; Magnoli, C.; Hallak, C.; Chiachiera, S. M.; Palacio, G.; Rosa, C. A. R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Add. Contam.* **2002**, *19*, 1065-1072.
- (48) Castegnaro, M.; Barek, J.; Fremy, J. M.; Lafontaine, M.; Miraglia, M.; Sansone, E. B.; Telling, G. M. Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory: Some mycotoxins. *IARC Scientific Publication no. 113*: International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, **1991**; p 63. JF025747I

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Ochratoxin A removal and ochratoxin α appearance during incubation of the three *Aspergillus* section Nigri isolates, *A. niger* GX312, *A. carbonarius* SA332, *A. japonicus* AX35 in SGM medium contaminated with OTA at 2 mg/L at a concentration of 10^7 conidia/mL. The amounts of OT α are relative to initial OTA concentrations.

Figure 2. OTA removal by *A. japonicus* AX35 in SGM (contaminated with OTA at 2mg/L) inoculated at different concentrations of live conidia (10^4 , 10^6 , 10^7 , and 10^8 conidia/mL).

Figure 3. OTA removal by living and dead conidia of the black aspergilli tested at 10^7 conidia /mL (*A. niger*, *A. japonicus* and *A. carbonarius*) in a natural red grape juice contaminated with OTA at 2 mg/L.

Figure 4. OTA removal by living and dead conidia of the black aspergilli tested at 10^7 conidia/mL (*A. niger*, *A. japonicus* and *A. carbonarius*) in a natural red grape juice contaminated with OTA at 10 μ g/L.

FIGURES

Figure 1

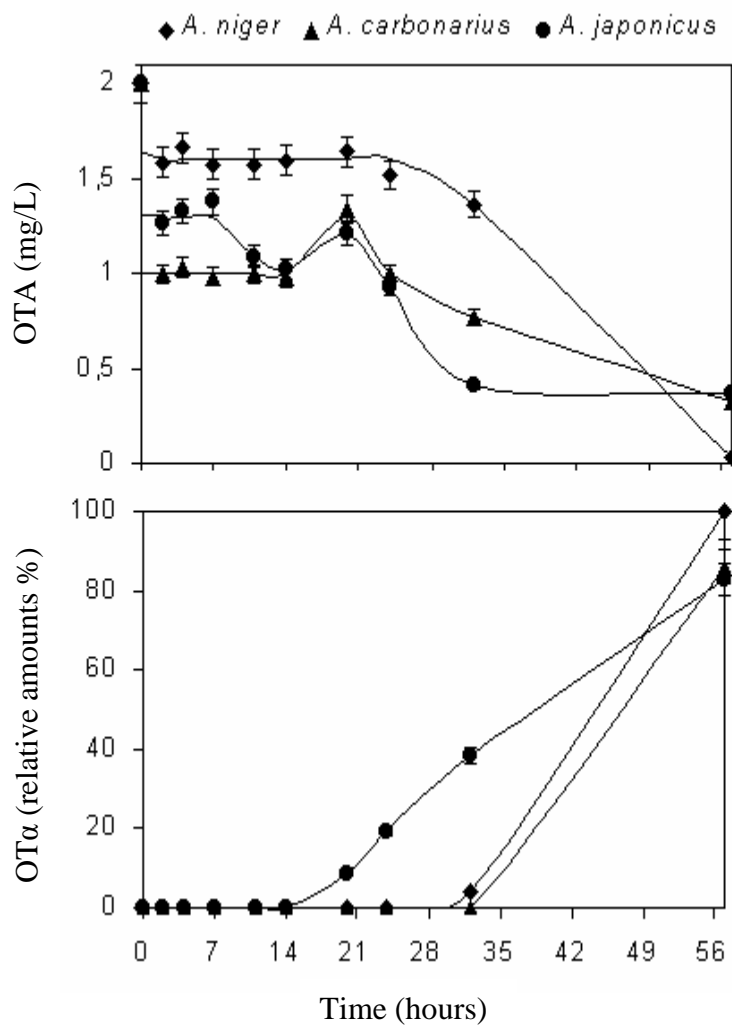


Figure 2

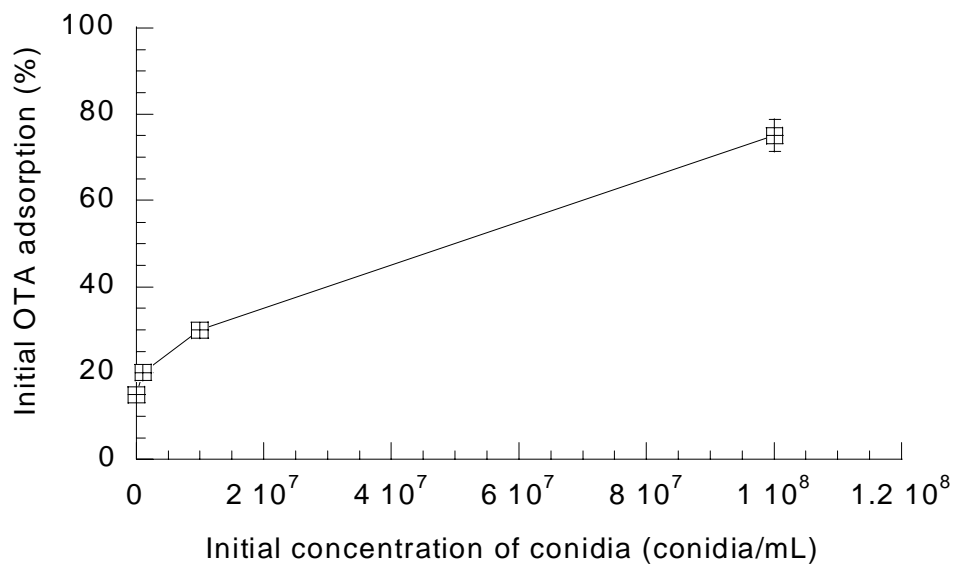


Figure 3

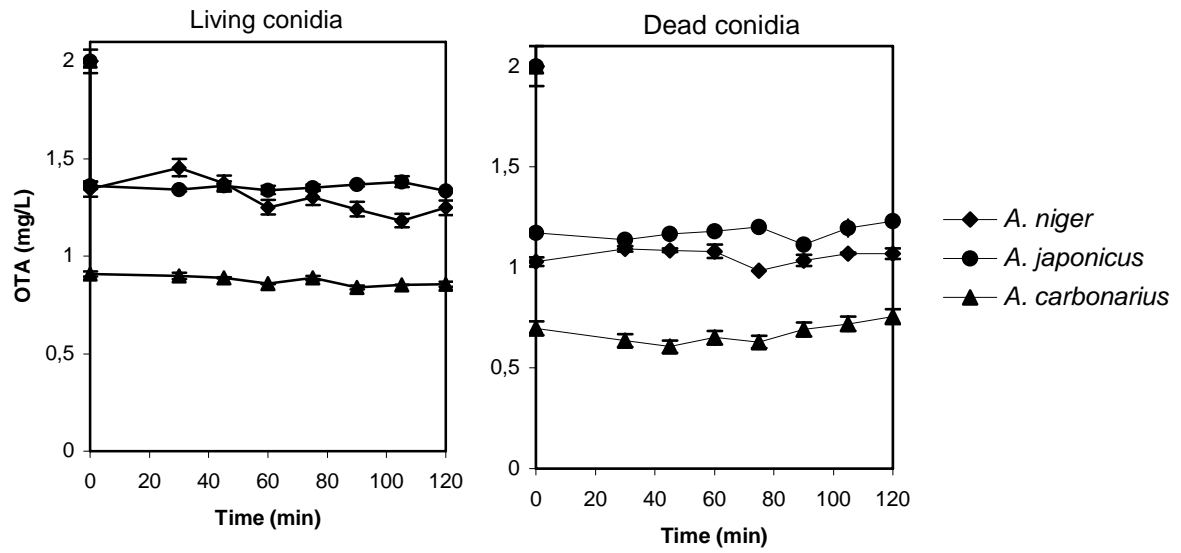
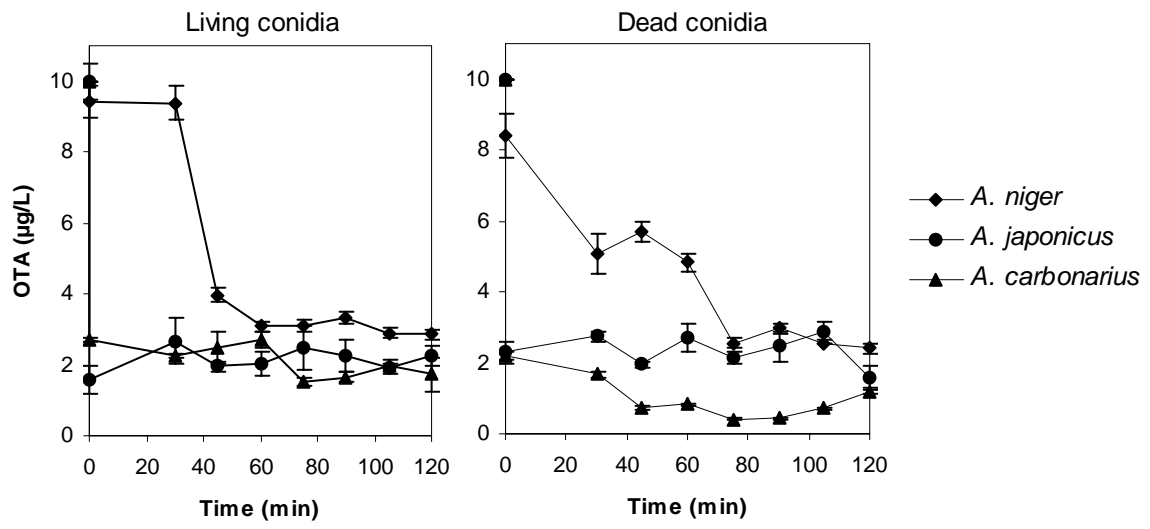


Figure 4



Article 5:

Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains

Accepté dans: *Journal of Applied Microbiology* (Vol 97, issue 5, pp 1038-1055) (2004)

H. Bejaoui¹, F. Mathieu¹, P. Taillandier² and A. Lebrihi¹

Laboratoire du Génie Chimique UMR5503 (CNRS-INPT-UPS), Equipe: Génie des Systèmes Microbiens, ¹Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, France and ²Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques Toulouse Cedex 1, France

Correspondance to: Lebrihi A. Laboratoire du Génie chimique, 1, avenue de l'agrobiopôle, BP107, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, France. Tel: 0562193944; Fax: 0562193901 (e-mail address: lebrihi@ensat.fr).

ABSTRACT

Aims: To assess, for the first time the efficiency in removing ochratoxin A from laboratory medium (YPG), synthetic (SGM) and natural grape juices by viable and dead (heat and acid-treated) oenological *Saccharomyces* strains (five *S. cerevisiae* and one *S. bayanus*) compared to a commercial yeast walls additive.

Methods and Results: Levels of ochratoxin A (OTA) during its interaction with six oenological *Saccharomyces* strains (five *S. cerevisiae* and one *S. bayanus*) or with a commercial yeast walls additive in yeast peptone glucose (YPG) medium, in synthetic (SGM) or in natural grape juices was assessed by HPLC after appropriate extraction methods. A significant decrease of OTA levels in YPG and SGM media was observed for many of the growing strains reaching a maximum of 45%, but no degradation products were detected. With both heat and acid pre-treated yeasts, OTA removal was enhanced, indicating that adsorption, not catabolism, is the mechanism to reduce OTA concentrations. Adsorption was also improved when the yeast concentration was increased and when the pH of the medium was lower. Approximately 90 % of OTA was bound rapidly within five minutes and up to 72 hours of incubation with heat-treated cells of either *S. cerevisiae* or *S. bayanus*. A comparative study between heat-treated cells (HC) and commercial yeast walls (YW) (used as oenological additive), introduced at two different concentrations (0.2 and 6.7 g l⁻¹) in an OTA contaminated grape juice, showed the highest efficiency by HC to adsorb rapidly within five minutes the total amount of the mycotoxin.

Conclusions: Oenological *S. cerevisiae* and *S. bayanus* were able to remove ochratoxin A from synthetic and natural grape juices. This removal was rapid and improved by dead yeasts having more efficiency than commercial yeast walls.

Significance and impact of the study: The efficiency of heat treated yeasts to remove ochratoxin A gives a new hope for grape juice and must decontamination avoiding negative impacts on human health.

Keywords: ochratoxin A, biodegradation, *Saccharomyces*, adsorption, grape juice.

INTRODUCTION

Ochratoxin A is a mycotoxin produced by two genera of fungi *Aspergillus* and *Penicillium*. A

big concern is about its occurrence in many commodities (feeds, foods and beverages), because it is suspected to be nephrotoxic, teratogenic, hepatotoxic and carcinogenic (Marquardt and Frohlich 1992). This toxin has been detected in human blood in many countries after the consumption of contaminated foods (Petkova-Bocharova *et al.* 1988).

Since 1996, the presence of this toxin has been reported in grapes and grape products such as grape juice (<3-311 ng l⁻¹) and wine (<3-388 ng l⁻¹) (Zimmerli and Dick 1996). In fact, wine is considered as the second major source of OTA intake after cereals (Anonymous 1998). Available results show that wines from the Mediterranean area contain higher levels of OTA than wines from northern areas in Europe (Zimmerli and Dick 1996). Grape juices can also show OTA contamination. It seems they contain more OTA than some wines and so contribute to OTA intake by children (Zimmerli and Dick 1996).

In order to protect consumer health from the risk of exposure to this mycotoxin, reliable methods to reduce OTA levels are highly desirable. Decontamination procedures based on physical or chemical removal were proposed on a laboratory scale (McKenzie *et al.* 1997; Laciakova *et al.* 1999). Different assays for biological removal of OTA on laboratory media or on different commodities have been developed (Skrinjar *et al.* 2002; M. Piotrowska and Z. Zakowska 2000a; Piotrowska and Zakowska 2000b; El-Nezami *et al.* 1998) and seemed to be the most promising ones (Skrinjar *et al.* 2002), but no study for OTA removal in grape products was undertaken.

Regarding mechanisms of mycotoxins removal, degradation by microorganisms has been reported in literature. In laboratory media: *Acinetobacter calcoaceticus* (Hwang and Draughon 1994) and *Aspergillus* species (Varga *et al.* 2000; Abrunhosa *et al.* 2002) are able to degrade OTA respectively in ethanol minimal salts medium and in liquid and solid YES medium. OTA degradation has also been observed in foods and beverages such as yoghurt by *Lactobacillus acidophilus* (Skrinjar *et al.* 2002) and in milk by *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* (Skrinjar *et al.* 1996).

Different *Saccharomyces* species completely degraded zearalenone present as a sole carbon source into zearalenone α and zearalenone β (Boswald *et al.* 1995). *S. cerevisiae* has been reported to be able to degrade patulin in apple juice during cider fermentation (Moss and Long 2002).

An adsorption mechanism has also been suggested for OTA removal in MRS medium by lactic acid bacteria (M. Piotrowska and Z. Zakowska 2000a), for aflatoxin B1 also adsorbed by lactic acid bacteria (El-Nezami *et al.* 1998) and by probiotic bacteria (Peltonen *et al.*

2000), and finally for zearalenone and α -zearalenol by lactic acid bacteria (El-Nezami *et al.* 2002).

Other studies have mentioned that *S. cerevisiae* removed OTA when it was mixed with two other mycotoxins: fumonisin B1 and B2 (Scott *et al.* 1995), or present alone in sour dough (M. Piotrowska and Z. Zakowska 2000a), but no details were mentioned about the removal mechanism.

Our objective in this study is to understand OTA removal by oenological *Saccharomyces* strains from different synthetic media (YPG and SGM) initially contaminated with OTA and from a red grape juice compared with a commercial yeast walls additive commonly used as an alcoholic fermentation activator.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains

Five strains of *Saccharomyces cerevisiae* (LALVIN BM45; LALVIN Rhône 2226; UVAFERM 43; LALVIN Rhône 2323 and LALVIN Rhône 2056) and one strain of *Saccharomyces bayanus* (LALVIN QA23) were used in this study. These strains were supplied by LALLEMAND S.A. company (Canada) as dry active yeasts. The *S. cerevisiae* strains have been previously selected for red winemaking in Mediterranean areas.

Yeast walls additive

A oenological yeast walls additive supplied by Springer Oenologie (Bioferm E.C.L, France) was used in this study.

Culture media

Yeast Peptone Glucose (YPG) was prepared by dissolving 5g bacto peptone (Difco), 5g yeast extract (Difco) and 40g glucose D(+) (Fisher Labosi), in 1l distilled water and the pH was adjusted at 5-5.2. Synthetic grape juice (SGM) was prepared by dissolving: 70g glucose D(+) (Fisher Labosi), 30g fructose(D-) (Sigma), 7g tartaric acid(L-) (Rectapur-Prolabo), 10g malic acid (L-) (Fisher Labosi), 0.67g (NH₄)₂HPO₄ (Prolabo-Rhône Poulenc), 0.67g KH₂PO₄ (Acros), 1.5g MgSO₄·7H₂O (Acros), 0.15g NaCl (Fisher Labosi), 0.15g CaCl₂ (Acros), 0.0015g CuCl₂ (Prolabo), 0.021g FeSO₄·7H₂O (Riedel-de Haën), 0.0075g ZnSO₄·7H₂O (Fisher Labosi) and 0.05g hydrated catechin (Sigma); in 1 l distilled water and the pH was adjusted at 3.8-4.0 with KOH 2N. Phosphate Buffered Saline (PBS) (lot 83230-003; 0.2 g l⁻¹

potassium dihydrogen phosphate, 2.9 g l⁻¹ disodium hydrogen phosphate 12 H₂O, 0.2 g l⁻¹ potassium chloride, 8 g l⁻¹ sodium chloride, 0.1 g l⁻¹ Thimerosal, pH 7.4) (Rhône-diagnostics technologies).

These laboratory media were supplemented with ochratoxin A at a concentration of 2 µg ml⁻¹. A red grape juice was also used in this experiment, and was contaminated with OTA at a concentration of 10 µg l⁻¹.

Growing yeasts assay

The degradation capacity of yeasts was tested in screw caps tubes in 2 ml appropriate medium (YPG and SGM media), under agitation (240 rpm), at 30°C and for 6 days. Each medium was inoculated at 1% from a preculture containing approximately 10⁷ UFC ml⁻¹. A negative control (control 1), an OTA contaminated medium without yeast, was used to calculate OTA removal percentage. A positive control (control 2), a growing yeast culture in a medium without OTA, was also used.

All assays were performed in triplicates.

Yeast preparation

An overnight culture of yeast in YPG medium at 30°C was centrifuged at 16000 g, for 5 min and washed twice with PBS buffer, the resulting yeasts constitute the viable cells (VC). A part of those cells was boiled in PBS buffer for 1 hour to obtain heat-treated cells (HC), or incubated in 2 M HCl (v/v) for 1 hour to obtain acid-treated cells (AC). After these treatments yeast suspensions were washed twice with PBS buffer and were ready for use.

Adsorption assay

Treated or not treated *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 cells were inoculated, at a concentration of 6.7 g l⁻¹ ± 2% in PBS, YPG and SGM containing 2 µg ml⁻¹ OTA. After 2 hours of incubation at 30°C, cells were removed and OTA was analysed in the supernatant.

In SGM, another concentration of viable and heat treated *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 (27.4 g l⁻¹) was also tested. A kinetic of ochratoxin A adsorption with heat treated *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 and with *S. bayanus* (LALVIN QA23) at a concentration of 27.4 g l⁻¹ was performed in SGM over 72 hours.

An OTA contaminated red grape juice (10 µg l⁻¹) was inoculated with heat treated *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 or with yeast walls additive at two concentrations of 6.7 g l⁻¹ and 0.2 g l⁻¹ and OTA removal kinetics were established over 2 hours.

Only control 1 was done and all assays were performed at 30 °C, under agitation (240 rpm) and in triplicates.

OTA extraction

OTA extraction from growing culture and adsorption samples. For all samples, after removal of yeasts, 1 ml of supernatant was extracted twice with ethyl acetate (v/v), then evaporated until dry and dissolved in 0.5 ml of methanol before HPLC analysis.

OTA extraction from grape juice. 10 ml of grape juice, were diluted with PBS buffer (v/v) after adjusting pH at 7.8 with KOH 2 M. The diluted sample was loaded onto an OchraPrep (Rhône-diagnostics technologies) immunoaffinity column operating at a steady flow rate of 2 ml min⁻¹. The immunoaffinity column was washed with 20 ml of sterile distilled water, and then dried by pushing air with a vacuum pump. OTA was eluted by applying successively 1.5 ml of methanol/acetic acid (98:2) and 1.5 ml of sterile distilled water. The eluted extract was further analysed by HPLC.

Detection and quantification of OTA

OTA was detected and quantified by reversed-phase high performance liquid chromatography. The HPLC apparatus consisted of a solvent delivery system and fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 466 \text{ nm}$) and UV detectors. The analytical column used was a 150 x 4.6 mm Uptisphere 5 μ C18 ODB fitted with a guard column of 10 x 4 mm. The mobile phase consisted of a mixture of HPLC grade acetonitrile/water/acetic acid (100/99.8/0.2) at a flow rate of 1 ml min⁻¹ and the column temperature was at 30°C. Kroma 3000 (Biotek) was the data acquisition system. Injections were made with an autoinjector (BIO-TEK, Milan, Italy) and the injection volume was of 80 μ l. Ochratoxin A was identified by its retention time (33 min) according to a standard obtained from Sigma (Steinheim, Germany) and quantified by measuring the peak area.

The OTA degradation percentage was calculated according to the following equation: $100 \times [1 - (\text{peak area of OTA} / \text{peak area of OTA in control 1})]$.

Statistical analysis

SPSS, version 11.5.1 (Headquarters, Chicago, Illinois, USA), for windows was used for the statistical analysis of the data. Significant differences in the mean values were reported at *P* values of <0.05.

RESULTS

Removal of OTA by growing yeasts

Six selected oenological yeasts were tested for their ability to remove OTA in either YPG or SGM media at 30°C, in screw cap tubes and under agitation. A decrease in OTA levels was noted after 6 days of incubation (Fig1). The percentage of OTA removal by yeasts was between 11% and 45% in YPG medium and between 1% and 35% in SGM depending on the strain used. Analysis of UV and fluorescence HPLC chromatograms (results not shown) showed no degradation products. We can conclude that OTA was not degraded by these microorganisms, and that OTA removal by growing *Saccharomyces* might be a cell-binding phenomenon.

Adsorption assays

OTA adsorption on yeasts in laboratory medium. *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 was inoculated as viable cells (VC), heat (HC) and acid (AC) treated ones, at a concentration of 6.7 g l⁻¹ in three media (PBS buffer, YPG and SGM) initially contaminated with 2 µg ml⁻¹ OTA. Fig 2 shows that after 2 hours of incubation in the presence of HC or AC, the adsorption of OTA was significantly enhanced in comparison to VC whatever the medium used, and that there is no significant difference between the two types of dead cells (heat or acid treated ones). In SGM medium, for example, the percentage of OTA adsorption was of 75%, 73% and 17% for HC, AC and VC respectively. It was also observed that OTA binding depends on the type of medium whatever the cell treatment. OTA adsorption was higher in the SGM medium, followed by YPG with respectively an average of 74% and 54.5 % (the average values were calculated with all cell treatments for each medium). OTA adsorption reached the lowest value in the PBS buffer with a maximum of 26% on acid treated cells.

Effect of cell concentration. VC and HC *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056, were inoculated at two concentrations (6.7 g l⁻¹ and 27.4 g l⁻¹) in SGM medium contaminated with 2 µg ml⁻¹ OTA during 2 hours, at 30°C.

Table 1 shows that the increase in cell concentration significantly enhanced OTA adsorption by 100% and 21% respectively for VC and HC. It also confirmed the higher capacity of HC to adsorb OTA compared to viable cells.

Effect of time. HC *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 and HC *S. bayanus* QA 23 were inoculated at a concentration of 27.4 g l⁻¹, in SGM medium at 30°C and during 72 hours. Nearly 90% ±0.72 of OTA was bound after five minutes of incubation, no release was observed after 2 hours (fig 3) and up to 72 hours (result not shown), and no significant difference was noted for the two yeast species.

In red grape juice. HC *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 and commercial yeast walls additive (YW) were inoculated at concentrations of 6.7 g l⁻¹ and 0.2 g l⁻¹ in a red grape juice contaminated with 10 µg l⁻¹ OTA. Fig 4 shows that, whatever the concentration used, OTA removal by HC was rapid and total within five minutes and up to two hours. For YW, OTA adsorption was total after 15 minutes and up to two hours, and no significant differences were noted between the two concentrations used. HC were more efficient than YW in decreasing OTA.

DISCUSSION

The present study demonstrates that the oenological yeast strains tested were able to remove OTA in growing culture from laboratory medium (YPG) and from SGM.

In our study, HPLC chromatograms of samples from growing culture were analysed in order to distinguish between biodegradation and adsorption of OTA. The absence of degradation products suggested that adsorption rather than catabolism might be involved. The OTA adsorption, compared to its metabolisation, can be a promising decontamination process because it does not generate any degradation metabolites. These metabolites could be more toxic than the mycotoxin itself, as has been reported for zearalenone (El-Sharkawy *et al.* 1991).

Adsorption assays were done with the three kinds of cells. VC, HC and AC *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 at a concentration of 6.7 g l⁻¹ were able to remove OTA (2µg ml⁻¹) from PBS buffer, YPG and SGM media after 2 hours of incubation at 30°C. OTA removal by viable cells (VC) reached a maximum of 17% in SGM medium. This adsorption can probably be carried out by cell walls. Those, harbouring polysaccharides (glucan), proteins and lipids, exhibit numerous different and easily accessible adsorption sites including different adsorption mechanisms, e.g. hydrogen bonding, ionic or hydrophobic interactions (Huwig *et al.* 2001). In another study, adsorption of mutagens on *Streptococcus* and *Lactobacillus* was done mainly by polysaccharides (Zhang and Ohta 1993; Rajendran and Ohta 1998). The adsorption mechanism could probably not be specific as it is shown for yeast killer toxins

bound by polysaccharides and not by proteins, fatty acids (Radler and Schitt 1987; Santos *et al* 2000), cellulose or glycogen (Radler and Schitt 1987) of sensitive yeasts.

Our results showed that treatments of yeasts by heating and acidity enhanced significantly OTA removal from liquid media (75%) compared to viable cells but no significant difference was noted between those two treatments. Polysaccharides are expected to be affected by heat and acid treatments. Heating may cause denaturation of proteins or formation of Maillard reaction products. Acidic conditions could affect polysaccharides by releasing monomers, further fragmented into aldehydes after the breaking down of glycosidic linkages. These released products could offer more adsorption sites than viable cells and may increase surfaces for OTA binding. Moreover, the decrease in wall thickness of peptidoglycan and/or the increase in its pore size under heat and acid treatments could probably make available other sites from yeast cells for OTA adsorption (El-Nezami *et al.* 2002). The efficient OTA removal by non-viable cells, observed in our work, confirmed the adsorption mechanism. Other previous works have shown that non viable lactic acid bacteria (heat and acid treated cells) are able to adsorb zearalenone, α -zearalenol, aflatoxins and trichotecenes, (El-Nezami *et al.* 1998; 2002).

In our study, the best adsorption level was noted first in the SGM medium (pH = 3.8) and then in the YPG one (pH = 5) and was respectively 3 times and twice more important than in PBS buffer (pH = 7). The acidity could probably improve the OTA adsorption mechanism. In other conditions, previous studies have shown an OTA absorption from animal stomach as a result of its acidic properties (pKa (OTA) = 7.1) (Galtier 1978; Roth *et al.* 1988). In our experiment, the increase of OTA adsorption in acid conditions could be explained by the amino group ionisation of the OTA molecule, which is enhanced in the acid media used (SGM and YPG). Consequently, ionic properties of the OTA molecule as well as wall yeast membrane state, were significant factors in improving OTA adsorption.

Biomass concentration was also a significant factor, playing an important role in OTA adsorption. A four-fold increase in yeast concentration enhanced significantly OTA adsorption by about 100% for VC and 21% for HC but in this last case the saturation level (90%) was reached. This has already been observed in a previous study of zearalenone and α -zearalenol binding (El-Nezami *et al.* 2002).

Kinetic studies of OTA adsorption by HC *S. cerevisiae* and HC *S. bayanus* at 27.4 g l⁻¹ concentration, have shown first that OTA binding was a rapid reaction reaching 90% after 5 min of incubation and equilibrium was still maintained until 72 hours and second, there was no difference between the two species behaviour in OTA removal process. In a previous study

(El-Nezami *et al.* 2002), zearalenone and α -zearalenol were first instantly adsorbed at 60%, then released in the MRS liquid medium and finally rebound by the bacteria up to 72 hours. In another study, the adsorption of killer toxins by sensitive yeasts was also rapid and complete within 2 min (Santos *et al.* 2000). HC *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 were used to test the efficiency of OTA adsorption in a contaminated red grape juice in comparison with commercial yeast walls additive (YW) commonly used in oenology as an activator of alcoholic fermentations. The concentrations tested 0.2 and 6.7 g l⁻¹, correspond respectively to the highest authorised concentration for the YW and to living yeast concentration at the end of alcoholic fermentations (generally comprised between 4 and 7 g l⁻¹). The rapid and total OTA adsorption by HC and YW whatever the concentration used shows their high decontaminating efficiency. Moreover the adsorption by HC cells was quicker. For a oenological use, according to some of our experiments, living yeasts concentration at the end of an alcoholic fermentation could reduce OTA through adsorption, although HC could be more efficient.

In conclusion, OTA removal by *Saccharomyces* strains corresponds to an adsorption mechanism confirmed by both absence of degradation products during growing culture and ability of dead cells (HC and AC) to reduce OTA concentration during the adsorption assays. Ionic properties of the OTA molecule, yeast membrane state and biomass concentration were the major factors affecting the OTA adsorption phenomenon. Synthetic grape juice associated with heat treated cells gave the best results whatever the *Saccharomyces* species used.

The preliminary study on a naturally contaminated grape juice has confirmed the rapid adsorption of OTA. These results give new hope for OTA decontamination in natural grape juice (as the cells are dead and so no risk of fermentation is involved) or in wine.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the European Union (QLK1-CT-2001-01761) and French “Ministère de la jeunesse de l’éducation et de la recherche” (AQS N°:02 PO571).

REFERENCES

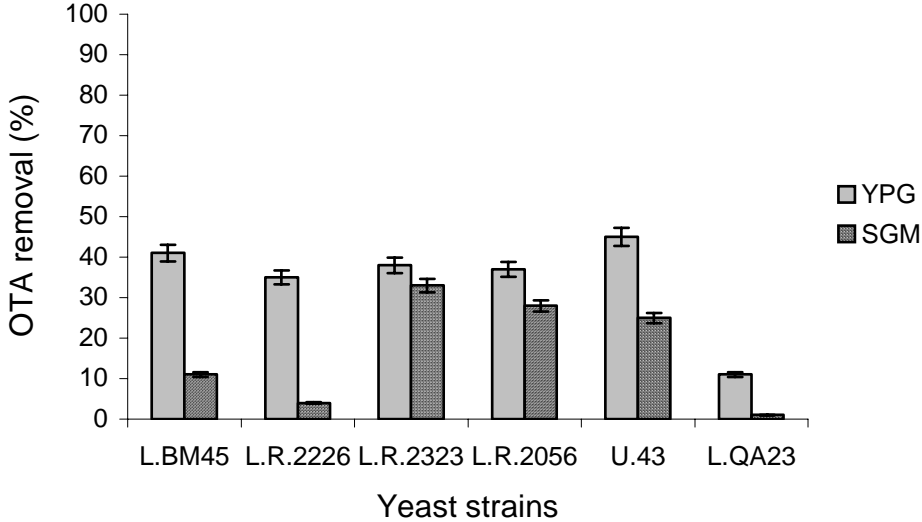
- Abrunhosa, L., Serra, R. and Venancio, A. (2002) Biodegradation of ochratoxin A by Fungi isolated from grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 25, 7493-7496.
- Anonymous (1998) Position paper on ochratoxin A, Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Thirty-first session, The Hague, The Netherlands, 22-26 March 1999, CX/FAC 99/14.

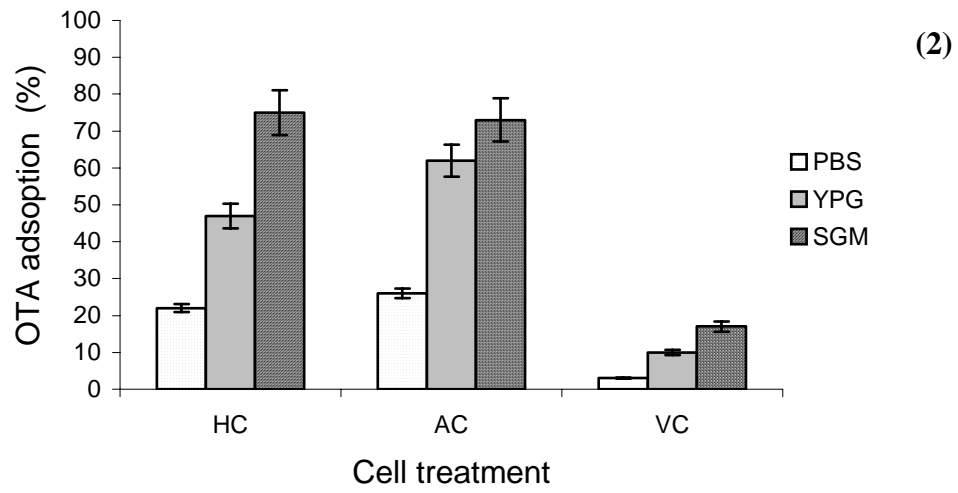
- Boswald, C., Engelhardt, G., Vogel, H. and Wallnofer, P.R. (1995) Metabolism of Fusarium mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance. *Natural Toxins* 3, 138-144.
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chemical and Toxicology* 36, 321-326.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykkänen, H. (2002) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3545-3549.
- El-Sharkawy, S., Selim, M., Afifi, M. and Halaweish, F. (1991) Microbial transformation of zearalenone to zearalenone sulfate. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 549-552.
- Galtier, P. (1978) Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology-Ochratoxin A. *Veterinary Science Community* 1, 349-358.
- Huwig, A., Freimund, S., Käpelli, O. and Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicology letters* 122, 179-188.
- Hwang, C.A. and Draughon, F.A. (1994) Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection* 57, 5, 410-414.
- Laciakova, A., Cabadaj, R., Pastorova, B., Conkova, E., Kovac, G. and Laciak, V (1999) The effect of feed additives on ochratoxin A. *Folia veterinaria* 42, 2, 71-73.
- Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1992) Review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* 70, 3968-3988.
- McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., Norred, W. P., Voss, K. A., Plattner, R. D., Kubena, L. F. and Phillips, T.D. (1997) Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chemistry and Toxicology* 35, 8, 807-820.
- Moss, M. O. and Long, M. T. (2002) Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Additives and Contaminants* 19, 4, 387-399.
- Peltonen, K., El-Nezami, H., Salminen, S. and Ahokas, J. (2000) Binding of aflatoxin B₁ by probiotic bacteria. *Journal of Science Food and Agriculture* 80, 1-4.
- Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N. and Castegnaro, M. (1988) Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants* 5, 299-301.

- Piotrowska, M. and Zakowska, Z. (2000a) Removal of ochratoxin A from liquid media by lactic acid bacteria fermentation. Conference, Poland, Sept.25-27.
- Piotrowska, M. and Zakowska, Z. (2000b) The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Food Biotechnology* 17, 307-310.
- Radler, F. and Schitt, M. (1987) Killer toxins of yeasts: inhibition of fermentation and their adsorption. *Journal of Food Protection* 50, 234-238.
- Rajendran, R. and Ohta, Y. (1998) Binding of heterocyclic amines by lactic acid bacteria from miso, a fermented Japanese food. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 109-115.
- Roth, A., Chakor, K., Creppy, E.E., Kane, A., Rösenthaller, R. and Dirheimer, G. (1988) Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 48, 293-308.
- Santos, A., Marquina, D., Leal, J. A. and Peinado, J. M. (2000) (1,3,6)-b-D-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranefaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1809-1813.
- Scott, P.M., Kanhere, S.K., Lawrence, G.A., Daley, E.F. and Farber, J.M. (1995) Fermentation of wort containing added ochratoxin-A and fumonisin B1 and fumonisin B2. *Food Additives and Contaminants* 12, 31-40
- Skrinjar, M., Rasic, J.L. and Stojicic, V. (1996) Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiology* 41, 26-28.
- Skrinjar, M. R., Sedej, I. J. and Pesic-Mikulec, D. M. (2002) Detoxification of ochratoxin A in yoghurt by *Lactobacillus acidophilus*. *Prehrambena Industrija* 13, 28-30.
- Zhang, X. B. and Ohta, Y. (1993) Antimutagenicity of cell fractions of microorganisms on potent mutagenic pyrolysates. *Mutation Research* 298, 247-253.
- Zimmerli, B. and Dick, R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 13, 655-668.
- Varga J., Rigó K. and Téren, J. (2000) Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology* 59,1-7.

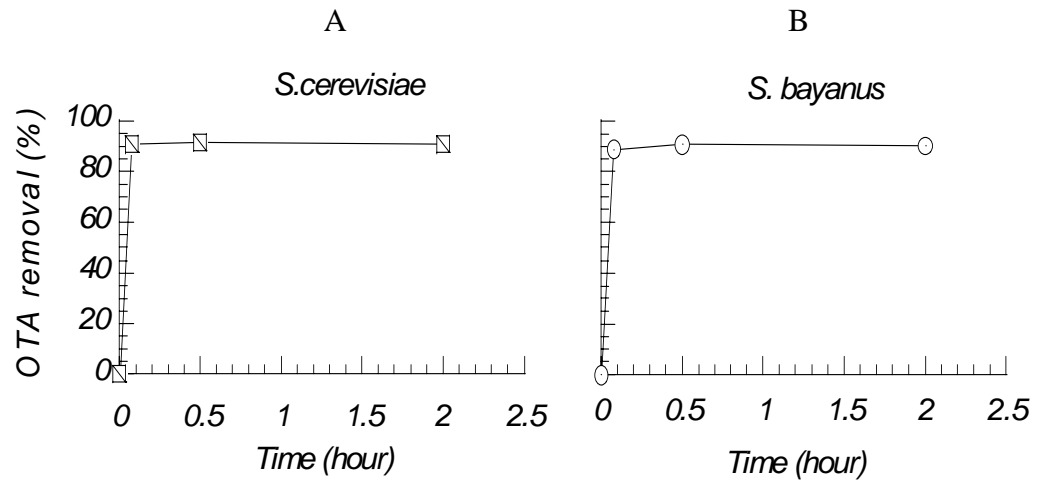
Appendix

(1)





(3)



(4)

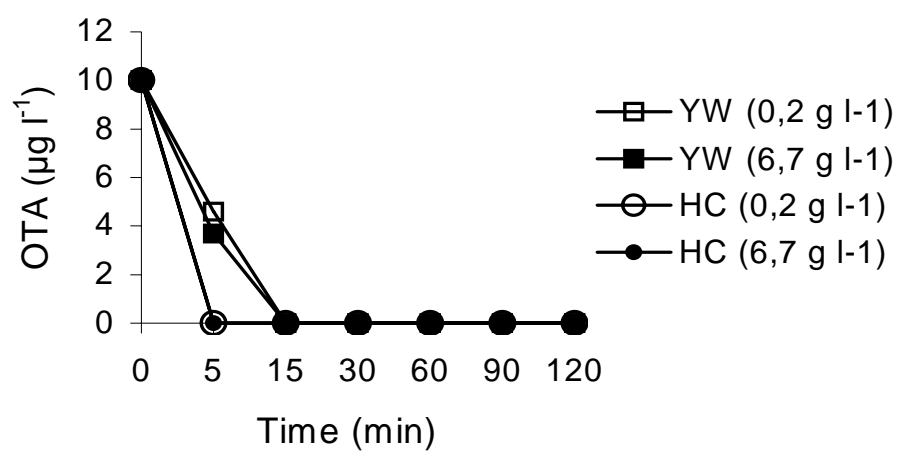


Table 1 OTA removal by *S.cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 cells at two different concentrations at 30°C, during 2 hours in SGM medium.

% adsorption of OTA from <i>S. cerevisiae</i> cells (Average \pm SD)		
Yeast concentrations	Viable cells	Heat treated cells
6.7 g l ⁻¹	17.0 ^a \pm 2.1	75.0 ^c \pm 5.0
27.4 g l ⁻¹	35.0 ^b \pm 3.0	90.8 ^d \pm 4.2

a,b,c Values with different superscripts differ at $P < 0.05$

LIST OF FIGURES AND TABLES

List of figures

Figure 1. Removal of OTA (%) by yeast strains during growth: *Saccharomyces cerevisiae* (LALVIN BM45; LALVIN Rhône 2226; UVAFERM 43; LALVIN Rhône 2323 and LALVIN Rhône 2056) and *Saccharomyces bayanus* (LALVIN QA23) in YPG and SGM media, after incubation at 30°C, for six days.

L: Lalvin; U: Uvaferm; LR: Lalvin Rhône

Figure 2. OTA adsorption in different media (PBS, YPG and SGM) with different treated *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 cells (heat treated cells (HC); acid treated cells (AC) and viable cells (VC)), at 30°C, during 2 hours of incubation and at a concentration of 6.7 g l⁻¹.

Figure 3. Kinetics of OTA removal (%) for two *Saccharomyces* heat treated cells (*S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 and *S. bayanus* LALVIN QA23), at 30°C, at a concentration of 27.4 g l⁻¹ and in SGM medium.

Figure 4. The OTA removal in commercial grape juice (contaminated with OTA at a concentration of 10 µg l⁻¹) with HC *S. cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 and yeast-walls (YW) at concentrations of 0.2 g l⁻¹ and 6.7 g l⁻¹.

List of tables

Table 1. OTA removal by *S.cerevisiae* LALVIN Rhône 2056 cells at two different concentrations at 30°C, during 2 hours in SGM medium.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Notre étude s'est intéressée au problème de l'ochratoxine A dans des vignobles de France. Au cours de ce travail, des champignons ont été isolés de 4 régions vitivinicoles françaises. Une population fongique totale caractérisée par une prédominance des *Aspergillus* par rapport aux *Penicillium*, confirme la préférence de ce genre aux climats tempérés (Pitt et Hocking, 1997). La population ochratoxinogène est formée à 93 % par le genre *Aspergillus* et à 7% par le genre *Penicillium*. Seul le genre *Aspergillus* avait montré une capacité ochratoxinogène importante alors que les *Penicillium* avaient un pouvoir très négligeable à produire l'OTA. Ceci confirme les suggestions de Creppy (1991) considérant que l'ochratoxicose en France est due aux *Aspergillus* alors qu'elle serait plutôt liée au *Penicillium* dans des climats plus frais tel qu'en Allemagne et en Scandinavie.

Comparé à la France, aucun *Penicillium* isolé du Portugal n'a montré un pouvoir ochratoxinogène (Serra *et al.*, 2003) alors que *P. pinophilum* (Battilani *et al.*, 2000, 2001), *P. funiculosum* et *P. spinulosum* étaient rapportés pour la première fois ochratoxinogène en Italie (Battilani *et al.*, 2003).

D'après nos résultats, *A. ochraceus* et *P. verrucosum*, principale flore ochratoxinogène sur les céréales n'ont jamais été isolés des raisins français qu'ils soient du Nord-Est, du Centre-Ouest ou du sud méditerranéen. Sage *et al.* (2002) ont montré également l'absence de ces deux espèces au sud de la France alors que l'ONIVIN en 2001, avait en partie, attribué la contamination du raisin à *A. ochraceus* au sud de la France et à *P. verrucosum* dans les vignobles septentrionaux (Rousseau et Blateyron, 2002). Dans certains pays du bassin méditerranéen (l'Espagne (Belli *et al.*, 2004), le Portugal (Serra *et al.*, 2003) et l'Italie (Battilani *et al.*, 2003)) ou de l'Amérique latine (Brésil (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002), *A. ochraceus* a pu être détecté à de faibles pourcentages, alors que *P. verrucosum* n'a jamais été isolé.

Parmi cette flore isolée en France au cours de notre étude, les *Aspergillus* de la section Nigri étaient prépondérants (99%) parmi le genre *Aspergillus*. *A. carbonarius*, *A. niger* aggrégats et *A. japonicus* sont les espèces connus parmi ces *Aspergillus* noirs et avait un potentiel à produire l'OTA *in vitro*.

Le rôle de ces espèces plus ou moins important dans la contamination à l'OTA des vignobles est déterminé sur la base de 3 critères essentiels: la taille de la population de chaque espèce

fongique isolé du raisin, l'incidence ochratoxigénique au sein de cette population et le potentiel à produire l'OTA des représentants de cette population.

Comparé aux autres espèces, *A. carbonarius* présente l'incidence et le potentiel ochratoxigéniques les plus élevés (entre 70 et 100%) et peut être ainsi considérée comme la principale espèce ochratoxinogène dans les vignobles. En plus de son incidence et son pouvoir ochratoxigénique importants observés dans plusieurs pays méditerranéens (Abarca *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2003; Battilani *et al.*, 2003), *A. carbonarius* possède également un pouvoir invasif et un caractère agressif qui devrait être pris en considération dans les vignobles (Battilani et Pietri, 2002).

Derrière les *A. carbonarius*, les *A. niger* agrégats pourraient avoir un impact ochratoxinogène importants dans les vignobles. Leur nombre assez élevé et leur pouvoir ochratoxinogène non négligeable pourraient justifier leur importance, mais leur donne seulement la seconde place vue leur faible incidence ochratoxigénique (<20%) comparé au *A. carbonarius*. Cette espèce avait également montré une faible incidence à travers différents pays du bassin méditerranéen tel que le Portugal (4%) (Serra *et al.*, 2002) ainsi qu'en Amérique latine (Brésil (16,6 %) et en argentine (30 %) (Da Rocha Rosa *et al.*, 2002). Quant aux *A. japonicus*, ils seraient sans aucun impact sur la contamination des vignobles. La faible taille de leur population, et leur pouvoir ochratoxigénique très faible comparé aux 2 autres espèces expliquent cette opinion. Cette espèce n'a été que très rarement rapportée ochratoxinogène (Dalcero *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003) au niveau de la bibliographie.

Au cours de la maturation du raisin, le stade vendange est le plus propice au développement des champignons et la production d'OTA. La concentration élevée en sucre des raisins mûre et leur faible acidité pourraient être une des raisons de ce phénomène. Ainsi pour lutter contre la contamination à l'OTA des jus, certains industriels avaient proposé de vendanger un peu plus tôt leur raisin, afin de contourner ce stade. Cette solution n'est pourtant pas envisageable dans le cas des vins où une maturité phénolique optimale est d'un grand intérêt technologique (Lataste *et al.*, 2003). Toutefois, Rousseau et Blateyron (2002) avaient montré que l'état sanitaire des baies est important pour déterminer leur contamination à l'OTA à ce stade. En effet, des raisins en bon état sanitaire n'ont pas présenté des teneurs élevées en OTA à la vendange.

Selon les régions étudiées au cours de ce travail, l'Alsace et la Charente n'étaient pas contaminés à l'OTA. Les raisins en provenance du bassin méditerranéen présentent le maximum de contamination fongique et des teneurs importantes en OTA. L'étude réalisée par Zimmerli et Dick en 1996, analysant différents vins à travers le monde, avait montré la forte

contamination à l'OTA des raisins du bassin méditerranéen. D'autres études ont également dosé ces teneurs qui avaient pu atteindre des maximums en µg/L de 0,19 en Espagne, 0,78 en France, 0,89 en Macédoine, 1,85 en Tunisie, 7 en Italie (Höhler, 1998) et 3,2 au Maroc (Filali *et al.*, 2001). Ospital *et al.*, 1998, avaient également montré l'absence de contamination dans le pays de la Loire et le Beaujolais et a détecté des teneurs de cette mycotoxines dans 50 % des cas plus importante dans des vins rouges du bassin méditerranéen en France (vin du Midi) et à l'étranger.

Les conditions macro-climatiques particulière à cette région (différentes de celles du Nord et du centre) et notamment les fortes températures, l'intensité et la durée importantes de l'ensoleillement pourraient expliquer la présence des espèces ochratoxinogènes (Pietri *et al.*, 2001). La haute résistance d'*A. carbonarius*, principale espèce ochratoxinogène sur raisin, aux rayons solaires grâce à la couleur noire de leur spores et leur croissance à des températures aussi élevées que 40°C (Pitt *et al.*, 2000), expliquent leur développement important au niveau du bassin méditerranéen.

Toutefois, la contamination pourrait différer selon les régions au niveau de la Méditerranée, et le Languedoc-Roussillon (LR) avait présenté des contaminations plus élevées que la Provence-Alpes-Côte-d'Azur (PACA). Les températures généralement plus faibles à PACA qu'au LR permettent probablement d'expliquer cette différence de contamination. Toutefois, selon les années, la variété étudiée au sein de la région PACA pourrait avoir des contaminations égales ou un peu plus importantes que certaines variétés faiblement contaminées au niveau du LR. Au sein du Languedoc-Roussillon lui même, plusieurs contaminations ont été également observées selon les départements ainsi qu'au niveau d'un même département, dans deux localités proches et dans une même localité. Des variations ont été aussi observées d'une année à l'autre.

La variabilité et la complexité des facteurs méso- et micro climatiques respectivement liés à une localité ou à l'environnement proche de la vigne, ainsi que leurs interactions pouvant réduire ou augmenter les effets du macro-climat sauraient expliquer ces variations.

L'influence du méso-climat pourrait se manifester par l'altitudes, le relief, la présence de forêt et de masses d'eau.

Le micro-climat propre à la vigne est déterminé par différents facteurs. Le facteur biologique lié à la présence de prédateurs constitue un élément important conditionnant la contamination à l'OTA des raisins. En effet, des études réalisées par l'ICV ont montré que des raisins marqués par le ver de la grappe et par du *Botrytis* donnent lieu à des vins riche en OTA (Rousseau et Blateyron, 2002). La cochenille et la cicadelle pruineuse sont également des

facteurs aggravant la contamination à l'OTA des raisins (ITV, 2003). Les dommages causés par ces prédateurs facilitent la pénétration des champignons (*A. niger* et *A. carbonarius* (WHO, 2002; Lataste et al., 2003)), au niveau de la pulpe, leur développement et l'expression de leur ochratoxigénicité (ICV, 2003).

De plus, une diversité de champignons et de levures peuvent également infester les raisins avant récolte (Fleet, 2001) et constituent la niche écologique de la vigne. Les interactions entre une espèce fongique et d'autres micro-organismes sur les baies peuvent perturber sa croissance et la production de l'OTA. Ainsi certains travaux avaient montré qu'une baisse de la croissance d'*A. ochraceus*, du à la présence d'autres agents compétitifs, était accompagnée par l'augmentation de son pouvoir ochratoxinogène lui permettant de maintenir l'occupation de son habitat et d'éviter son exclusion biocompétitive (Lee et Magan, 1999). Des levures également isolées des pellicules de raisins (*Metschnikowia pulcherrima*, des espèces de *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, certaines espèces de *Zygosaccharomyces*) avaient montré une activité antifongique importante (Suzzi et al., 1995; Guinebretiere et al., 2000). Leur capacité à produire le 1,3- β -glucanase, détruisant les parois fongiques et probablement certaines toxines killer pourraient agir sur les champignons au niveau de la vigne (Walker et al., 1995).

D'autres agents ayant une influence sur le micro-climat sont gérés par l'Homme. Il s'agit de certaines pratiques telles que l'entretien du sol et la densité de plantation déterminant à la fois la température et l'humidité environnant la vigne. La taille et l'éclaircissement de la zone fructifère ainsi que la conduite de la vigne, déterminent l'aération et l'exposition au soleil et aux agents d'attaques des grappes.

L'utilisation de certains facteurs chimiques insecticides et fongicides dans le cadre d'une lutte phytosanitaire au vignoble fait partie de l'action de l'Homme sur la nature. Ces produits peuvent diminuer les teneurs en OTA dans les raisins. En effet une lutte contre le ver de la grappe avait montré une diminution de 80% de la contamination à l'OTA des raisins (Rousseau et Blateyron, 2002). L'utilisation de certains insecticides ou fongicides permet de diminuer l'altération des grappes et la flore fongique ochratoxinogène. Des matières fongicides actives, pyriméthanil (Scala), fludioxinil et cyprodinil (Switch) avaient montré une action efficace contre les genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Le fosétyl-A (Mikal) est la seule matière active ayant montré régulièrement de faibles teneurs en OTA (ITV France, 2003).

Au cours de notre étude, deux parcelles traitées respectivement au Mikal et au Switch (à des doses non communiquées) ont été comparées à une parcelle témoin de point de vue charge fongique et teneurs en OTA des raisins. Les résultats obtenus étaient contradictoires à ceux

observés par l'ITV. Aucune relation n'a pu être établie entre l'utilisation de fongicides et la charge fongique des baies. Celle-ci était très souvent supérieure dans les parcelles traitées que dans la parcelle témoin. Des teneurs en OTA très élevées par rapport au témoin ont pu être également enregistrées à la suite de l'utilisation de ces produits fongicides et l'effet stimulateur du Switch était le plus spectaculaire. Ces résultats rejoignent les observations de Moss et Frank (1987) qui ont attiré l'attention sur les effets de certains produits chimiques à concentrations sub-létales favorisant la production de certaines mycotoxines.

Des produits de nature alcoolique tels que l'éthanol, ont été également testés sur la vigne pour des fins viticoles pour améliorer la coloration des baies par une stimulation de la synthèse des anthocyanines (El-Kereamy *et al.*, 2002). Ce produit, connu par ses effets antimicrobiens, a été testé au cours de notre étude à différentes concentrations *in vitro* par rapport à ses effets sur la croissance et la production d'OTA par *A. carbonarius*, première espèce ochratoxinogène au niveau des vignobles.

De 1 jusqu'à 3 %, l'éthanol avait provoqué l'inhibition de la croissance du champignon et une augmentation des teneurs en OTA produites. Au-delà de 3 %, aucune production d'OTA n'a été remarquée.

L'inhibition de la croissance d'*A. carbonarius* sous l'effet de l'éthanol est due à certaines actions cytotoxiques de cet alcool sur la membrane des microorganismes (Ingram et Buttke, 1984). La stimulation de la production de l'OTA, faisant probablement partie de la machinerie métabolique d'un champignon en réponse à un stress extérieur, constituerait un mode de protection permettant d'atténuer l'effet du facteur de stress ou la réparation de certains dommages subits par le microorganisme. Deux isolats d'*A. carbonarius* testés lors de cette étude avaient également montré certaines différences individuelles dans leur réaction vis-à-vis de ce stress alcoolique. *A. carbonarius* G731, un isolat 4 fois plus producteur d'OTA que l'isolat *A. carbonarius* Mu243, était plus sensible à l'action de l'éthanol. Sa croissance était alors très affectée et sa réaction avait généré une production d'OTA plus importante que le deuxième isolat.

Ainsi une variabilité des effets des agents chimiques sur le métabolisme secondaire des champignons a été observée. Tantôt stimulateurs ou répresseurs des teneurs en OTA, ils permettraient d'augmenter ou de diminuer la contamination du raisin dans les vignobles. Les réponses individuelles au stress des isolats au sein d'une même espèce, rendent encore plus difficile la prévision de l'action de ces agents chimiques sur le comportement métabolique des champignons.

Tous les facteurs qu'on vient d'exposer, affectant le méso et le microclimat, aussi variables soient ils, maîtrisables ou pas par l'Homme, déterminent la complexité du modèle vignoble et pourrait nous amener à conclure quant à l'imprévisibilité du développement des champignons et de l'expression de leur potentiel ochratoxinogène au niveau du vignoble.

Une stratégie de lutte curative devrait ainsi être envisagée au sein de la filière raisin, jus de raisin et vin. Différentes méthodes expérimentales physiques (radiation gamma) et chimiques (ozone) testées pour éliminer cette mycotoxine, avaient montré une efficacité limitée, un coût élevé et ont en plus occasionné d'importantes pertes nutritives au niveaux des produits contaminés aux sein de différentes filières alimentaires. Plusieurs spécialistes se sont alors orientés vers les méthodes biologiques qu'ils considèrent meilleures des précédentes (Bata et Lasztity, 1999). L'utilisation de cultures cellulaires (Ruhland *et al.*, 1994), de certaines enzymes et de différents microorganismes à éliminer l'OTA ont été montrés (Hult *et al.*, 1976, Westlake *et al.*, 1987; Hwang et Draughon, 1994), mais demeure théorique et sans aucune application pratique.

Etant très restrictive dans ses réglementations, la filière raisin jus de raisin et vin ne permet l'utilisation que de certains additifs ou traitement d'usage œnologiques et seuls les microorganismes naturels appartenant à l'environnement du raisin peuvent être introduits dans les moûts. Quelques traitements œnologiques utilisant du charbon actif ou des caséinates de potassium avaient montré une bonne efficacité à éliminer l'OTA pouvant atteindre les 85 % pour le premier (à une dose de 20 g/hectolitre) et 82 % pour les second (à 150 g/hectolitre) (Dumeau et Trioné, 2000; Castellari *et al.*, 2001; Rousseau et Blateyron, 2002). Ces traitements demeurent pourtant interdits pour les vins rouges et entraînent en plus une dégradation de leur qualité. Or les moûts rouges étaient rapportés les plus contaminé à l'OTA comparés aux rosés et aux blancs. Cette contamination a été attribuée à l'étape de la macération pelliculaire. Longue pour les rouges, assez courte pour les rosés et totalement absente pour les blancs, elle contribue à enrichir les moûts en OTA. Pour comprendre ce phénomène, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Une première avait plaidé pour un développement fongique au cours de cette étape et avant la phase anaérobie entraînant la production de l'OTA (Höhler, 1998; Brera *et al.*, 2004). La seconde propose une extraction de l'OTA des pellicules de raisins par l'éthanol présent dans la cuve (Lataste *et al.*, 2003). Une troisième hypothèse directement lié à notre étude pourrait prendre en considération les effets stimulateurs du métabolisme ochratoxigénique d'*A. carbonarius* (présent sur la pruine des pellicule en macération) par les faibles quantités d'éthanol pouvant atteindre 1 ou 2% dans les cuves en début de macération.

Dans le cadre de notre étude visant la décontamination par voie biologique des moûts de raisin, des microorganismes appartenant au biotope naturel du raisin ou à leur environnement technologique ayant un intérêt vinicole, ont été testés pour leur capacité à éliminer l'OTA dans des milieux de laboratoires, dans des moûts synthétiques et en application dans des moûts naturels rouges.

40 isolats d'*Aspergillus* noirs, principale flore isolée sur les baies de raisin, ochratoxinogène (*A. carbonarius*) ou non (*A. niger* aggrégats et *A. japonicus*) avaient montré un pouvoir à éliminer l'OTA pouvant atteindre les 100 % dans plusieurs cas. Plusieurs champignons évoqués au niveau de la littérature ont également montré un pouvoir de dégradation de l'OTA. Il s'agit de certains microorganismes sans aucune relation avec l'environnement de la vigne (microbes du rumen des animaux (Hult *et al.*, 1976), *Butryvibrio fibrosolvans* (Westlake *et al.*, 1987) etc), et d'autres qui lui sont très attachés. Parmi ces derniers on cite certaines souches d'*A. niger* et d'*A. japonicus* testés par Varga *et al.* (2000) ainsi que différents isolats des espèces d'*Aspergillus* noirs isolées du raisin portugais et d'autres genres de champignons tel que *Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria*... (Abrunhosa *et al.*, 2002) et *Rhizopus* (Varga *et al.*, 2005) etc. Le pouvoir de dégradation de ces champignons appartenant au biotope de la vigne devrait être pris en considération lors des études menées sur l'infestation des vignobles par l'OTA.

Au cours de notre expérimentation le même profil de dégradation a été montré pour les 3 espèces d'*Aspergillus* noirs. L'apparition de produits de dégradation et entre autre l'OT α , métabolite de moindre toxicité que l'OTA, montre qu'il s'agit d'une métabolisation et d'une détoxification de la molécule. Un autre produit de dégradation (non identifié et appelé arbitrairement HE) observé au 22^{ème} jour d'incubation a été également observé en parallèle avec une diminution des teneurs en OT α . Celle-ci s'est probablement dégradé et a généré ce nouveau métabolite. Le même phénomène a été également observé par Varga *et al.* (2000) qui avaient suggéré la rupture du noyau isocoumarine de l'OT α pour la formation de ce nouveau composé.

Le pouvoir plus important de ces champignons à éliminer l'OTA d'un milieu simulant le jus de raisin comparé à un milieu de laboratoire (CYA) donne encore plus d'espoir à la décontamination des moûts naturels.

Utilisés à des concentrations plus importantes que précédemment, les spores des *Aspergillus* noirs avaient montré un pouvoir adsorbant de l'OTA. Il s'agit d'une réaction rapide voire instantanée dès le contact des spores dormantes, gonflées ou germées avec l'OTA contenu dans des moûts synthétiques ou naturels. Certaines propriétés physico-chimiques de la

molécule de l'OTA et de la surface des spores rapportées au niveau de la bibliographie nous ont amené à conclure que cette liaison serait la résultante de certaines interactions hydrophobes ou d'attractions entre charges.

Ainsi les *Aspergillus* de la section Nigri, avaient en plus de leur capacité à dégrader l'OTA assuré par des cellules mycéliennes, un pouvoir adsorbant exercée par des spores dormantes, mais également germées.

Des cinétiques de dégradation réalisées par les 3 isolats des espèces d'*Aspergillus* noirs (*A. carbonarius* SA332; *A. niger* GX312; *A. japonicus* AX35) ainsi qu'une appréciation de la couleur du moût (par méthode spectrophotométrique) à l'issue de l'introduction des spores, ont montré qu'*A. niger* et *A. japonicus* comparées à *A. carbonarius* seraient d'un grand intérêt technologique. Leur faible détérioration de la couleur du moût, Le label GRAS accordé au premier par les Etats-Unis, et l'ochratoxigénicité rarement évoquée pour le 2^{ème} (Dalcero *et al.*, 2002; Battilani *et al.*, 2003) justifient ce choix.

D'autres microorganismes appartenant à l'environnement technologique vinicole ont été testées au cours de cette étude. Des souches œnologiques de levure sélectionnées (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*) et de bactéries lactiques (*Oenococcus oeni*) ont montré un pouvoir d'élimination de l'OTA. La présence de l'OT α , à l'issue de l'introduction de la bactérie lactique, montre qu'elle présente un pouvoir de dégradation de la mycotoxine. Dans le cas des levures, l'absence de produits de dégradation, le pouvoir d'élimination rapide de l'OTA dans le milieu et la capacité des levures morte à éliminer l'OTA montre qu'il s'agit d'une adsorption de la toxine.

Au cours d'une étude réalisée par l'ITV (France) (2003), une diminution des teneurs en OTA a été observée au cours de la vinification de moûts artificiellement contaminés par cette mycotoxine. Le marquage au tritium de l'OTA leur ont permis de confirmer l'absence d'une métabolisation de l'OTA et d'émettre l'hypothèse d'une adsorption de la toxine dans les cuves confirmée au cours de notre étude par les levures, mais peut être également due à l'action de dégradation de la toxine par les bactéries lactiques. Un élevage sur lie réalisé également par des travaux évoqués au niveau de la littérature a permis d'observer une diminution de 10 % des teneurs en OTA comparé à un témoin élevé de façon traditionnelle (Rousseau, 2003 et ICV, 2003). Les levures vivantes testées dans notre étude avaient en effet un pouvoir d'élimination de l'OTA variant entre moins de 10 % et jusqu'à 35 % selon les souches utilisées. Un traitement expérimental des vins rouges par des lies rouges ou blancs a permis d'éliminer entre 63 et 74 % de l'OTA en 80 jours (Garcia Moruno *et al.*, 2005). D'après cette étude, nous pourrions penser que les niveaux maximum d'élimination de l'OTA

par les levures vivantes dans le cas de notre travail et situées autour de 35 % (pourcentage moins important que l'étude de Garcia Moruno *et al.*) pourrait être du au temps d'incubation qui était de 6 jours dans notre cas et de 80 jours dans le leur. On pourrait également suggérer que cette adsorption est une fonction croissante du temps d'incubation mais nous pourrions également attribuer ceci au type de levure utilisé dans les deux études.

Dans notre étude, les mêmes levures traitées à la chaleur avaient montré une capacité très élevée à adsorber l'OTA. Cette élimination était instantanée et presque totale (au tour de 90 %) et était indépendante du temps d'incubation.

Certaines écorces de levures d'intérêt œnologique testées dans cette notre étude avaient montré une capacité intéressante, quoique moins rapide que les levures traitées à la chaleur, à éliminer l'OTA dans du moût rouge artificiellement contaminés (à une concentration de 10 µg/L mimant une contamination naturelle des moûts).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

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

Au cours de notre étude, menée en France, le stade vignoble a été tout d'abord étudié, et différents facteurs au sein de ce contexte naturel ont été discutés dans leurs effets sur la contamination à l'OTA des raisins. Dans un deuxième temps une réflexion menée sur la complexité des facteurs intervenant au sein du vignoble et la possibilité d'une prévention efficace au sein de ce cadre a été faite. Enfin, le rôle de certains microorganismes de l'environnement naturel et technologique du raisin dans la décontamination des moûts a été étudié.

Dans un premier temps, à l'échelle du vignoble, l'étude de la dynamique des populations fongiques ochratoxinogènes au cours de la maturation de raisins de différents vignobles français sur 3 campagnes viticoles successives, nous ont permis de déterminer l'agent causal ochratoxinogène au sein des vignobles. Il s'agit essentiellement d'*A. carbonarius* suivi des *A. niger aggrégats*. Le raisin issu du Bassin Méditerranéen et plus précisément de la région du Languedoc-Roussillon, étaient les plus contaminés par les populations ochratoxinogènes et les plus affectés par l'OTA.

Le stade maturation serait le moment critique de la contamination où de fortes teneurs en OTA ont été détectées.

Toutefois, la complexité du modèle vignoble, fait que la contamination pourrait différer d'un département à l'autre, d'une variété à l'autre et d'une année à l'autre. La présence d'autres facteurs d'origine naturelles tels que les facteurs climatiques, édaphiques, géologiques et écologiques ou ceux d'origine anthropogénique liés aux pratiques culturales et leurs interactions pourraient intervenir dans le processus de la toxigenèse et rendre diversifiés et impossible à préciser les causes de la contamination. Parmi les pratiques culturales (facteurs gérés par l'Homme), l'emploi à certaines doses de certains produits chimiques, fongicides ou

antimicrobiens antifongiques (alcools), avait montré un effet stressant sur les champignons ochratoxinogènes. En réponse à ce stress, ces microorganismes avaient augmenté leur métabolisme producteur de la toxine et des quantités importantes d'OTA ont pu être détectées comparés à des témoins non traités. Les doses de ces produits chimiques, ne sont toutefois pas les seuls facteurs ayant une action sur le métabolisme ochratoxinogène et des interactions avec d'autres facteurs extérieurs rendrait encore plus difficile la prévision de leur action sur les quantités d'OTA produites.

Si la maîtrise sanitaire au sein du vignoble par une prophylaxie adaptée a pu dans des études antérieures réduire les teneurs en OTA des moûts, les effets stimulateurs du métabolisme ochratoxinogène de certains agents chimiques, et leurs interactions avec l'environnement devraient être également pris en considération pour mieux prévenir la contamination au sein du vignoble.

La difficulté de la gestion de l'OTA dans le vignoble due à l'imprévisibilité du développement des champignons et de la complexité des facteurs affectant l'expression de son potentiel ochratoxinogène, font de la décontamination une stratégie importante à concevoir et à mettre au point afin de répondre aux nouvelles exigences législatives au sein de la filière.

Ainsi, le pouvoir de certains microorganismes de l'environnement naturel de la vigne et de certains autres ayant un intérêt dans la technologie vinicole a été étudié.

Les *Aspergillus* de la section Nigri avaient en effet à la fois un pouvoir de dégradation et d'adsorption de l'OTA. *A. niger* et *A. japonicus* avaient les meilleures performances dans l'élimination de l'OTA et les plus faibles impacts destructeurs sur la couleur des jus et seraient donc d'un grand intérêt technologique pour la décontamination de la toxine au sein de la filière. Bactéries lactiques et levures avaient respectivement un pouvoir de dégradation et d'adsorption qui pourrait se manifester lors des processus fermentaires. Les levures mortes traitées à la chaleur avaient montré une rapidité et une efficacité toute deux intéressantes à considérer pour la décontamination des moûts riches en OTA.

En observant les teneurs de l'OTA détectées dans les vins français généralement inférieures ou légèrement supérieures par rapport à la législation récemment instaurée, fixant les teneurs maximale de l'OTA à 2 µg/L et prenant application dès la campagne 2005, montre que la résolution du problème de cette mycotoxine ne serait pas assez difficile à gérer en France au niveau de la denrée vin. Ce problème serait toutefois assez difficile à résoudre dans d'autres pays où les niveaux de contamination sont beaucoup plus élevés (Afrique du Nord par exemple).

Toutefois, les champignons isolés en France avaient montré un pouvoir *in vitro* énorme à produire l'OTA. Un potentiel ochratoxigénique très important existe alors dans les vignobles et pourrait selon les conditions se manifester en provoquant des contaminations incurables des produits de la filière. Pour cela une surveillance et une vigilance devraient être de rigueur dans ce contexte naturel difficilement maîtrisable.

De plus, les raisins secs, produits très fortement contaminés à l'OTA et très largement utilisés dans pas mal de produits pâtisseries de consommation fréquente dans plusieurs pays à travers le monde et entre autre en France demeure sans solution claire et envisageable et pourrait être la cause de problèmes sanitaires.

Ce travail pourrait ouvrir des voies et des perspectives afin de mieux explorer le modèle vignoble, dans la complexité des facteurs ochratoxinogène qu'il abrite et pour mieux affiner et mettre au point certaines stratégies de décontamination adaptées à la filière et répondant aux exigences législatives nouvellement instaurées:

Etudier le comportement des champignons ochratoxinogènes dans leur interaction avec les facteurs de stress introduits par l'environnement et essayer de comprendre leurs réactions vis-à-vis des agressions extérieures pourraient avoir un grand intérêt tant pratique que fondamentale.

Explorer la niche écologique abritée par la vigne, et la diversité des microorganismes qu'elle abrite par des méthodes moléculaires très intéressantes par leur efficacité et leur rapidité (développé par certaines équipes de recherche) et les interactions de ces microorganismes au sein de cet habitat naturel pourrait également contribuer à une meilleure compréhension des réactions ochratoxinogènes de certains champignons et constitue un sujet de curiosité scientifique.

L'immobilisation des spores des champignons noirs et plus précisément des espèces d'*A. niger* et d'*A. japonicus* et le développement de ce procédé pour des fins pratiques dans le cadre de la vinification pourrait constituer un nouvel espoir de décontamination au sein de la filière.

La recherche d'enzyme à partir des *Aspergillus* noirs ou d'autres microorganismes ayant une forte capacité de dégradation pourrait également ouvrir des voies intéressantes pour une meilleure qualité sanitaire dans la filière.

En attendant de mieux maîtriser le risque au sein de la filière, Punam Jeeswal et Jeswal (1998) (rapporté par Battilai et Pieri, 2002) pourrait nous concilier par les effets antidotes attribués aux jus de raisin sur les impacts négatif hépatorénaux de l'OTA.

Ainsi, et pour conclure la qualité au sein de la filière n'est pas seulement l'œuvre de l'homme, mais aussi de la nature. Jouant un rôle important, complexe et difficilement maîtrisable, Dame Nature a su très souvent présenter le problème et sa résolution au sein du même produit. Le respect de ce contexte naturel, l'observation et l'étude de cet environnement saurait parfois nous enseigner à retrouver la bonne solution. Notre action humaine qui tend très souvent à modifier la nature et à la déséquilibrer en introduisant des éléments de stress nocifs à effets non maîtrisables aura certainement un impact sur l'avenir de l'être humain et de notre planète.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabanes, F. J. 2003. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of food protection*. 66, 504-506.

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

Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2001. Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of food protection*, 64, 6, pp, 903-906.

Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Accensi, F., and Cabañes, F.J. 1997. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *Journal of Food Protection* 60, 1580-1582.

Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., Venancio, A. 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 240-242.

Abrunhosa, L., Serra, R., Venancio, A. 2002. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 7493-7496.

Accensi, F., Abarca, M. L., Cano, J., Figuera, L., Cabanes, F. J. 2001. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *Aspergillus niger* aggregate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 365-370.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire). 1999. <http://www.aret.asso.fr/arbuletinjuin91.htm>.

Akiyama, H., Toyoda, M., Kato, M., Igimi, S., and Kumagai, S., 1997. The degradation of several mycotoxins by human intestinal microflora cultured by continuous flow culture system. *Mycotoxins*. 44:21-27.

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

Alsberg, C. L. and Black, O. F., 1913. U. S. Dept. Agric. Bureau Plant Ind., Bull., 270.

Anon, 1997. Committee on toxicity of chemicals in Food, Consumers products and environment. Statement on ochratoxin A in dried vine fruits (London: Department of Health, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food).

AOAC Official Methods of analysis. 1995. Natural Toxins, 49, 1-46.

Armitage, Z. Making wine safer. <http://www.cabi-bioscience.org/docs/ochratoxina.doc>.

Aziz, N. H., Moussa, L. A. A. 2002. Influence of Gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxin in fruits. *Food Control*, 13, 281-288.

Bata, A. and Lasztity, R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 223-228.

Battilani, P., Giorni, P., Languasco, L., Pietri, A., Bertuzzi, T. 2001. Dynamics of fungi responsible for ochratoxin A in grape. Results from a survey on their presence in Italy in 2000. In: Book of abstracts "Bioactive Fungal Metabolites: Impact and exploitation" (p 47) Swansea, Wales.

Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A. 2003. Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 715-722.

Battilani, P., Languasco, L., Pietri, A., Bertuzzi, T., Giorni, P. 2000. Ochratoxin A in grape and wine: causes and conditions of production; Preliminary results. Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, Giardini Naxos, Italy, 2000 Abstract 502P, 89. *Journal of plant Pathology*, 533-555.

- Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T., Pietri, A. 2004. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1736-1740.
- Battilani, P., Pietri, A. 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 639-643.
- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, A. T., Languasco, L., Giorni, P., Kozakiewicz, Z. 2003. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, 66, 633-636.
- Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J., Mahoney, N. E. 2002. Ochratoxin Production by the *Aspergillus ochraceus* Group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2326-2329.
- Belli, N., Marin, S., Duaigues, A., Ramos, A. J., Sanchis, V. 2004a. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 591-594.
- Belli, N., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marin, S. 2004b. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section Nigri strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 72-77.
- Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3, 497-516.
- Bertolini, L., Giampiccolo, G., Gaggia, C., Ferri, G., Russo, C. 2000. Ochratoxin A determination in South Italian wines. *Industrie delle Bevande* 29. 169, 473-476.
- Betina, V. (1991). Applications of bioassays for screening of *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. In J. Chelkowski (ed.), *Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Developments in Food Science vol. 26 pp. 311-353. Amsterdam etc.; Elsevier.
- Blateyron, L., Michel, G., 2001. Maîtrise des contaminants dans les vins: cas de l'OTA. Essai de réduction de la teneur en OTA par collage sur des vins rouges naturellement riches en cette

molécule. Congrès de l'office International de la vigne et du Vin (OIV) Novembre 2001, Australie, Adélaïde.

Böhm, J., Grajewski, J., Asperger, H., Cecon, B., Rabus, B., Razzazi, E., 2000. Study on biodegradation of some A- and B-trichoyhecenones and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycotoxin Research*. 16A, 70-74.

Boorman, G. 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A. U.S. National institutes of health publication 89-2813, Washington.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, Ph., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y., Veau, P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2^{ème} édition, collection Biotechnologie, Masson, Paris.

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

Breitholtz-Emmanuelsson, A., minervini, F., Hult, K., Visconti, A. 1994. Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Natural Toxins*, 2, 366-370.

Brera, C., Soriano, J. M., Debegnach, F. Miraglia, M. 2005. Exposure assessment to ochratoxin A from the consumption of Italian and Hungarian wines. *Microchemical Journal*

Bucheli, P. C., Kanchanomai, I., Meyer, Pittet, A. 2000. Development of ochratoxin A during robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1358-1362.

Burdaspal, P. A., Legarda, T. M. 1999. Ochratoxin A in wines and grape products originated from Spain and other European countries. *Alimentaria* 36, 107-113.

Byrne, D. 2002. Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Communities L75/18-20.

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

Campbell-Platt, G., and Cook, P.E. 1989. Fungi in the production of foods and food ingredients. Journal of Applied Bacteriology, Symposium. Suppl. 67:117S-131S.

Catellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G. P., 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.

Chalutz, E., Droby, S. 1998. Biological control of postharvest disease. In: Boland, G. J., Kuykendall, L. D.), Plant Microbe interactions and biological control. Marcel Dekker, New York, pp. 157-170.

Chelkowski, J., Samson, R.A., Wiewiórowska, M., and Golinski. 1987. Ochratoxin A formation by isolated strains of the conidial stage of *Aspergillus glaucus* Link ex grey (= *Eurotium herbariorum* wiggers link ex gray) from cereal grains. Nahrung, 4, 267-269.

Chen, H. C., Chang, S. O., Ing, S. T. 1987. A study on the sterilization effect of ozone and its application for marine food processing. Journal of Fishery Society of Taiwan, 14, 79-89.

Chu, F.S. 1974. Studies in ochratoxin. CRC Critical Reviews in Toxicology, 2: 499.

Ciegler, A., 1971. Bioproduction of ochratoxin A and penicillic acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. Canadian Journal of Microbiology, 18, 631-636.

Ciegler, A., Fennell, D. I., Sansing, G. A., detroy, R. W., Bennett, A. 1973. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. Applied Microbiology, 216, 271-278.

Codex Alimentarius Commission. November 1998, posting date. Position paper on ochratoxin A. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. [Online] http://www.who.int/fsf/Chemicalcontaminants/ochratoxinpp99_14.pdf.

Creppy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127, 19-28.

Creppy, E. E., Betbeder, A. M., Gharbi, A., Counord, J., Castegnaro, M., Bartsch, H., Montcharmont, P., Fouillet, B., Chambon, P. and Dirheimer, G. (1991). Human ochratoxicosis in France. In: *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*, IARC scientific publications No 115, Lyon, pp. 145-151.

Creppy, E. E., Castegnaro, M., Grosse, Y., Mériaux, J., Manier, C., Montcharmont, P., Waller, C. 1993. Etude l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France: Alsace, Aquitaine et région Rhône-Alpes. In: E. E. Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds.), *Human ochratoxicosis an dits pathologies*, John Libbey Eurotext INSERM, Vol. 231, pp, 147-158.

Crespy, A. 2005. A propos de la norma ochratoxine A à 2 µg/litre de vin: quelles conséquences sur la filière? *Revue des œnologues*, 115, 7-9.

Cvetnic, Z., Pepeljnak, S. 1990. Ochratoxinogenicity of *Aspergillus ochraceus* strains from nephropathic and non-nephropathic areas in Yugoslavia. *Mycopathologia*, 110, 93-99.

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

Da Rocha Rosa, C. A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C. E., Dalcero, A. M. 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food additives and Contaminants*, 19, 4, 408-414.

Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiachiera, S. M., Palacio, G., Rosa, C. A. R. 2002. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Additives and Contaminants*. 19, 1065-1072.

Deberghes, P., Betbeder, A. M., Boisard, F., Blanc, Rh., Delaby, J. F., Krivobok, S., Steinman, Rh., Seigle-Murandi, F., Creppy, E. 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.

DGCCRF, 1998. http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/01_presentation/activites/labos/1998/publier.htm?ru=01.

DGCCRF, 1999. http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/01_presentation/activites/labos/1999/c/afe.htm.

Dragacci, S., Frémy, J. M. 1998. dosage des mycotoxines. In: Moisissures des aliments peu hydratés. Cahagnier, B. Tec et Doc, Paris, pp. 187-207.

Droby, S., Cohen, L., Davis, A., Weiss, B., Hores, B., Chalutz, E., Kotz, H., Kerantzur, M., Shachnai, A., 1998. Commercial testing of Apsire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control* 12, 97-101.

Dumoulin, M., Riboulet, J. M. 2002. Réflexions sur la présence d'ochratoxine A dans les vins et les jus de raisin. *Revue Française d'œnologie*, 104, 11-13.

Duturc-Rosset, G. 1998. The State of Viticulture in the world and the Statistical Information in 1998. Office International de la Vigne et du Vin.

Engelhardt, G., 2002. Degradation of ochratoxin A and B by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Mycotoxin Research*. 18, 37-43.

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

FAO (Food and Agriculture Organization), 1997. World wide regulations for mycotoxins 1995, FAO Food and Nutrition Paper 64, Rome.

FAO/OMS/PNUE, 1999. Troisième conférence Internationale mixte sur les mycotoxines, Tunis/Tunisie, 3-6 Mars. http://www.fao.org/es/esn/food/quality_myco_fr.stm.

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

Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22.

Fleet, G.H., 2001. Wine. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, pp. 747–772.

Fournaud, J., Lauret, R. 1972. Influence of ozone on the surface microbial flora of frozen beef and during thawing. *Ind. Aliment. Agric.* 89, 585-589.

Frisvad, J. C. 1989. The connection between the *Penicillia* and *Aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* . 18, 452-467.

Frisvad, J. C., Filtenborg, O., Lund, F., Samson, A. 1999. The homogeneous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion, p 259-277. In: Samson, R. A., Pitt, J. I. (ed.), *Integration of modern taxonomic methods for *Aspergillus* and *Penicillium* classification*. Harwood Academic Publishers, Reading. UK.

Frisvad, J.C., and Samson, R.A. 1991. Mycotoxins produced in species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: Chelkowski, J.(Ed.) *Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and quality in Drying and storage.*; pp 441-476. Elsevier, Amsterdam.

Frisvad, J.C.,and Filtenborg, O. 1989. Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*. 81:837.

Furuya, E. G.; Chang, H. T.; Miura, Y.; Noll, K. E. A fundamental analysis of the isotherm for the adsorption of phenolic compounds on activated carbon. *Separation and Purification Technology*, 1997, 11, 69-78.

Galtier, P., and Alvinerie, M., 1976. In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Annales de Recherche Vétérinaires* 7:91-98.

Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H. S., Pitt, J. I., Samson, R. A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, R. A. Samson, Pitt, J. I. (eds), Plenum Press, New York, pp. 55-61.

Greuter, W., Barrie, F. R., Burdet, H. M., Chaloner, W. G., Demoulin, V., Hawksworth, D. L., Jorgensen, P. M., Nicolson, D. H., Silva, P. C., Treharne, P., Mcneil, J. 1994. *International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code)*. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany.

Guinebretiere, M.H., Nguyen-The, C., Morrison, N., Reich, M., Nicot, P., 2000. Isolation and characterisation of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis Cinerea* on strawberry fruits. *Journal of Food Protection*, 63, 386-394.

Hamaker, J. W.; Thompson, J. M. Adsorption. In *Organic chemicals in the Soil Environment*; Goring, C. A., Hamaker, J. W., Eds.; Vol. 1, Marcel Dekker: New York, 1972; pp 49-143.

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

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

Hesseltine, C.W., Vandegrift, E.E., Fennell, D.I., Smith, M.L., and Shotwell, O.L. 1972. *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia*, 64:539-550.

Hocking, A. D., Pitt, J. I. 1979. Water relations of some *Penicillium* species at 25 °C. Transactions of the British Mycological Society, 73, 141-145.

Höhler, D., 1998. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. Z Ernährungswiss, 37, 2-12.

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

Hsieh, D.P. H., 1992. An overview of mycotoxin risks. Presentation at the symposium on naturally occurring substances in traditional and biotechnology-derived foods: Their potential toxic and anti-toxic effects. March, 1992, Irvine, California.

Hult, K.A., Teiling, A. and Gatenbeck, S. 1976. Degradation of ochratoxin-A by ruminants. Applied and Environmental Microbiology, 32: 443-444.

Hwang, C. A. and Droughon, F. A. 1994. Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. Journal of Food Protection, 57, 410-414.

IARC (International Agency for research on cancer) 1993. Ochratoxin A. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, vol. 56., Lyon, pp. 489-521.

IARC, 1976. Cancer incidence in Five Continents, Volume III, edited by J. Waterhouse, P. Correa, C. Muir and J. Powel, Lyon.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In: Microorganisms in foods. 5. Characteristics of food pathogens. Blackie Academic and Professional Press, London, pp. 347-381.

ICV, 2003. Ochratoxine A dans les vins, état des connaissances 10p.

ITV France, 2003. Les entretiens viti-vinicoles Rhône-Méditerranée, 18-23.

Jimenez, M. R., Mateo, A., Querol, T., Huerta, Hernandez, E. 1991. Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia*, 115, 121-127.

Joosten, H. M. L. J., Goetz, J., Pittet, A., Schellenberg, M., Bucheli, P. 2001. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *International Journal of Food Microbiology*. 65, 39-44.

Jorgensen, K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15, 550-554.

Journal officiel de l'Union Européenne, 2005. Règlement (CE) N° 123/2005. de la commission du 26 janvier 2005 modifiant le règlement (CE) n° 466/2001 en ce qui concerne l'ochratoxine A.

Keeper-Goodman, T., Scott, P. M. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2, 179-248.

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

Kiessling K.-H., Pettersson H., Sandholm K., Olsen M., 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1070-1073.

Kim, J. G., Yousef, , A. E., Dave, S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of food protection*, 62, 9, 1071-1078.

Klich, M. A. Pitt, J. I. 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their telomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, Australia.

Klich, M. A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. Mycological Papers 161. CAB International, Wallingford, UK.

Krogh, P. 1978. Causal associations of mycotoxic nephropathy. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, section A (Suppl. 269).

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

Lacey, J., 1989. Prevention of Mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. eds. Mycotoxins and phycotoxins, 88. Elsevier, Amsterdam, pp 161-168.

Lataste, C., Guérin, L., Solanet, D., Berger, JL., Cottereau, P., Molot B. 2003. www.aredvi.asso.fr/AREDVI%20public/manif/PV84/OTA_ITV30.pdfv.

Le Bars J., 1982. Facteurs de l'accumulation d'acide pénicillique dans les denrées d'origine végétale. Science des Aliments, 2 (hors série II), 29-33.

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

Lee, H. B., Magan, N. 2000. Impact on environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain. International Journal of Food Microbiology, 61, 11-16.

Lerch, C. M., Muller, H. M., 1990. Analysis of ochratoxins from buffered rumen fluid by reversed-phase high performance liquid chromatography. Chromatographia, 30, 424-427.

Leroux, P., Gredt, M., Guérin, L., Béguin, J., Lebrihi, A. 2002. Fongicides utilisés en viticulture et mycotoxines. Phytoma-LdV, 553, 28-31.

- Li, S., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A; Vitti, T. G., Crow, G. 1997. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145, 82-90.
- Lillehoj, E. B., Elling, F. 1983. Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agriculturae Scandinavica* . 33, 113-128.
- Lillehoj, E. B., Goransson, B. 1980. Occurrence of ochratoxin and citrinin producing fungi on developing Danish barley grain. *Acta Pathologica, Microbiologica et Scandinavica, Sect. B*, 88, 133-137
- Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J. 1998. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A* 815, 3-20.
- Liu, D. L., Yao, D., Yao, D. S., Liang, Y. Q., Zhou, T. H., Song, Y. P., Zhao, L., Ma, L. 2001. Production, purification and characterisation of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food and Chemical Toxicology*, 9, 461-466.
- Maaroufi, A., Achour, A., Zakhama, A., Ellouz, F., El May, M., Creppy, E.E., and Bacha, H. 1996. Human nephropathy related to ochratoxin A in Tunisia. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* . 15:223-237.
- MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E., Shepherd, M. J. 1999. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Additives and Contaminants*, 16, 253-260.
- MAFF, 1997. Survey of aflatoxin and ochratoxin in cereals in retail products. *Food Surveillance Sheet*, 130, 1-8.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcero, A. 2003. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179-184.

- Majerus, P. and Otteneder, H. 1996. Nachweis und vorkommen von ochratoxin A in wein und traubensaft. Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 92, 388-390.
- Majerus, P., Cutka, I., Dreyer, A., El-Dessouki, S., Eyrich, W., Reusch, H., Schurer, B., Waiblinger, H. U. 1993. Zur belastungssituation von ochratoxin A in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 89, 112-114.
- Mannon, J., Johnson, E. 1985. Fungi down on the farm. New Science, 28, 12-16.
- Mantle, P.G., and McHugh, K.M. 1993. Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. Mycology Research, 97:205-212.
- Marquardt, R.R., and Frohlich, A.A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. Journal of Animal Sciences, 70:3968-3988.
- McKenzie, K.S, Sarr, A.B., Mayura, K., Bailey, R.H., Miller, D.R., Rogers, T.D., Norred, W.P., Voss, K.A., Plattner, R.D., Kubena, L.F., and Phillips, T.D. 1997. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. Food and Chemical Toxicology. 35:807-820.
- Mégnégneau, B., Debets, F., Hoekstra, R. F. 1993. Genetic variability and relatedness in the complex group of black Aspergilli based on random amplification of polymorphic DNA. Current Genetics, 23, 323-329.
- Merkaki, P., Delpont-Binet, C., Grosso, F., Dragacci, S. 2001. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. Journal of Food Protection, 64, 533-537.
- Mills, J. T., Abramson, D., Frohlich, A. A., Marquardt, R. R. 1989. Citrinin and ochratoxin A production by *Penicillium* spp. From stored durum wheat. Canadian Journal of Plant Pathology, 11, 357-360.
- Ministero Della Sanita, 1999. Circolare 09.06.1999, Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana n. 135, 11.06.1999.

- Mislivec, P. V., Dieter, C. T., Bruce, V. B. 1975. Mycotoxin producing potential of mold flora of dried beans. *Applied Microbiology*, 29, 522-526.
- Moruno, E. G., Sanorenzo, C., Boccaccino, B., Stefano, R. D. 2005. Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* . 56, 1, 73-76.
- Moss, M. O. 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 13, 5-9.
- Moss, M. O. 1998. Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology symposium supplement*, 84, 62S-76S.
- Mosseray, R. 1934. Les *Aspergillus* de la section Nigri Thom and Church. *La cellule*, 43, 203-285.
- Müller, H. M. 1982. Decontamination of mycotoxins. I. Physical process. *Ubersicht. Tierernähr.*, 10, 95-122.
- Murakami, H., 1979a. Classification system of the black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese industrial strains of the *Aspergillus* (part 32). *Journal of Brewing Society of Japan*, 74, 849-853.
- Murakami, H., 1979b. Summary and description of species of black aspergilli. Taxonomic studies on Japanese industrial strains of the *Aspergillus* (part 33). *J. Brew. Soc. Japan*, 74, 854-858.
- Naitoh, S., Shiga, I., 1982. Studies on utilization of ozone in food preservation. I. Microbiocidal properties of ozone on various microorganisms suspended in water. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology*, 29, 1-10.
- Nakajima, M., Tsubouch, H., Miyabe, M., Ueno, Y., 1997. Survey of aflatoxin b1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and agricultural immunology*, 9, 77-83.

ONIVIN, 2000. présentation des filières vini-viticole et brassicole.

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

Ospital, M., Cazabeil, J. M., Betbeder, A. M., Tricard, C., Creppy, E., Medina, B. 1998. L'ochratoxine A dans les vins. *Oenologie*, 69, 16-19.

Ough, C. S., Corison, C. A. 1980. Measurement of patulin in grapes and wines. *Journal of Food Science*, 43, 3, 476-478.

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

Paranecova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R. A., Rossen, L., Ten Hoor-Suykerbuyk, M., Visser, J. 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 521-527.

Paranecova, L., Skouboe, P., Samson, R. A., Rossen, L., Visser, J., 2000. Genotypic and phenotypic variability among black Aspergilli. In: Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (pp 413-424). Harwood Academic Publishers, Amsterdam the Netherlands.

Park, D. L. 1993. Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food additives and contaminants*, 10, 1, 49-60.

Patel, S., Hazel, C. M., Winterton, A. G. M., and Mortby, E. 1996. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 13, 833-841.

Patterson, M., Domoglou, A. P. 1986. The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue. *Letters in Applied Microbiology*, 3, 123-128.

- Petrova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., and Castegnaro, M., 1988. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food additives and Contaminants* 5, 299-301.
- Petzinger, E. and Ziegler, K. 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Therapy*, 23, 91-98.
- Pfohl-Leszkowicz, A. 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Edition Tec et Doc, Paris, pp 9-13.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*. 18, 7, 647-654.
- Piotrowska, M., Wakowska, Z. 2000. The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Food Biotechnology*. 307-310.
- Pitout, M. J., 1969. The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 16, 485-491.
- Pitt, J. I. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 266-269.
- Pitt, J. I. Basilico, J. C., Abarca, M. L., Lopez, C. 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38, 1, 41-46.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1997. *Fungi and Food spoilage*, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London.
- Pitt, J.I. 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 2nd Ed. Pp 132-133. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde, N.S.W., Australia.
- Plamgreen, M. S., Lee, L. S. 1986. Separation of mycotoxin-containing sources in grain dust and determination of their mycotoxin potential. *Environmental Health Perspectives*, 66, 105-108.

Pohland, A.E., Schüller, P. L., Steyn, P. S., and Van Egmond, H. 1982. Physico-chemical data for selected mycotoxins. *Pure of Applied Chemistry*, 54, 2219-2284.

Ranjan, K. S., Sinha, A. K. 1991. Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, *Indian Journal.of Science of. Food and Agriculture*, 56, 39-47.

Raper, K. B., Fennel, D. I. 1965. *The genus Aspergillus*. William and Wilkinsm New York, USA.

Rice, R.G., Farquhar, J. W., Bollyky, L. J. 1982. Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. *Ozone Science*, 4, 147-163.

Rizzo, A., Eskola, M., Atroshi, F. 2002. Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. *European Journal of Plant Pathology*. 108, 631-637.

Rousseau, J., 2003. Etude des facteurs de prévention et de réduction de la teneur en OTA dans les vins. 7^{ième} symposium International d'œnologie de Bordeaux.

Rousseau, J., Blateyron, L., 2002. Ochratoxine A dans les vins, priorité à la maîtrise sanitaire au vignoble. *Revue Française d'œnologie*, 104, 14-16.

Ruhland, M. Engelhardt, G., Schafer, W., Wallnoefer, P. R. 1996a. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants:1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension cultures of wheat and maize. *Natural toxins* 4, 254-260.

Ruhland, M. Engelhardt, G., Wallnoefer, P. R., Schafer, W. 1994. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in wheat and maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften*, 81, 453-454.

Ruhland, M., Engelhardt, G., Wallnoefer, P. R. 1996b. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants:2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. *Mycopathologia*, 134, 97-102.

Sage, L., Garon, D., Seigle-Murandi, F. 2004. Fungal microflora and ochratoxin A risk in French vineyards. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 5764-5768.

Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E. E. 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1306-1311.

Samson, R. A., Houbaken, J. Q. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., Frisvad, J. C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology*, 50, 45-61.

Sander, M., 1985. Mild ozone treatment of foods, such as fruit juices, milk, liquid dairy products, wine, oils, liquid medicaments, blood and/or similar products. German Federal Republic patent application no. DE3325568A1.

Schwenk, S., Altmayer, B., Eichhorn, K. W., 1988. Simultaneous detection of trichothecenes and rose nonolactone in grape juice and wine by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 448, 424-427.

Scott, P. M., Fuleki, T., Harwig, J. 1977. Patulin content of juice and wine produced from moldy grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 434-437.

Scudamore, K. A., Livesey, C. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of Science and Food Agriculture*, 77, 1-17.

Selim, M. I., Juchems, A. M., Popendorf, M. 1998. Assessing airborne aflatoxin B1 during on farm grain handling activities. *American Industrial Hygiene Association Journal* . 59, 22-256.

Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venancio, A. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 63-68.

Shen, S. K., Dow, P. F. 1991. Detoxification spectrum of the cigarette beetle symbiont *Symbiotaphrina kochii* in culture. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 60, 51-59.

- Skaug, M. A. 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 16, 75-78.
- Skrinjar, M., Rasic, J.L., Stojicic, V. 1996. Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiology*, 41:26-28.
- Smith, J. E., Lewis, C. W. 1994. Mycotoxins in human nutrition and health, European commission DG XII, science research and development, EUR 16048 EN.
- Smith, J. E., Moss, M. O. 1985. Mycotoxins. Formation, analysis and significance, John Wiley et Son, Chichester.
- Stander, M. A., Bornscheur, U. T., Henke, E., Steyn, P. S. 2000. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 11, 5736-5739.
- Stander, M. A., Steyn, P. S., van der Westhuizen, F. H., Payne, B. E., 2001. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypaptidase A. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 302-304.
- Steinman, R., Guiraud, P., Sage, L., Seigle-Murandi, F. 1994. New strains from Israël in the *Aspergillus niger* group. *Systematic and Applied Microbiology*, 17, 620-624.
- Steyn, P. S. 1980. "The biosynthesis of mycotoxins", Acad. Press, N.Y. and London.
- Suzzi, G., Romano, P., Ponti, I., Montuschi, C., 1995. Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 304-308.
- Sweeny, M. J. and Dobson, A. D. W., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 141-158.
- Szebiotko, K., Chelkowski, J., Dopierela, G., Godlewska, B., and Radomyska, W. 1981. Mycotoxins in cereal grain, part 1: ochratoxin, citrinin, sterigmatocystin, penicillic acid and toxigenic fungi in cereal grain. *Nahrung*. 25: 415-421.

- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Iamanaka, B. T. 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*. 82, 173-179.
- Téren, J., Palagya, A., Varga, J. 1997. Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. *Cereal Research Communications*, 25, 303-304.
- Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., and Kevei, F. 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*. 134:171-176.
- Thuvander, A., Paulsen, J.E., Axberg, K., Johansson, N., Vidnes, A., Enghardt-Barbieri, H., Trygg, K., Lund-Larsen, K., Jahrl, S., Widenfalk, A., Bosnes, V., Alexander, J., Hult, K., Olsen, M. 2001. Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food and Chemical Toxicology* 39, 1145-1151.
- Trenholm, H. L., Prelusky, D. B., Young, J. C., Miller, J. D. 1988. A practical guide the prevention of *Fusarium* mycotoxin in grain and animal feedstuffs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18, 443-451.
- Turner, W.B. Albridge D.C.: "fungal metabolites II", 1983, Acad. Press, N.Y. and London.
- Turner, W.B.: «Fungal metabolites», 1971, Acad. Press, N.Y. and London.
- Ueno, Y., 1998. Residue and risk of ochratoxin A in human plasma and beverages in Japan. *Mycotoxins* 47, 25-32.
- Ueno, Y., Kawamura, O., Sugiura, Y., Horiguchi, K., Nakajima, M., Yamamoto, K., Sato, S. 1991. Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. In: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N. and Bartsch, H., (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours*, (pp 71-75). IARC-Sci.-Publ., Lyon, France.

Urbano, G. R., Taniwaki, M. H., Leitao, M. F., Vicentini, M. C. 2001. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, 64, 1226-1230.

Valenta, H. chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids.1998. *Journal of Chromatography A*, 815, 75-92.

Valenta, H., Richter, W. 1998. Untersuchungen zur reversibilitaeteines ochratoxin A-Dekontaminationsverfahrens. In: 20. Mykotoxin-Workshop, 8-10 June 1998, Detmold: Bundesanstalt fuer Getreide, Kartoffel-und Fettforschung, 10.

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., and Fourie, L. 1965a. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Journal of Chemical Society*, 7083.

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., De Scott, B., and Theron, J.J. 1965b. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature (London)* 205,1112.

Varga, J., Kevei, E., Hamari, Z., Toth, B., Teren. J., Croft, H., Kozakiewicz, Z. 2000. Genotypic and phenotypic variability among black Aspergilli. In: Samson, R. A., Pitt, J. I. (eds), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands, pp. 397-411.

Varga, J., Kevei, E., Rimony, E., Teren, J., Kozakiewicz, Z. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4461-4464.

Varga, J., Kevei, F., Fekete, C., Coenen, A., Kozakiewicz, Z., Croft, J. H. 1993. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. *Mycology Research*, 97, 1207-1212.

Varga, J., Kevei, F., Vriesema, A., Debets, F., Kozakiewicz, Z., Croft, J. H. 1994. Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 612-621.

- Varga, J., Piétri, Z., Tabori, K., Téren J., Vagvolgyi, C. 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*. 99, 3, 321-328.
- 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., Rigo, K., Toth, B., Teren, J., Kozakiewicz, Z. 2003. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically Important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 29-36.
- Vinas, I., Dadon, J., Sanchis, V. 1993. Citrinin-producing capacity of *Penicillium expansum* strains from apple packinghouses of Lerida (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 19, 2, 153-156.
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 864, 89-101.
- Visser, J., Suykerbuyk, M., Kusters-Van Someren, M., Samson, R., Schaap, P. 1996. Classification of black aspergilli by RFLP analysis. In: Rossen, L., Rubio, V., Dawson, M. T., Frisvad, J. C. (eds), *Fungal identification techniques*, ECSC-EC-EAEC, Brussels, Belgium, pp. 194-201.
- Waffa, E.W., Yahya, R.S., Sobh, M.A., Eraky, I., El Baz, M., El Gayar, H.A.M., Betbeder, A.M., and Creppy, E.E. 1998. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human Experimental Toxicology*, 17,124-129.
- Walker, G.M., McLeod, A.H., Hogson, V.J., 1995. Interaction between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*,127, 213–222.
- Wegst, W., Lingens, F. 1983. Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters* 17:341-344.

Weiden Börner, M. 2001. Encyclopedia of food mycotoxins. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Germany, pp 181-187.

Westlake, K., Mackie, R.I., Dutton, M.F. 1987. Effects of several mycotoxins on specific growth rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation in vitro. Appl. Environ. Microbiol. 53:613-614.

WHO (World Health Organization), 2002. Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO technical report series, 906, Geneva, pp27-28.

Wicklow, D.T., Dowd, P.F., Alfatafta, A.A., and Gloer, J.B. 1996. Ochratoxin A: an antinsectan metabolite from the sclerotia of *Aspergillus carbonarius* NRRL 369. Canadian Journal of Microbiology, 42,1100-1103.

Wyllie, T. D., Morehouse, L. G. 1977. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses, vol. 1. Marcel Dekker, Inc., New York.

Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R. R., Li, S., Vodela, J. K., Frohlich, A. A., Kemppainen, B. W. 1996 b. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone forms and several of its analogs: structure-activity relationships. Toxicology and Applied Pharmacology, 137, 182-192.

Xiao, H., Marquardt, R. R., Abramson, D., Frohlich, A. 1996 a. Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. Applied and Environmental Microbiology, 62, 648-655.

Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M., Nishimura, K. 2001. Identification, classification, and phylogeny of the *Aspergillus* section Nigri inferred from mitochondrial cytochrome b gene. FEMS Microbiology Letters, 200. 241-246.

Zimmerli and Dick, 1996. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants, 13, 655-668.

Résumé:

L'étude de la dynamique des populations fongiques totales et ochratoxinogènes et du contenu en OTA des raisins de vignobles français nous a permis de déterminer en premier lieu l'agent causal responsable de cette contamination. Il s'agit principalement de l'espèce *Aspergillus carbonarius* suivie du groupe des *Aspergillus niger*. Le bassin méditerranéen et plus précisément le Languedoc-Roussillon était la région la plus contaminée à l'OTA en France et les raisins récoltés au stade vendange était à leurs maximum de contamination. Le stress occasionné chez certains champignons ochratoxinogènes par l'emploi de certains agents fongicides ou antimicrobiens pourrait être stimulateur de leur pouvoir ochratoxinogène. Ceci rend encore plus difficile la gestion sanitaire et la prévision de la contamination au sein du vignoble.

Dans le cadre de la gestion curative de l'OTA, les levures mortes traitées à la chaleur (*Saccharomyces servisiae* et *Saccharomyces bayanus*) avaient un pouvoir rapide et intéressant à adsorber l'OTA et seraient d'un grand intérêt pour l'élimination de la toxine. Les *Aspergillus* de la section Nigri avaient montré à la fois un potentiel d'adsorption et de dégradation de la toxine. L'efficacité d'*A. niger* et d'*A. japonicus* à éliminer l'OTA, leur faible impact sur la qualité des jus contaminés, le label GRAS accordé au premier et l'ochratoxigénicité rarement évoquée pour le deuxième, font de ces deux espèces un espoir dans la décontamination au sein de la filière.

Abstract:

During a survey conducted in France over three years in 10 vineyards from four winemaking regions with different geographical locations and climatic conditions, the ochratoxigenic potential of fungal isolates and their occurrence on grapes were studied. *A. carbonarius* was found the main OTA producer on French grapes and harvest time was the most critical period influencing OTA contamination. Grapes from Languedoc-Roussillon region were most infested with ochratoxigenic fungi and had the highest concentrations of OTA. Some fungicides and antimicrobials used in vineyards could stress fungi and stimulate their OTA production. This may be added to the various and complex factors determining OTA contamination in grapes and complicate prevention in vineyards. To manage this contamination, different microorganisms belonging to grape microbiota or with winemaking interest were tested for their capacity to remove OTA. Heat treated yeasts (*Saccharomyces servisiae* and *Saccharomyces bayanus*) showed an interesting potential to adsorb rapidly and totally OTA from grape juices. The black aspergilli species had both adsorption and degradation potentials. *A. niger* and *A. japonicus* were the most interesting in removing OTA and could be a new hope for Grape juices and musts decontamination.