



HAL
open science

Mycotoxines majeures et émergentes dans les filières cidre et vin : observatoire, lutte biologique au champ et devenir au cours des procédés.

Morvan Coarer, Olivier Puel, Sophie Lorber, H. Guichard, Jean J. Lemaguet, Nathalie Corroyer, A. Camponovo, Séverine Boiry, M. Sabaty, Le Maguet, et al.

► To cite this version:

Morvan Coarer, Olivier Puel, Sophie Lorber, H. Guichard, Jean J. Lemaguet, et al.. Mycotoxines majeures et émergentes dans les filières cidre et vin : observatoire, lutte biologique au champ et devenir au cours des procédés.. Innovations Agronomiques, 2021, 82, pp.246-261. 10.15454/6z4f-7s10 . hal-03499869

HAL Id: hal-03499869

<https://hal.inrae.fr/hal-03499869>

Submitted on 25 Jan 2022

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Mycotoxines majeures et émergentes dans les filières cidre et vin : observatoire, lutte biologique au champ et devenir au cours des procédés

Coarer M.¹, Puel O.³, Lorber S.³, Puel S.³, Guichard H.², Le Maguet J.², Corroyer N.⁴, Camponovo A.¹, Boiry S.⁵, Sabaty M.⁵, Caboulet D.¹ Solanet D.¹

¹ IFV – Centre de ressources biologiques, F-44120 Vertou

Pôle Rhône Méditerranée Provence, F-30230 Rodilhan

Pôle Rosé, F-83500 Vidauban

² IFPC – Domaine de la Motte, F-35650 Le Rheu

La Rangée Chesnel, F-61500 Sées

³ Toxalim (Centre de Recherche en Toxicologie Alimentaire), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, F-31027 Toulouse

⁴ Chambre régionale d'agriculture de Normandie, F-76237 Bois-Guillaume Cedex

⁵ CEA - Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, BIAM, UMR7265, PHYTOTEC, F-13108 Saint Paul-Lez-Durance

Correspondance : morvan.coarer@vignevin.com

Résumé

3500 échantillons de flores fongiques ont été étudiés d'après leur diversité et leur potentiel antagoniste vis-à-vis des flores mycotoxinogènes. 45 ont été caractérisées vis à vis leur capacité à inhiber *in vitro* la croissance de *Penicillium expansum* et d'*Aspergillus carbonarius* ainsi que la production de patuline et d'ochratoxine A. Les souches les plus prometteuses ont été testées comme antagonistes au vignoble et au verger bio et conventionnel ainsi qu'en élaboration avec différents degrés de réussite. La filière cidre dispose, à la suite de ce programme, d'une méthode de marquage de la patuline au ¹³C. Les tests de cytotoxicité menés sur l'ascladiol et l'acide desoxyapatulinique ont montré leur absence de toxicité. Enfin, les deux filières disposent de méthodes de criblage pour mettre rapidement en œuvre des expérimentations complémentaires en cas de contamination naturelle liée aux évolutions du climat et des pratiques.

Mots-clés : Ochratoxine A, patuline, marquage, antagoniste, ascladiol, acide desoxyapatulinique.

Abstract: Major and emerging mycotoxins in the cider and wine sectors: observatory, biological control in the field and fate during the processes

3500 samples of fungal flora were studied for their diversity and their potential to antagonize mycotoxinogenic flora. 45 were characterized with respect to their ability to inhibit *in vitro* the growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus carbonarius* as well as the production of patulin and ochratoxin A. The most promising strains were tested as antagonists in organic and conventional vineyards and orchards as well as in production with varying degrees of success. Following this program, the cider industry has a patulin labeling method with ¹³C. The cytotoxicity tests carried out on ascladiol and deoxyapatulinic acid showed their absence of toxicity. Finally, the two sectors have screening methods to quickly set up additional experiments in the event of natural contamination linked to changes in climate and practices.

Keywords: Ochratoxin A, patulin, labeling, antagonist, ascladiol, deoxyapatulinic acid.

Introduction

Le changement climatique, la réduction du nombre de molécules phytosanitaires autorisées, l'adoption de pratiques plus agroécologiques sont susceptibles d'entraîner des modifications des écosystèmes microbiens sur les cultures. Ces évolutions peuvent avoir un impact sur la sécurité alimentaire des filières agricoles, notamment celles des pommes à cidre et des raisins de cuve, deux cultures pérennes destinées à la production de boissons (jus et boissons alcoolisées).

L'objectif de ce projet était d'anticiper les risques de contaminations futures des boissons par des mycotoxines émergentes en effectuant un recensement au champ, et de répondre à la question de la métabolisation pour les mycotoxines avérées. Pour éviter des situations d'impasse technique, l'utilisation de micro-organismes compétiteurs comme moyen de lutte biologique au champ a été étudiée, et les résultats transférés aux acteurs du développement.

Enfin, le devenir des toxines avérées a été envisagé au cours des fermentations pour la première fois grâce à la mise au point d'une méthode de marquage par isotopes.

1. Présentation du projet

Le projet se divise en trois actions :

- La première action vise à faire un état des lieux des flores toxigènes présentes au champ.

Deux grands objectifs sont visés : obtenir un panel de la flore existante pour évaluer le risque mycotoxinogène sans *a priori*, et répondre spécifiquement à la question de l'évaluation du risque de production sur des mycotoxines émergentes.

- La deuxième action concerne l'étude de l'utilisation de micro-organismes antagonistes comme moyens de lutte au champ, pour répondre aux défis du plan EcoPhyto 2018.
- La troisième action s'attache à étudier les modifications qualitatives et quantitatives des mycotoxines au cours des procédés de transformation et l'intérêt des microorganismes naturels (levures, bactéries lactiques) sur le devenir de ces composés.

Dans ce projet, les 5 partenaires, auteurs de cet article, ont bénéficié d'un financement via le fonds d'Appel à Projets du CASDAR Recherche Technologique 2015.

L'IFV et l'IFPC ont apporté les connaissances spécifiques filière dans la sélection des sites de collecte et des expérimentations portant sur les procédés d'élaboration, également dans l'interprétation des résultats et leur contextualisation. INRAE a apporté ses compétences et son expertise en matière de synthèse et d'analyse des mycotoxines et des phénomènes de compétition ainsi que dans le domaine de la toxicologie. Le CEA a contribué à développer la méthode de synthèse de la patuline marquée ^{13}C .

Le partenariat a permis des échanges de protocoles et de matériel biologique, bénéficiant aux deux filières dans la recherche de microorganismes potentiellement compétiteurs. La principale difficulté a été d'ordre logistique avec une contrainte forte pour l'acheminement des échantillons entre les différents sites du fait de la répartition des équipes sur le territoire.

La communication sur le projet a pu être ciblée auprès des interlocuteurs potentiels qui sont les acteurs de la recherche et les entreprises amont des filières mettant au point des solutions de biocontrôle.

2. Collecte et étude des flores

2.1 Organisation, sites de collecte, bio / conventionnel / méthode / protocoles / solutions de rinçage

2.1.1 Organisation, sites de collecte

En ce qui concerne la diversité des flores uvaies, l'estimation de la variabilité spatiotemporelle au sein de deux parcelles géographiquement proches de l'Appellation « Muscadet de Sèvre et Maine » conduites l'une en bio, l'autre de manière conventionnelle, et appartenant à la même exploitation (Domaine de la Bareille, L'Herbray à Vertou) a été réalisée. L'étude s'est déroulée sur trois années consécutives (2016, 2017, 2018). Les deux premières années, il a été procédé à des prélèvements de grappes ou morceaux de grappes à différents stades du cycle végétatif : mi-floraison, véraison et récolte. La dernière année, un focus a été réalisé sur la date de récolte avec des prélèvements 7 jours avant et 7 jours après la date optimale de vendange. Afin d'éviter tout prélèvement destructif, les baies sélectionnées de manière aléatoire sur la parcelle étaient lessivées avec une solution de rinçage. Comme pour la pomme, et quand c'était possible, des isolements différenciés ont concerné trois compartiments différents : épicarpe, mésocarpe et l'ensemble rafle, pédoncule et pédicelle. Ce sont ainsi 750 isolements de microorganismes qui ont été traités. Après ensemencement sur milieu nutritif (YM), les souches de moisissures et de levures étaient isolées et leur ADN extrait. Après amplification par PCR et restriction de la région ITS, suivies si nécessaire d'un séquençage, l'appartenance spécifique de la souche était déterminée.

La diversité des flores sur pommes à cidre a également été étudiée de 2016 à 2018. La première année, les prélèvements ont été réalisés sur 18 sites répartis dans le nord-ouest de la France et représentant des modes de conduites variés (conventionnels, agriculture biologique, bas intrants). Les deux années suivantes, les échantillons ont été prélevés dans un nombre plus restreint de vergers. Pour l'ensemble des prélèvements, les différentes variétés de pommes ont été récoltées à maturité, au sol.

2.1.2 Mise au point des solutions de rinçage

Le choix préalable ayant été fait de privilégier les prélèvements non-destructeurs pour étudier les flores, il s'est révélé nécessaire d'étudier différentes solutions de rinçage permettant la récupération d'un maximum d'espèces différentes à partir des baies de raisin ou des pommes. Pour ce faire, trois solutions de rinçage ont été testées sur un lot homogène de baies de raisin. Le nombre d'espèces différentes ainsi que l'abondance de chacune de ces espèces ont été mesurés en fonction de la solution de rinçage utilisée.

Les différents essais ont montré que la solution B (Eau + NaCl 0.5 % + Tween 80 1 %) était la plus adaptée.

2.2 Résultats

2.2.1 Cidre

Pour chaque échantillon récolté en 2016, des lessivages ont été effectués au niveau des 3 compartiments épicarpe (peau), mésocarpe (pulpe), pépins, permettant l'isolement de 865 colonies de microorganismes. Après amplification répétée de l'ADN par PCR ITS, environ 20 % de ces isolements n'ont livré aucune bande, sans doute car il s'agit de bactéries. Pour les autres, toutes les caractérisations n'ont pas débouché sur une identification taxonomique fiable et devront être complétées par de nombreux séquençages. Il est cependant possible de conclure dès à présent à une assez grande diversité fongique avec la présence récurrente d'espèces ubiquistes comme *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, et de nombreux *Penicilli* dont *P.*

brevicompactum (producteur d'acide mycophénolique) et sans doute *P. expansum* (citrinine, ochratoxine, roquefortine, géosmine et surtout patuline). Les levures des genres *Rhodotorula* et *Sporobolomyces* ainsi que *Hanseniaspora uvarum* et *Metschnikowia pulcherrima* sont eux aussi semble-t-il bien représentés. Il apparaît que ni le mode de production ni la variété ne semblent induire de variation significative de la structure des populations. Dans les échantillons récoltés les années suivantes, la structure des populations fongiques reste similaire, et peu de *Penicilli* ont été isolés. Concernant les compartiments du fruit analysés, c'est dans l'épicarpe que se trouve la plus grande diversité. Les pépins sont moins souvent atteints mais peuvent livrer des populations différentes de celles présentes à l'extérieur du fruit, on y trouve beaucoup moins d'*Aureobasidium* et quelques *Cladosporium*. *Metschnikowia* quant à elle, y est beaucoup plus présente, avec un switch *Metschnikowia/Rhodotorula*.

2.2.2 Vin

La première constatation est une diversité fongique relativement faible (en général moins de 10 espèces par organe), avec la présence récurrente et majoritaire d'espèces ubiquistes comme *Aureobasidium pullulans* et *Cladosporium cladosporioides*. Au cours de ces trois années, *Botrytis cinerea* n'a été retrouvé de manière sporadique qu'à la floraison. Outre cette présence de pourriture grise et celle d'*Alternaria* à la floraison on ne note pas de variation massive dans la structure des populations tant au niveau temporel qu'au niveau géographique, si ce n'est, deux années sur trois, une augmentation significative des levures appartenant aux genres *Vishniacozyma*, *Metschnikowia* et *Sporobolomyces* au moment de la récolte.

On note deux années sur trois, à travers le nombre d'espèces différentes présentes, une augmentation croissante de la diversité au cours du cycle végétatif. Parallèlement, on ne note que peu de différences entre les différents compartiments, si ce n'est au niveau du mésocarpe, pour lequel des contaminations dues aux manipulations ne sont pas du tout exclues.

Parallèlement, on ne note que peu de différences entre les populations présentes sur baie et celles présentes sur rafle. La fleur, quant à elle, se démarque nettement avec la présence massive d'*Aureobasidium*, mais cela peut être aussi dû à la différence de temporalité.

Le mode de production ne semble pas induire de variation significative de la structure des populations, même si des différences apparaissent de manière sporadique (présence massive de *Penicillium* en bio à la récolte en 2016). Comme pour la pomme, celles-ci sont dominées par le duo *Aureobasidium pullulans* et *Cladosporium cladosporioides* que viennent compléter éventuellement les genres *Botrytis* et *Fusarium*, des pathogènes occasionnels des feuilles et des fruits, divers champignons lignivores ainsi que plusieurs levures oxydatives. Pour ce qui est du nombre d'espèces différentes, l'étude met en évidence l'importance de l'effet millésime (lié sans doute aux seules conditions météorologiques) et semble aussi montrer une certaine croissance de la biodiversité au cours du cycle végétatif, même si l'année 2018 ne vient pas confirmer ce fait. Quand il n'est pas soumis à des variations climatiques trop brusques, le moment de la récolte n'est, semble-t-il, pas une période de grands changements, même si l'équilibre entre les levures, théoriquement favorisées par les exsudats des baies, et des champignons filamenteux de type *Botrytis* peuvent être modifiés. Si l'on exclue la pulpe, compartiment peu concerné par les microorganismes, on ne note pas de différences majeures entre les populations de l'épicarpe (pellicule) et de la rafle. Il n'est pas exclu que si des différences apparaissent parfois, elles soient dues à une plus grande exposition de la surface des baies aux éléments. Enfin, dans la région concernée (Pays Nantais), il n'a pas été retrouvé d'espèces réputées pour leur importante production de mycotoxines, si ce n'est quelques *Penicillium griseofulvum* (patuline, griséofulvine, acide fulvique, ...) et *Alternaria alternata* (Alternariol et autres toxines alternariques).

3. Tests de compétition *in vitro*

3.1 Matériels et méthodes

Les souches de *Penicillium expansum* (NRRL 35695, vignoble du Languedoc-Roussillon) et d'*Aspergillus carbonarius* (S402, vignoble libanais) ont été cultivées sur milieu gélosé à base d'extrait de malt (MEA) (Biokar diagnostics, Allone) dans des boîtes de Pétri pendant sept jours à 25°C à l'obscurité. Une suspension de spores a été réalisée et quantifiée (cellule de Malassez) à partir de ces précultures. Des boîtes contenant du MEA ont été inoculées (10 µL d'une solution à 10⁵ spores/mL) et mises en confrontation en étalant une strie des souches de levure à 4,5 cm de l'inoculum puis incubées comme précédemment. Les diamètres des colonies ont été mesurés à la fin de l'incubation et trois répliquats ont été réalisés. Huit souches de levure, *Saccharomyces uvarum* 73, *Metchnikowia pulcherrima* 183, *Metchnikowia pulcherrima* 31, *Candida boidinii* CD1, *Candida Santamariae* CX, *Candida norvegica* CS1, *Candida norvegica* CS2, *Candida norvegica* CL1 (IFPC, Le Rheu) ont été testées pour *P. expansum* et 35 (27 fournies par l'IFV (Tableau 1), Vertou et les huit fournies par l'IFPC) pour *A. carbonarius*. Des bandes de gélose ont ensuite été prélevées à l'aide d'un scalpel et extraites séparément par 10 mL d'acétate d'éthyle sur une table à agitation horizontale (148 rpm, 72h). Après évaporation, les extraits ont été analysés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (CLHP-DAD) (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Courtabœuf). La patuline (PAT) est détectée à 277 nm (Zetina-Serrano *et al.*, 2020) et l'ochratoxine A (OTA) à 315 nm (colonne Luna[®] C18, 150 x 2 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, USA ; gradient isocratique : 60 % acide acétique à 0,2 % / 40 % acétonitrile). Les concentrations en PAT et OTA sont calculées sur la base d'une gamme étalon.

3.2 Résultats et discussion

L'effet antagoniste prend en compte la croissance du mycélium des moisissures et également la sécrétion des métabolites secondaires : la PAT, principale mycotoxine de *P. expansum* et l'OTA, celle d'*A. carbonarius*.

3.2.1 Confrontation avec *Penicillium expansum*

La plupart des souches de levure a montré un effet antagoniste vis-à-vis de *P. expansum* par une inhibition du développement de son mycélium. Pour les souches les plus inhibitrices (*M. pulcherrima* 31, *M. pulcherrima* 183, *S. uvarum* 73), trois fragments du milieu gélosé ont été analysés par CLHP, deux de part et d'autre du champignon (1 et 2) et un fragment à proximité de la levure (3) (Figure 1).

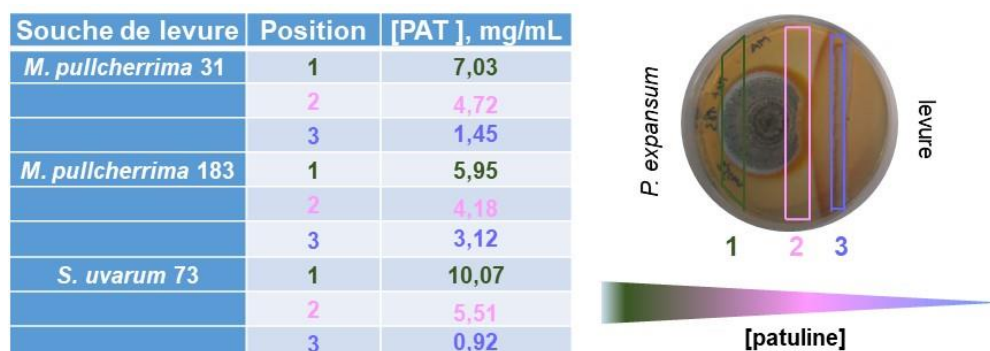


Figure 1 : Concentration en patuline (PAT) dans les trois fragments de gélose sur laquelle se sont développés *P. expansum* et les souches de levure. Moyenne de trois répliquats.

En général, la concentration en PAT est la plus forte dans la partie du champignon la plus éloignée de la levure (partie 1) puis intermédiaire dans la partie 2 pour se retrouver la plus faible dans la partie la plus proche de la levure (partie 3). Par conséquent, il y a un effet inhibiteur des trois souches de levures

sur la production de PAT par *P. expansum* (Figure 1). Un effet inhibiteur des souches de levure sur la production de l'ensemble des métabolites secondaires a également été observé.

3.2.2 Confrontation avec *Aspergillus carbonarius*

Dans l'ensemble, les souches de levure ont montré peu d'effet sur la croissance du champignon (Figure 2).

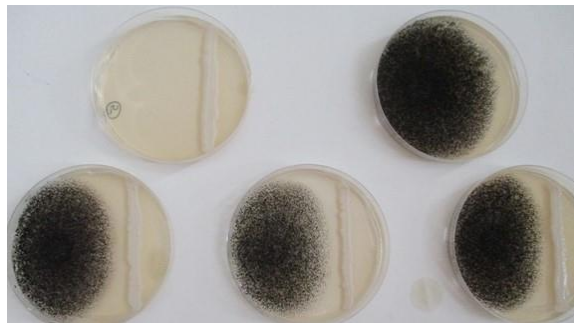


Figure 2 : Effet de la souche de levure NL 863 (*Candida cantarelli*) sur la croissance d'*Aspergillus carbonarius*

Sur les 35 souches testées (Tableau 1), 22 entraînent une baisse de la concentration en OTA (Figure 3A), avec des taux d'inhibition de 14,95 % pour la souche TANDEM (*Torulaspora delbrueckii*) à 87,53 % pour la souche NL 828 (*M. pulcherrima*) (Figure 3B).

Tableau 1 : Souches de levures fournies par l'IFV pour tester la confrontation *in vitro* avec *A. carbonarius*

Souche IFV	Genre espèce
NL 769	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i>
NL 828	<i>Metchnikowia pulcherrima</i>
NL 846	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
NL 862	<i>Pichia anomala</i>
NL 863	<i>Candida cantarelli</i>
NL 888	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>
NL 914	<i>Pichia fermentans</i>
NL 1015	<i>Pichia fluxuum</i>
NL 1568	<i>Rhodotolura graminis</i>
NL 3804	<i>Aureobasidium pullulans</i>
NL 3844	<i>Candida pyralidae</i>
NL 4514	<i>Candida formata</i>
NL 4591	<i>Zygosaccharomyces parabailii</i>
NL 4593	<i>Metchnikowia chrysoperlae</i>
NL 14726	<i>Metchnikowia fructicola</i>
NL 14746	<i>Candida boidinii</i>
NL 16037	Pas encore identifiée
TANDEM	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
Concerto	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
H.O.	<i>Hanseniaspora occidentalis</i>
FROOTZEN	<i>Pichia kluyveri</i>
GAIA	<i>Metchnikowia fructicola</i>
26A4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i> (nom commercial : Levulia Esperide)
RMn05	-
3477	-
K.W.	<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>
P.A.	<i>Pichia anomala</i> II

Il est intéressant de noter que les souches de levures inhibant la production de PAT telles que la souche SU73 réduisent également la production d'OTA. *S. uvarum* est retrouvée naturellement dans les pommes et intervient dans la fabrication du cidre (Leguerinel *et al.*, 1989).

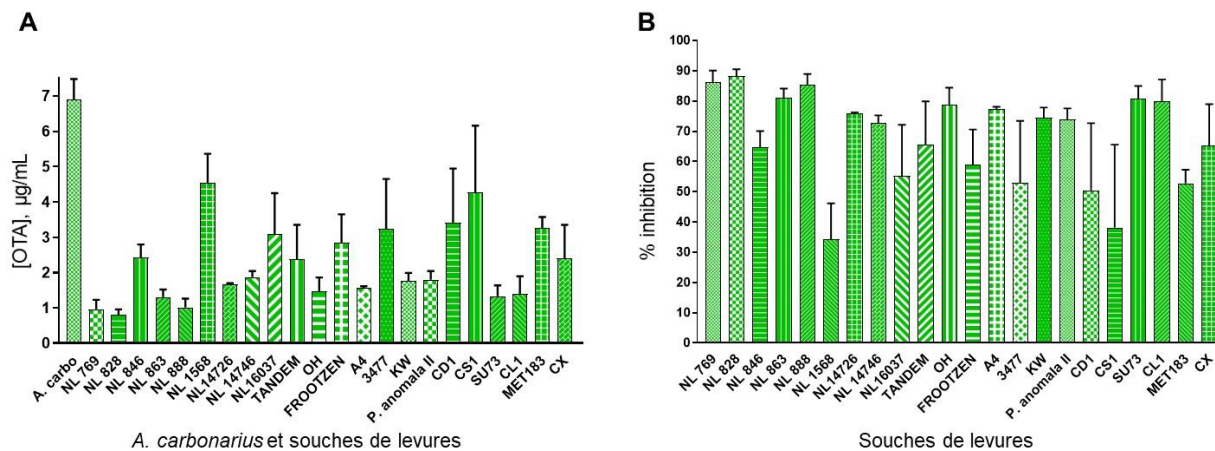


Figure 3 : Inhibition de la production d'OTA par les souches de levures. A) Concentration d'OTA produite par *A. carbonarius* seul et en confrontation avec les souches de levures ; B) Taux d'inhibition de l'OTA par les souches de levures. Moyenne de trois répliquats.

M. pulcherrima a déjà démontré son aptitude à être employée en tant qu'agent de biocontrôle contre divers champignons mycotoxinogènes (Saravanakumar *et al.*, 2008).

4. Essais de compétition au champ

4.1 Pomme

Divers micro-organismes compétiteurs ont été testés par l'IFPC et la CRAN afin d'étudier leur capacité à lutter contre les maladies de conservation, notamment *Penicillium expansum*. Les modalités testées ainsi que les principaux résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Synthèse des essais de lutte biologique au verger menés par l'IFPC et la CRAN à l'aide de micro-organismes compétiteurs

Partenaire - Année - Site d'essai	Modalités testées	Traitements	Observations post-récolte	Principaux résultats
IFPC verger 1 – 2016 Variété : Bedan Porte greffe : M106	Témoin non traité	Pulvérisation 1 ou 3 semaines avant récolte	Suivi de l'évolution des pourritures au sol sur l'herbe en conditions extérieures sur des lots de 100 fruits/modalité pendant 40 jours	Pas de différences statistiques entre modalités
	<i>Candida oleophila</i>			
	Référence (fludioxonil)			
IFPC conditions semi contrôlées 1 – 2016 Variétés : Kermerrien et Douce-Moen	Témoin eau	Trempage	Suivi de l'évolution des pourritures au sol sur l'herbe en conditions extérieures sur des lots de 100 fruits/modalité pendant 60 jours	Peu significatif sauf en fin d'expérimentation : meilleures protections par rapport au témoin
	<i>Candida oleophila</i>			
	Silicium bioassimilable			
	Bicarbonate de potassium			
	Référence (fludioxonil)			

Partenaire - Année - Site d'essai	Modalités testées	Traitements	Observations post-récolte	Principaux résultats
CRAN – 2017 Verger de 30 ans situé en Seine-Maritime conduit en agriculture biologique depuis 2009. Variété : Saint Martin Porte greffe M106	Témoin non traité	Pulvérisation au pulvérisateur à dos Application 5 jours avant récolte ou trempage à récolte Etude des modes de récolte au sol vs sur l'arbre	Suivi de l'évolution des pourritures au sol sur l'herbe en conditions extérieures sur des lots de 100 fruits/modalité pendant 40 jours	Pas de différences statistiques entre les traitements et le témoin Confirmation que la récolte dans l'arbre améliore la conservation
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> : solution à 10 ⁷ ufc/ml + gluconate de calcium 2 g/l diluée dans 3 litres d'eau			
IFPC Verger 1 – 2018 Variété : Kermérien Porte-greffe : M106	Témoin non traité	Pulvérisation 15 ou 3 jours avant récolte	Suivi de l'évolution des pourritures au sol sur l'herbe en conditions extérieures sur des lots de 100 fruits/modalité pendant 60 jours	Gain apporté par <i>Bacillus</i> par rapport au témoin
	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>			
	Référence (fludioxonil)			
IFPC Verger 2 – 2018 Variété : Douce Moën Porte greffe : M106	Témoin non traité	Pulvérisation 3 jours avant récolte	Suivi de l'évolution des pourritures au sol sur l'herbe en conditions extérieures sur des lots de 100 fruits/modalité pendant 40 jours	Pas de différences statistiques entre modalités
	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>			
	Référence (fludioxonil)			
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>			
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> + gluconate de calcium			
Gluconate de calcium				
CRAN – 2018 Verger de 25 ans situé en Seine-Maritime conduit en agriculture biologique depuis 2009. Variété : Douce Moën Porte greffe : M106	Témoin non traité	Pulvérisation au pulvérisateur à dos 1 à 3 applications avant récolte Récolte au sol	Suivi de l'évolution des pourritures au sol sur l'herbe en conditions extérieures sur des lots de 100 fruits/modalité pendant 60 jours	Pas de différences statistiques entre modalités Pourritures dues essentiellement à <i>Phytophthora</i> (sensibilité variétale)
	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>			
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>			
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> + gluconate de calcium			
	Gluconate de calcium			

Les conditions de récoltes ont été plutôt bonnes sur l'ensemble des essais, avec peu de précipitations, ce qui n'a pas favorisé le développement des maladies de conservation. Les résultats des essais réalisés sur ces trois années sont donc assez mitigés. Le développement de *Penicillium* a en effet été peu observé dans les lots non traités, ce qui rend les éventuelles différences difficilement interprétables.

4.2 Raisin

Le choix a été fait d'étudier prioritairement l'impact de compétiteurs potentiels sur la contamination par l'Ochratoxine A sur des vignes contaminées par *Aspergillus carbonarius*. Afin de s'assurer de disposer de conditions favorables à la réalisation de l'expérimentation, une contamination préalable par *Aspergillus* est incluse dans le protocole. Les baies sont piquées quelques jours avant inoculation du pathogène pour simuler une blessure et favoriser l'implantation d'*Aspergillus*. Un mélange spores / mycélium de ce dernier est ensuite pulvérisé. Le test des deux compétiteurs sera réalisé environ une semaine plus tard. Deux parcelles ont été sélectionnées, l'une de Syrah en mode conventionnel dans

l'AOP Minervois, l'autre de Carignan en bio dans l'AOP Corbières. Sur chacune de ces parcelles des pieds n'ont subi aucune autre intervention alors que d'autres ont été intentionnellement inoculés après perforation des baies avec deux souches types d'*A. carbonarius* (MUCL 052582 et MUCL 052583 isolées sur raisin en France). En 2016, *Aspergillus carbonarius* n'a pas été retrouvé sur la parcelle bio, contrairement à la parcelle conventionnelle où il n'est présent que sur les ceps inoculés au niveau de la rafle et de l'épicarpe. Ceci montre que si la méthode de contamination peut être efficace, son succès est aléatoire. L'installation d'*A. carbonarius* en présence d'*A. pulullans* et *C. cladosporioides* semble confirmer l'incapacité de ces deux espèces à empêcher la colonisation par *A. carbonarius*.

En 2017, les conditions climatiques particulières (sécheresse prolongée) ont empêché le déroulement correct de l'expérimentation au champ.

En 2018, les inoculations d'*A. carbonarius* ont été effectuées dans de bonnes conditions. Deux compétiteurs potentiels (C1 *Candida norvegica* CL1 et C2 *Metschnikowia pulcherrima* MET183), candidats au biocontrôle, ont ensuite été pulvérisés sur les baies une semaine après l'inoculation d'*Aspergillus*.

Parallèlement, la présence d'*A. carbonarius* sur les témoins inoculés (respectivement 39 et 22 % en bio et en conventionnel) montre que, soit ce microorganisme était présent de manière endogène préalablement à l'inoculation, soit la contamination a connu un certain succès. On constate par contre l'absence totale d'isolement du compétiteur 1 *Candida norvegica*, il est donc peu probable que celle-ci se soit implantée, tout du moins de manière durable. A contrario, *Metschnikowia* se retrouve sur tous les échantillons compétiteurs en conventionnel et est absente des échantillons ensemencés MET183 en bio, mais présente dans la modalité concernant l'autre compétiteur. On ne peut donc conclure en l'état à la bonne implantation de ce compétiteur en conventionnel, les souches isolées pouvant aussi correspondre à une autre souche que MET183, alors que l'échec de l'implantation en bio est patent. L'absence d'*Aspergillus carbonarius* sur les deux modalités compétiteurs en bio montre soit un défaut de la contamination initiale sur les plants, soit une efficacité relative des compétiteurs avant leur hypothétique disparition. Sa présence en des proportions comparables au témoin en conventionnel semble en tout cas indiquer une inaptitude relative des compétiteurs à son biocontrôle.

Cette expérimentation montre clairement la difficulté qu'il y a à obtenir, dans un premier temps, des plants où la présence d'*A. carbonarius* est avérée : inefficacité de la contamination, mauvaises conditions météorologiques, implantation aléatoire, fragilisent la méthode employée. De surcroît, l'implantation des éventuelles solutions de biocontrôle est, elle aussi, loin d'être assurée dans les conditions de l'essai, en tout cas de manière pérenne, ce qui serait pourtant nécessaire à une bonne maîtrise des espèces non désirées. En l'état, les protocoles doivent être repensés si de nouvelles études d'efficacité des solutions de biocontrôle venaient à être menées, du moins dans des conditions méditerranéennes.

5. Essais de compétition en cours d'élaboration

5.1 Protocole de marquage des mycotoxines pour suivre les produits de dégradation

Afin de suivre les dégradations des deux toxines, l'ochratoxine (OTA) et la patuline (PAT), l'utilisation de toxines marquées avec des isotopes stables (carbone ^{13}C et azote ^{15}N) à des enrichissements intermédiaires (20 à 30 %) permet de générer lors des analyses en spectrométrie de masse des massifs isotopiques caractéristiques. Tous les composés issus de cette molécule ainsi marquée présentent aussi ce massif caractéristique. Ainsi la mise en évidence des produits de dégradation s'en retrouve grandement facilitée. L'OTA uniformément marquée avec du carbone ^{13}C étant disponible dans le commerce, seule la PAT marquée à hauteur de 20 % ^{13}C a été générée dans le cadre de ce projet.

La technique mise au point depuis plusieurs années par l'équipe INRAE consiste à produire des molécules marquées en cultivant les espèces fongiques productrices de ces molécules sur des grains de blé marqués. Les champignons étant des organismes hétérotrophes, tout atome de carbone et d'azote les constituant proviennent du substrat sur lequel ils ont poussé.

La première étape a résidé à générer du blé enrichi en ^{13}C à un niveau d'enrichissement de 20 %.

Du blé tendre d'hiver, variété Cap Horn a été marqué au carbone 13 dans la plateforme PHYTOTEC du CEA de Cadarache, en vue de produire des mycotoxines marquées. La plateforme possède des chambres de culture hermétiquement closes permettant de contrôler l'ensemble des paramètres environnementaux et d'enrichir les plantes en ^{13}C par injection de $^{13}\text{CO}_2$ (Figure 4). Le semis a été réalisé sur un substrat inerte ($\frac{1}{4}$ sable et $\frac{3}{4}$ perlite) et maintenu à 6°C pendant 40 jours. La température a été augmentée progressivement pour permettre le tallage et arriver aux conditions de culture optimales soit 21°C le jour et 18°C la nuit avec une photopériode de 14h / jour et une intensité lumineuse de $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. La concentration en CO_2 a été maintenue à 400 ppm. La culture était arrosée avec une solution nutritive Hoagland. Peu avant l'apparition des épis, le CO_2 injecté dans la cellule a été remplacé par un mélange $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ contenant 23 % de $^{13}\text{CO}_2$. Les 430 g de grains de blé obtenus après récolte, présentaient un taux d'enrichissement en ^{13}C de 21 %.

Le marquage par le carbone ^{13}C est onéreux. Ainsi, avant de produire les grains marqués, des cultures fongiques préliminaires ont été réalisées afin de sélectionner la variété de blé. La variété Cap Horn a été choisie. Des trois espèces fongiques testées (*Aspergillus clavatus*, *Penicillium expansum* et *Byssoschlamys nivea*), la plus productrice a été sans conteste *Penicillium expansum* (NRRL 35695). La température de croissance a été fixée à 25°C et la durée des cultures fixée à 7 jours. A la réception des grains marqués ^{13}C (20 %) fournis par PHYTOTECH (CEA Cadarache), une culture de *Penicillium expansum* a été réalisée selon le protocole décrit par Péan *et al.* (2007) et Cano *et al.* (2013). De grandes quantités de PAT, d'ascladiol (ASCL) et de DPA ont été produites.



Figure 4 : Culture de blé dans une chambre hermétiquement close permettant l'enrichissement avec du $^{13}\text{CO}_2$

5.2 Essais en conditions réelles

Au vu des connaissances actuelles, il était important de vérifier le devenir de la patuline lors de la fermentation de produits cidricoles, notamment avec une souche levurienne caractéristique, *Saccharomyces uvarum* (Su 200), afin de déterminer si l'ascladiol, métabolite et précurseur connu de la patuline, est le seul composé issu de cette dégradation.

Ainsi, la Figure 5 présente les données obtenues pour une dose de $500 \mu\text{g}/\text{L}$. On constate que la patuline est dégradée très rapidement lors de la phase de croissance des levures. Dès la phase stationnaire (aux alentours de $1050 \text{ kg}/\text{m}^3$), aucune trace de patuline n'est retrouvée. Bien que nous

pensions retrouver de l'ascladiol, celui-ci n'a été détecté dans aucun des échantillons. Il reste donc encore un doute quant aux métabolites formés lors de la dégradation de la patuline. Il serait nécessaire ici de travailler avec de la patuline marquée (^{13}C) afin d'avoir une chance de déterminer ces molécules.

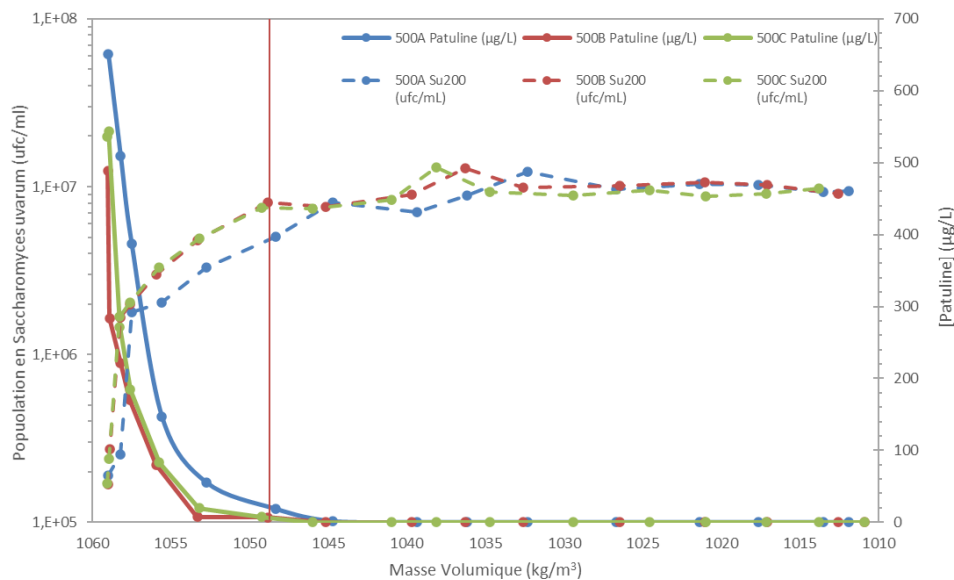


Figure 5 : Croissance de *Saccharomyces uvarum* pour une dose de patuline ajoutée de 500µg/L (en pointillés) ; suivi de la dégradation de la patuline (en traits pleins)

La Figure 6 retrace les évolutions de masse volumique des différents échantillons. Les vitesses de fermentation ne sont pas identiques mais la patuline n'a pas d'influence sur ces évolutions. En effet, nous n'observons pas de graduation de ces évolutions en fonction de la dose. D'autre part, toutes les fermentations se sont déroulées en atteignant un point final entre 1015 et 1010 kg/m³. Ces valeurs sont tout à fait compatibles avec des cidres bruts. Nous avons stoppé les fermentations du fait de la longueur des expérimentations (75 jours). Cependant, du fait des vitesses résiduelles de ces fermentations, on peut affirmer que toutes auraient atteint la masse volumique de 1010 kg/m³.

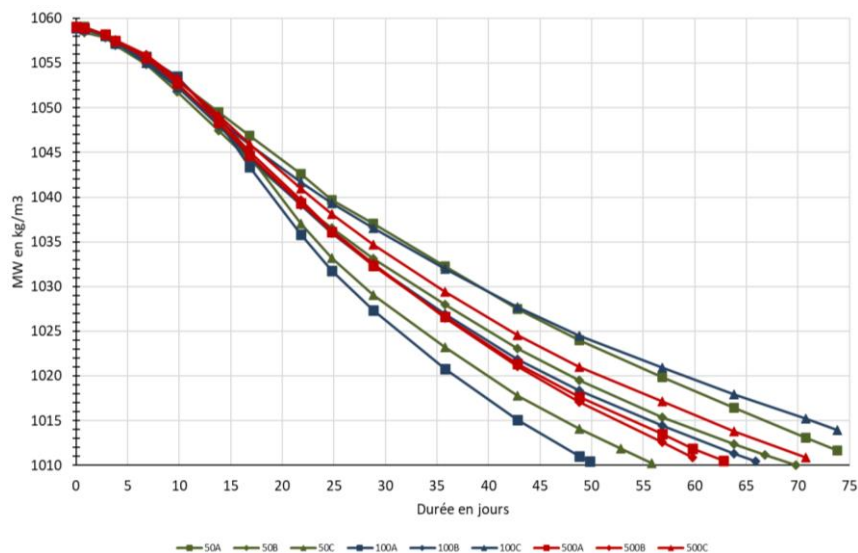


Figure 6 : Suivi des masses volumiques lors de fermentation conduite avec *Saccharomyces uvarum* et différentes doses de patuline

En premier point, on peut donc conclure que *Saccharomyces uvarum* n'est nullement perturbée par des doses de patuline importantes (500 µg/L). Par conséquent, la présence de patuline dans des doses classiques rencontrées en cidrerie (< 50 µg/L) n'aura pas d'impact sur la fermentation.

La patuline est dégradée très rapidement pendant la phase de croissance de la levure. En dessous d'une masse volumique de 1050 kg/m³, nous n'avons plus détecté de patuline. Ainsi, quel que soit le type de cidre visé, du doux au brut, il n'y aura pas de patuline résiduelle présente.

Enfin, nous n'avons pu déterminer les métabolites issus de la dégradation de la patuline. Celui attendu, à savoir l'ascladiol, n'a été retrouvé dans aucun échantillon. La question de la transformation de la patuline en d'autres molécules reste donc complètement ouverte. Il serait nécessaire pour avancer sur cet aspect, de réaliser des expérimentations en utilisant de la patuline marquée au ¹³C. Cela n'a pu être réalisé dans le cadre de ce programme, la patuline ainsi marquée n'ayant été synthétisée qu'en toute fin de programme.

6. Etudes toxicologiques

6.1 Evaluation de la toxicité de l'ascladiol

6.1.1 Matériel et méthodes

Les cellules (Caco-2, carcinome du colon humain ; HEL-293, lignée 293 du rein embryonnaire humain, HepG2 : carcinome hépatocellulaire humain, HL-60 : promyéloblaste humain) en prolifération ont été incubées avec la patuline (PAT) et le E-ascladiol (ASCL) pendant 24 h. La viabilité cellulaire évaluée par la mesure de l'ATP est exprimée en % des cellules de contrôle. Les graphes montrent la moyenne \pm l'erreur-type de la moyenne (SEM) de six répliquats. Les profils d'expression génétique ont été réalisés sur la plateforme GeT-TRiX (GénoToul, Génopole Toulouse Occitanie) d'après le protocole décrit par Tannous *et al.* (2017).

6.1.2 Résultats et discussion

L'ASCL est identifié comme le dernier précurseur de la voie de biosynthèse de la PAT et connu depuis longtemps comme le produit de dégradation de la PAT par *Saccharomyces cerevisiae* lors de la fermentation.

La PAT est cytotoxique pour les quatre lignées cellulaires tandis qu'aucune toxicité n'a été observée lorsque ces lignées cellulaires ont été traitées avec l'ASCL (Figure 7).

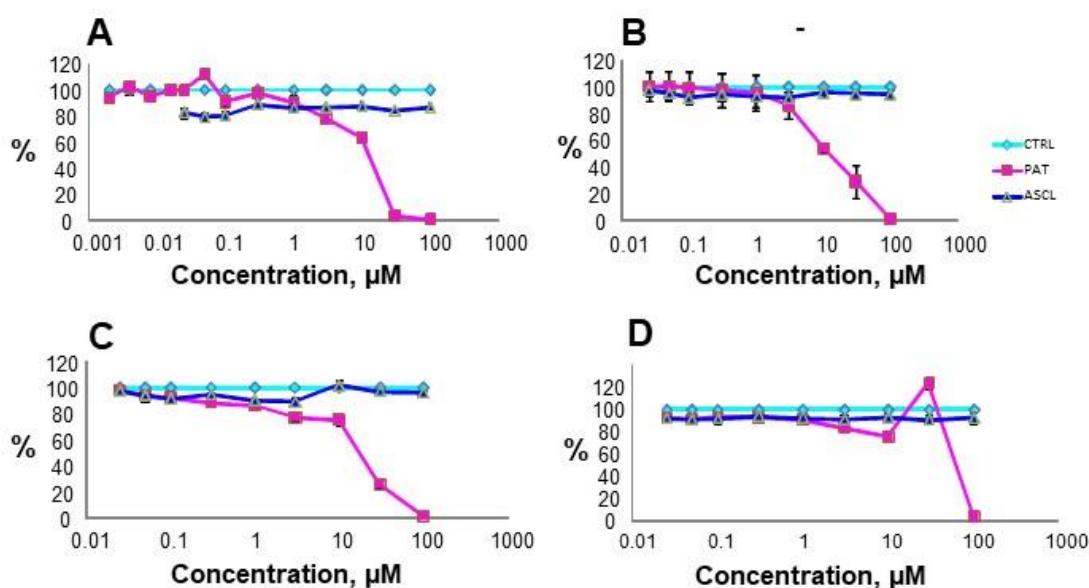


Figure 7 : Effet de la patuline (PAT) et du E-ascladiol (ASCL) sur lignées cellulaires A) Caco-2, B) HEK-293, C) HepG2 et D) HL-60

Afin d'évaluer l'impact de l'ASCL sur le transcriptome global des cellules intestinales, une analyse transcriptomique faisant appel à des puces à ADN a aussi été réalisée après traitement de cellules Caco-2 avec l'ASCL ou la PAT. La PAT impacte 5 423 gènes (2 811 étant surexprimés et 2 612 sous-exprimés) après un traitement des cellules Caco-2 durant 24 h avec 3 μM de PAT. A l'inverse, la même dose d'ASCL et la même durée d'exposition conduisent à des changements d'expression de seulement neuf gènes (Figure 8).

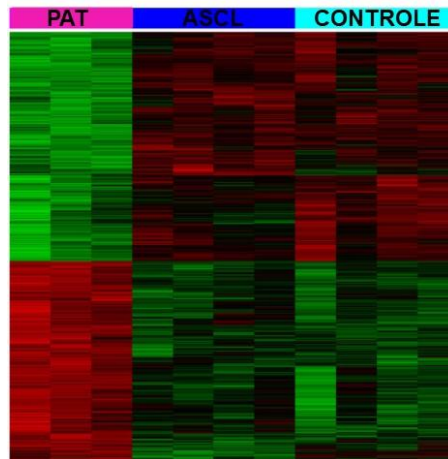


Figure 8 : Profil d'expression génétique de la lignée cellulaire Caco-2 exposée à la patuline (PAT) ou à l'ascladiol (ASCL). Heat map (en vert les gènes sous-exprimés, en rouge les gènes surexprimés).

Ceci confirme la non-toxicité observée lors des tests de cytotoxicité. L'ensemble de ces résultats montre que la PAT perd sa toxicité lorsqu'elle est dégradée en ASCL.

6.2 Evaluation de la toxicité de l'acide désoxypatulinique

6.2.1 Matériel et méthodes

Les cellules Caco2 (Sigma, 86010202) ont été exposées 24 h à différentes doses (0-400 μM) d'acide désoxypatulinique (DPA) ou de PAT (0-100 μM). Trois tests ont été effectués sur cellules en prolifération : mesure de l'activité métabolique par quantification de l'ATP cellulaire (Test CellTiter-Glo®, Promega, Charbonnières-les-Bains), mesure du potentiel d'oxydo-réduction de la cellule (Test alamarBlue, Promega) et mesure de l'intégrité de la membrane cellulaire par quantification de la lactate déshydrogénase (Test LDH, Promega) intra- et extracellulaire. Une mesure de la résistance transépithéliale (TER) (CellZscope®, NanoAnalytics, Munster, Allemagne) sur cellules différenciées a été réalisée en exposant durant 48 h les cellules à différentes doses de PAT (3, 10, 30, 60 et 100 μM) ou de DPA (3 et 100 μM).

6.2.2 Résultats et discussion

Le DPA est connu depuis longtemps comme le produit de dégradation de la PAT par *Rhodosporidium kratochvilovae* (Pinedo *et al.*, 2018 ; Castoria *et al.*, 2011). Après purification par CLHP, la cytotoxicité du DPA ainsi que celle de la PAT ont été étudiées sur cellules Caco-2 en prolifération (Figure 9) ou différenciées. Les effets cytotoxiques de la PAT, déjà décrits par Tannous *et al.* (2017), ont également été observés alors que le DPA n'a quant à lui aucun effet cytotoxique (Figures 9A, 9B, 9C). Sur cellules différenciées, deux tests (CellTiter-Glo® et LDH) ont montré que ni la PAT ni le DPA ne présentent d'effets cytotoxiques (Figures 9A et 9C).

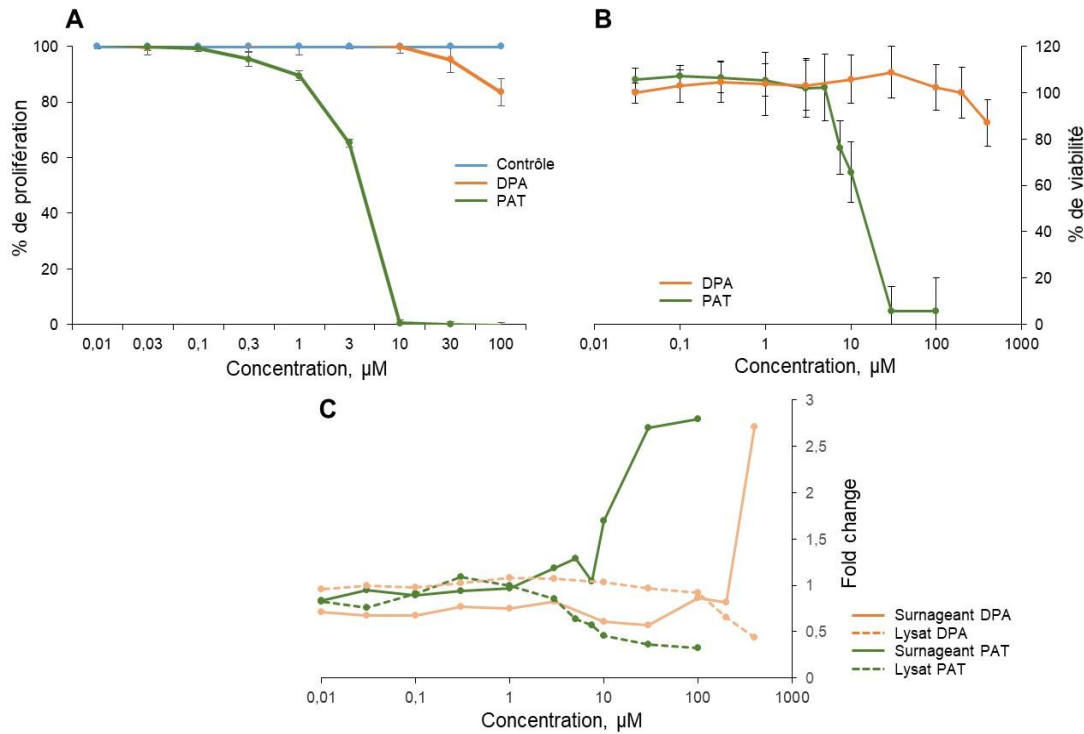


Figure 9 : Effets cytotoxiques de la patuline (PAT) et de l'acide désoxypatulique (DPA) sur des cellules Caco-2 en prolifération. A) Test CellTiter-Glo®. B) Test alamarBlue. C) Test basé sur la lactate déshydrogénase

Les résultats de la TER (Figure 10) montrent que le DPA n'altère pas la barrière intestinale, même à forte dose, contrairement à ce qui est rapporté pour la PAT (Mahfoud *et al.*, 2002 ; Kawauchiya *et al.*, 2011).

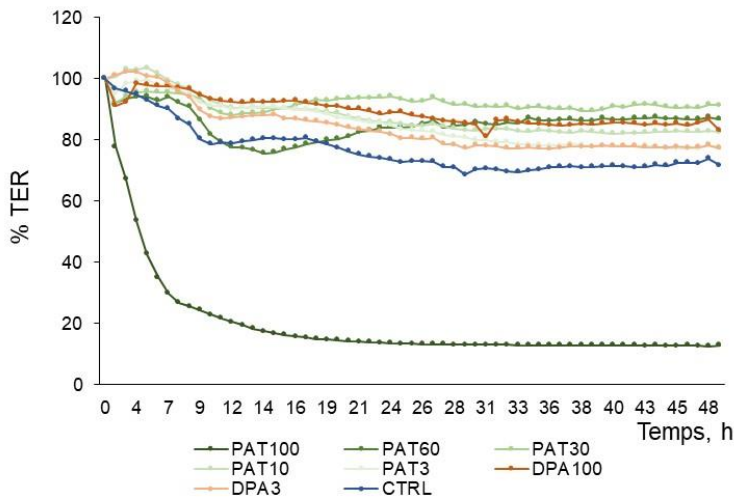


Figure 10 : Cinétique de la résistance transépithéliale (TER) induite par la patuline (PAT) et l'acide désoxypatulique (DPA) sur lignée cellulaire Caco-2 différenciée

Conclusion

Ce projet a permis le recensement et la mise en collection d'une diversité de souches constituant des compétiteurs potentiels pour les champignons mycotoxinogènes.

Grâce à ce projet prospectif, la filière pomme à cidre a pu progresser dans l'identification des solutions pertinentes pour le biocontrôle. Les résultats pour les raisins de cuve au champ n'ont pas été concluants et ont montré peu de différences entre parcelles conduites en bio et en conventionnel.

De nouvelles expérimentations en conditions naturelles de contamination pourront être déclenchées rapidement au vignoble en cas de besoin. En effet, les compétiteurs potentiels sont déjà présélectionnés et conservés en collection. Les méthodes de criblage *in vitro*, de préparation et d'application au champ ont été éprouvées. La mise en œuvre de la compétition au cours de l'élaboration reste encore à éprouver sur vin.

Pour le vin comme pour le cidre, les expériences *in vitro* de compétition vis-à-vis de deux souches toxigènes pourront être appliquées à d'autres espèces, toujours dans un souci de protection des cultures par le biocontrôle.

Le projet a conduit grâce au partenariat avec le CEA, à la mise au point d'une méthode de marquage par isotope permettant d'obtenir de la patuline ¹³C, inexistante dans le commerce. Cela rend possible une exploration approfondie du devenir de cette molécule pour la recherche de solutions dans la filière cidricole.

Enfin, INRAE Toxalim a pu démontrer l'absence de toxicité de l'ascladiol et du DPA, deux métabolites issus de la dégradation de la patuline.

A l'heure actuelle, les retours du vignoble ne font plus état d'une problématique mycotoxine active dans les différentes régions, y compris à risque. Cependant, les filières vitivinicole et cidricole mettent en œuvre une démarche proactive vis-à-vis des contaminants potentiels et ce projet a permis de constituer une première avancée et une préparation en cas de multiplication des atteintes au vignoble et au verger à moyen terme. Des expérimentations complémentaires ne seront pas prévues à court terme sur vigne/vin pour éviter de concentrer trop de moyens sur des contaminations artificielles au succès aléatoire. En revanche, il est prévu de maintenir une veille sur ce sujet, notamment par l'implication des deux filières dans les RMT 2020 Quadiferm dédiées aux boissons fermentées et distillées et AI-Chimie multi-filières, dédiée aux contaminations chimiques des aliments. Le premier est piloté par l'IFV et comporte un axe de travail dédié à la qualité des matières premières et une veille documentaire concernant la sécurité alimentaire. Le second est piloté par l'ACTA et l'ACTIA et comporte une veille sanitaire plus générale et prévoit des échanges avec l'ANSES sur les sujets de sécurité alimentaire.

Les articles scientifiques liés à ce programme sont accessibles sur internet (HAL INRAE, <https://hal.inrae.fr/>).

Références bibliographiques

Cano P.M., Jamin E.L., Tadrist S., Bourdaudhui P., Péan M., Debrauwer L., Oswald I.P., Delaforge M., Puel O., 2013. New untargeted metabolic profiling combining mass spectrometry and isotopic labeling: application on *Aspergillus fumigatus* grown on wheat. *Anal Chem* 85, 8412-8420. doi: 10.1021/ac401872f.

Castoria R., Mannina L., Durán-Patrón R., Maffei F., Sobolev A.P., De Felice D.V., Pinedo-Rivilla C., Ritieni A., Ferracane R., Wright S.A.I., 2011. Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11. *J Agric Food Chem* 59, 11571-11578. doi: 10.1021/jf203098v.

Kawauchiya T., Takumi R., Kudo Y., Takamori A., Sasagawa T., Takahashi K., Kikuchi H., 2011. Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells. *Toxicol Lett* 205, 196-202. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.06.006.

Leguerinel I., Cleret J.J., Bourgeois C., Mafart P., 1989. Yeast strain and the formation of flavor components in cider. *J Inst Brew* 9: 391-395.

Mahfoud R., Maresca M., Garmy N., Fantini J., 2002. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol* 181, 209-218. doi: 10.1006/taap.2002.9417.

Péan M., Boiry S., Ferrandi J.C., Gibiat F., Puel O., Delaforge M., 2007. Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples: (1) production of uniformly enriched biomass. *J Label Compd Radiopharm* 50, 569-570. doi: 10.1002/jlcr.1280.

Pinedo C., Wright S.A.I., Collado I.G., Goss R.J.M., Castoria R., Hrelia P., Maffei F., Durán-Patrón R., 2018. Isotopic labeling studies reveal the patulin detoxification pathway by the biocontrol yeast *Rhodotorula kratochvilovae* LS11. *J Nat Prod* 81, 2692-2699. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00539.

Saravanakumar D., Ciavorella A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L., 2008. *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biol Technol* 49, 121-128. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.11.006.

Tannous J., Snini S., El Khoury R., Canlet C., Pinton P., Lippi Y., Alassane-Kpembé I., Gauthier T., El Khoury A., Atoui A., Zhou T., Lteif R., Oswald I.P., Puel O., 2017. Patulin transformation products and last intermediates in its biosynthetic pathway, E- and Z-ascladiol, are not toxic to human cells. *Arch Toxicol* 91: 2455-2467. doi:10.1007/s00204-016-1900-y.

Zetina-Serrano C., Rocher O., Naylies C., Lippi Y., Oswald I.P., Lorber S., Puel O., 2020. The *brlA* gene deletion reveals that patulin biosynthesis is not related to conidiogenesis in *Penicillium expansum*. *Int J Molec Sci* 21, 6660. doi: 10.3390/ijms21186660.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL ou DOI).