

Des microorganismes capables de dégrader les mycotoxines: de nouveaux levains pour garantir la qualité sanitaire des produits alimentaires ?

Florence Forget-Richard, Inra UR1264 MycSA, 33883 Villenave d'Ornon
Jean-Michel Savoie, Inra UR1264 MycSA, 33883 Villenave d'Ornon

Contact: fforget@bordeaux.inra.fr

Jeudi 25 juin 2015



25 % des denrées destinées à l'homme et aux animaux sont contaminées par des mycotoxines (source: FAO)

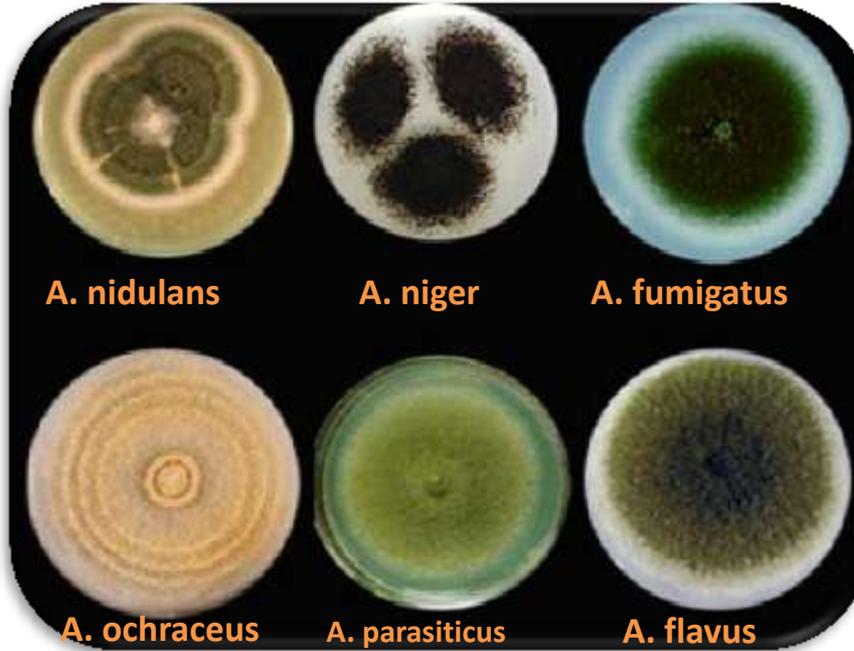
- **Trois genres fongiques** sont les principaux responsables de ces contaminations.
- Plus de 200 mycotoxines répertoriées, **15 majeures**.
- **Les céréales**: substrats privilégiés des champignons toxinogènes.

**Le règlement CE n°1126/2007
(modifie le CE n°1881/2006)
fixe les concentrations maximales
autorisées dans les produits
alimentaires dans l'UE.**

Genre *Aspergillus* et ses toxines



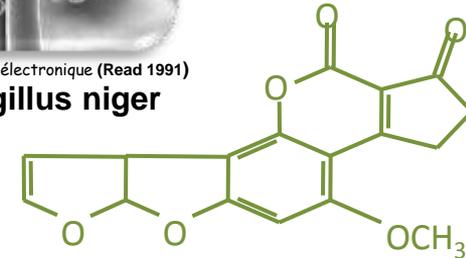
www.bspp.org.uk/NDR/jan2007/2006-61.asp



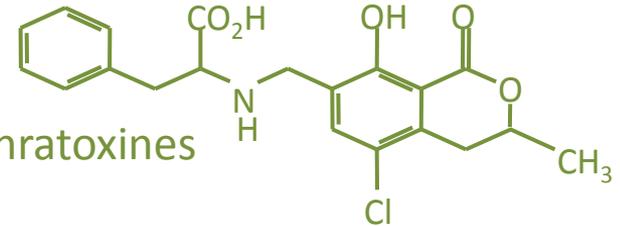
Microscopie balayage électronique (Read 1991)

Aspergillus niger

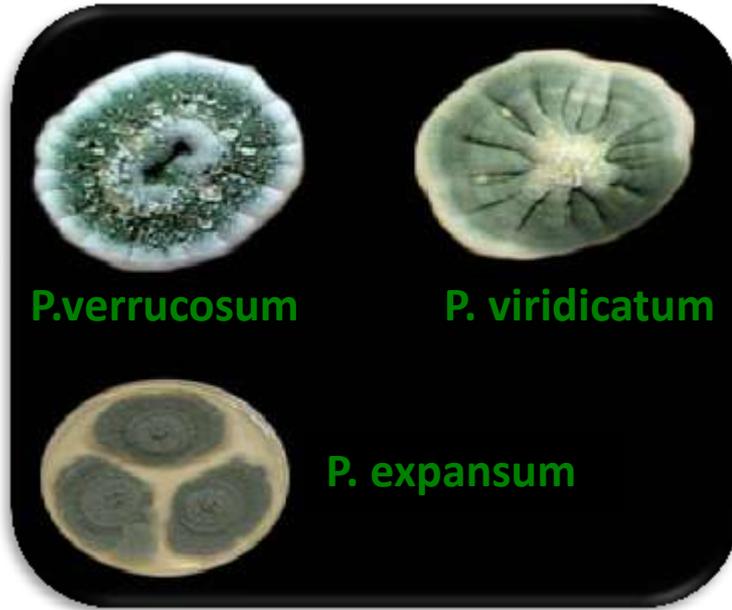
Aflatoxines



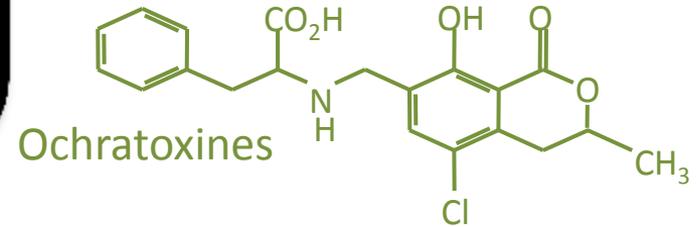
Ochratoxines



Genre *Penicillium* et ses toxines



Conidiophores (x 1000)
microscopie optique et balayage



Genre Fusarium et ses toxines



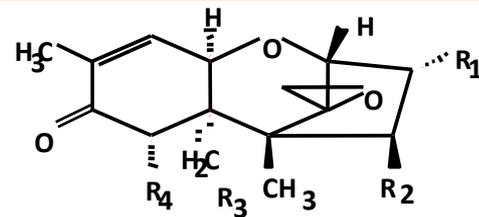
F.graminearum



F.culmorum



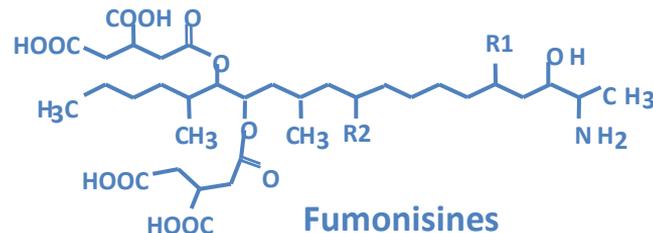
F.Verticillioides / F.proliferatum



Trichothécènes B
(DON : deoxynivalenol,
NIV: nivalenol,....)



Zéaralenone

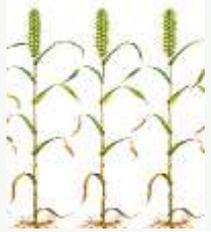


Fumonisines

Améliorer la maîtrise du risque « mycotoxines » implique...

Décrypter les mécanismes et événements conduisant à la contamination des grains?

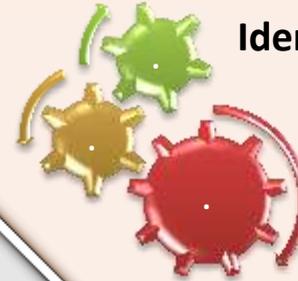
Prévention du risque



floraison



Maturité



Identifier des mécanismes de détoxification

Décontamination

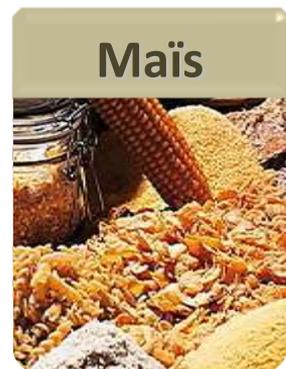
Evaluation du risque

Mieux appréhender la toxicité ?



Les voies de décontamination

Les mycotoxines: des molécules très thermostables qui se retrouvent dans les produits finis.



TCTB
ZEA
OTA
AFLA
FB

- Traitements physiques : triage optique, décorticage, mouture
- Traitements chimiques : ammoniation , ozone
- Procédés fermentaires

Plusieurs études reportent une diminution des teneurs en mycotoxines au cours de procédés fermentaires



Diminution des teneurs en mycotoxines ne signifie pas forcément détoxification.

Dégradation par des activités microbiennes?

Piégeage dans la paroi microbienne?

Complexation avec les composants de la matrice?
Mycotoxines masquées!

Exemples

Devenir du déoxynivalenol au cours de la panification

Fumonisine dans les ensilages de maïs grains

Devenir du déoxynivalenol au cours de la panification

Type de pain	Temperature (°C)	Fermentation (min)	% réduction DON
Français	30	30	0
		60	0
	40	23	15
		45	40
	50	20	29
		40	41
Viennois	30	45	0
		90	25
	40	35	20
		70	36
	50	30	49
		60	56

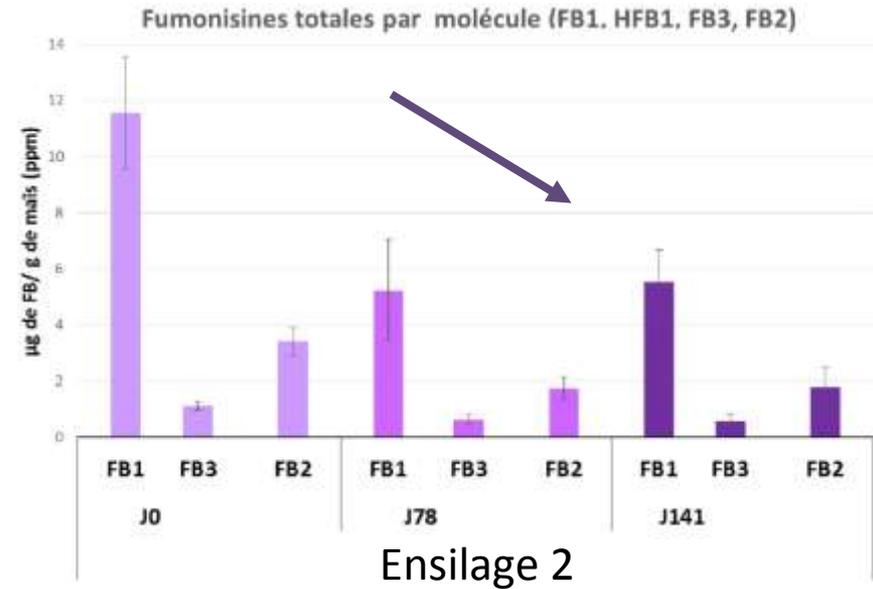
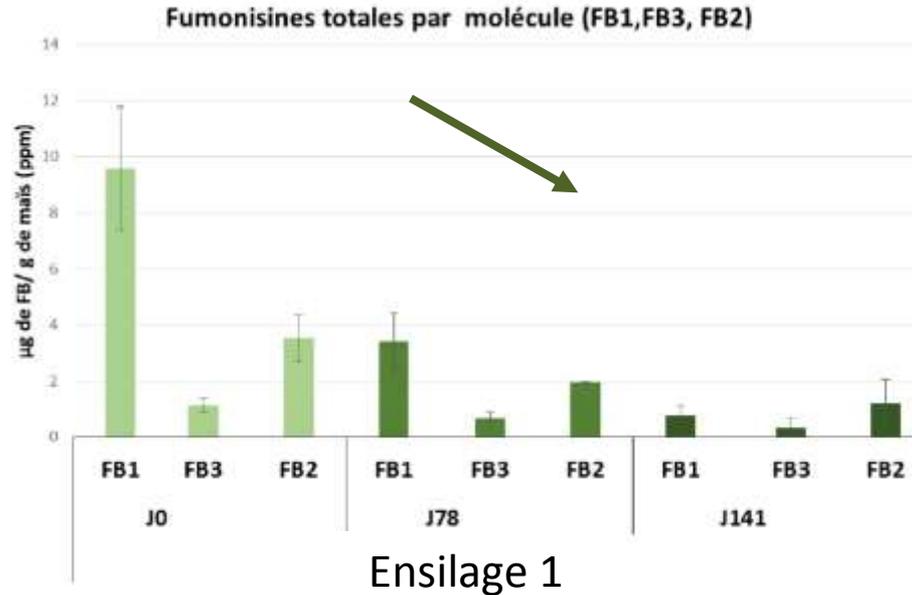
La diminution du DON est augmentée par la durée de fermentation

D'autres travaux (Bergamini et al., 2010; Vidal et al., 2009) rapportent une augmentation du DON qui résulterait d'une libération du DON piégé dans les tissus végétaux au cours de la fermentation

Lié au type de levain?

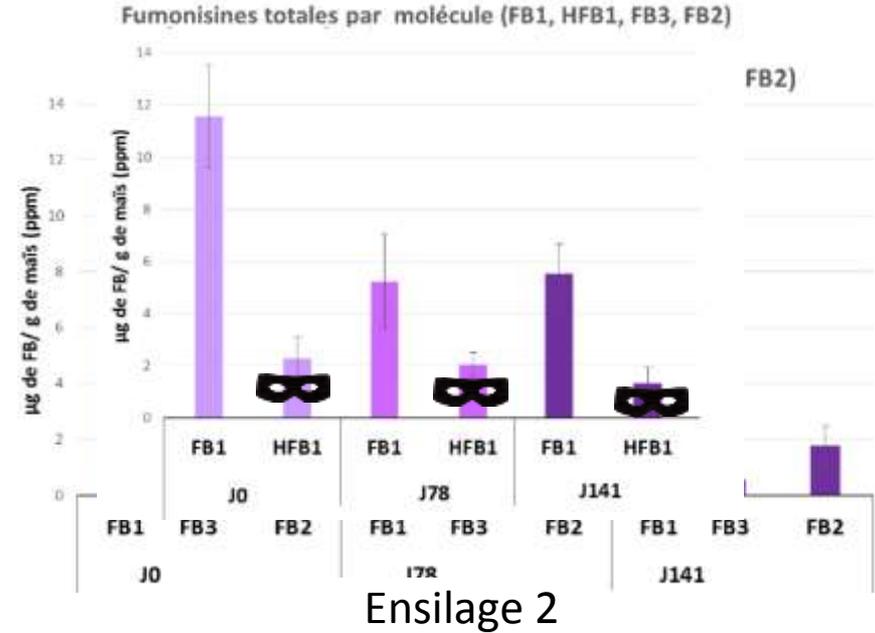
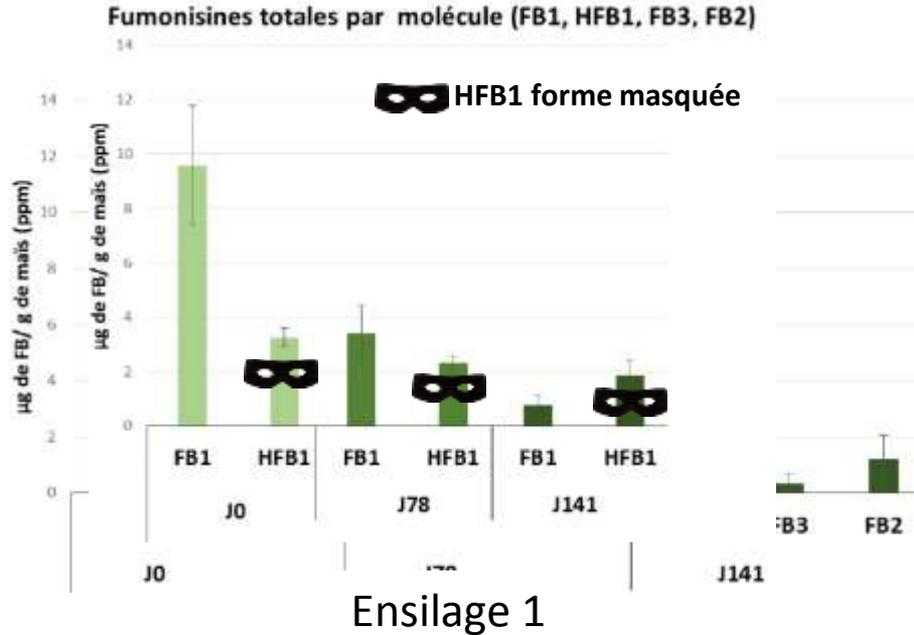
Samar et al, 2001

Une diminution des teneurs en FB1 est observée dans certains ensilages de maïs grains (Martinez et al, thèse CIFRE/Lallemand)

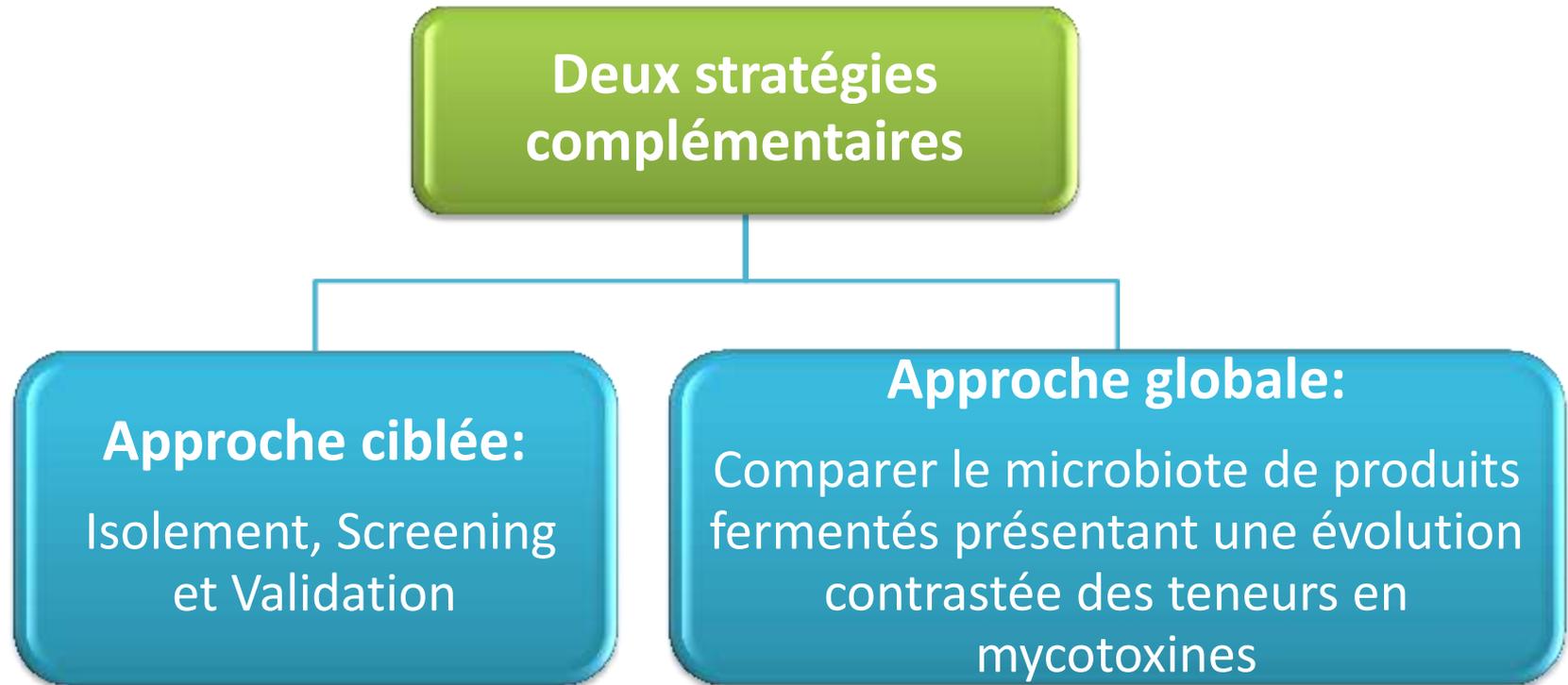


Pour confirmer la réelle dégradation des toxines, il est indispensable de considérer l'ensemble des toxines « libres » et « masquées »

Une diminution des teneurs en FB1 est observée dans certains ensilages de maïs grains (Martinez et al, unpublished data)



Il s'agit bien d'une diminution liée à une activité de dégradation et non pas une complexation



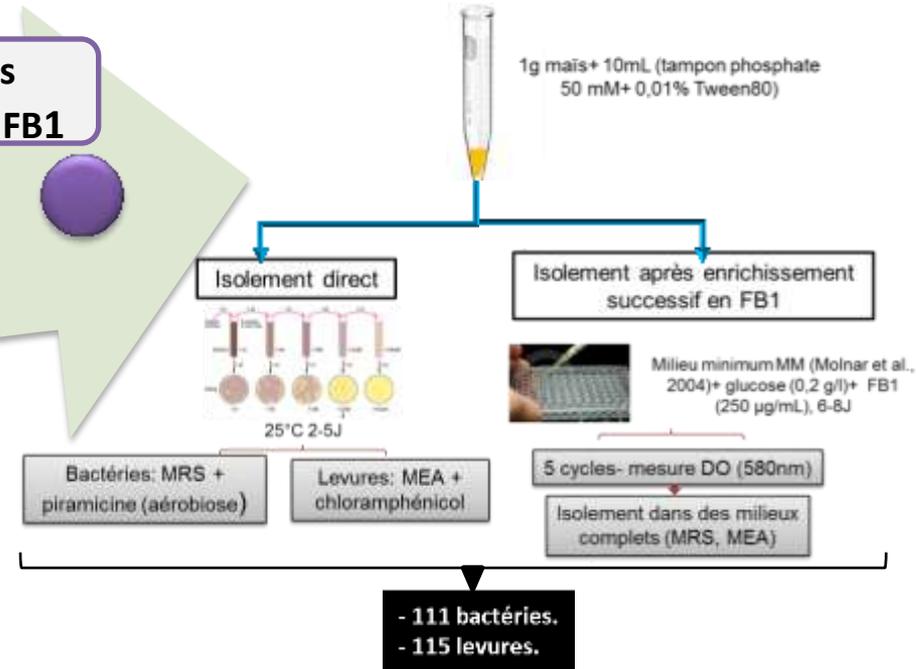
Approche ciblée: Exemple de la recherche de microorganismes capables de dégrader les fumonisines dans les ensilages de maïs grains

(Martinez et al, thèse CIFRE/Lallemand)

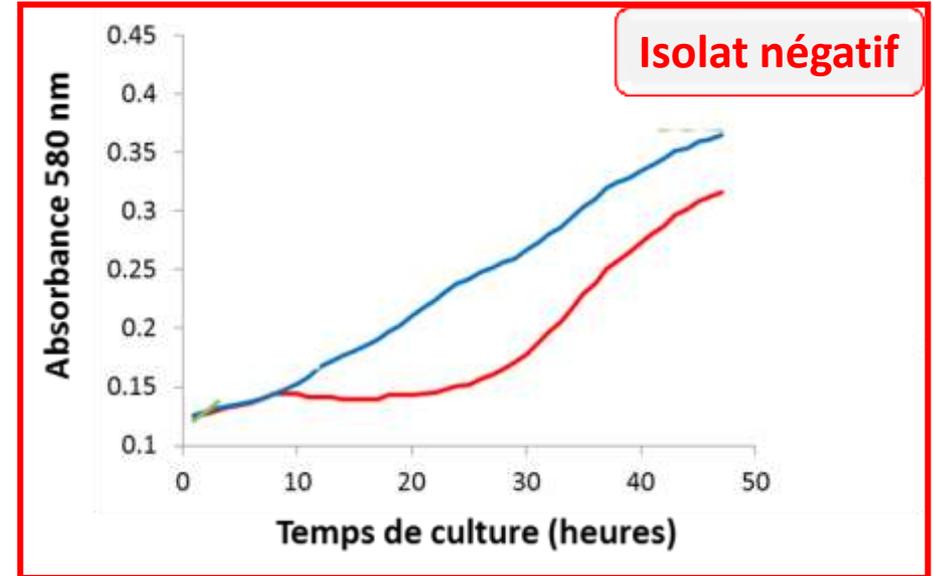
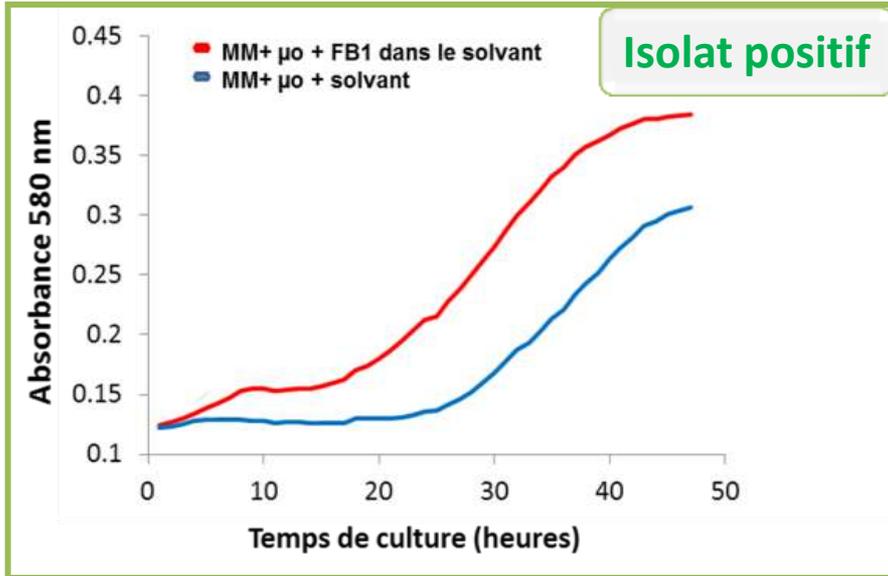
II. Screening préliminaire: isolats capables de se développer en présence de FB1 (DO)

I. Réalisation d'une banque d'isolats à partir de microsilos

III. Validation des isolats capables de métaboliser la FB1



Approche ciblée: Screening des isolats potentiellement capables de dégrader la Fumonisine



Mise en culture sur un milieu où la source principale de carbone et azote est la mycotoxine

Microorganismes identifiés pour leur capacité de dégradation des mycotoxines

Catégorie	Agent microbien	Mycotoxine cible	Origine	Reference
Bactéries	Mycobacterium fluoranthenorans sp. Nov. DSM44556, Rhodococcus erythropoli.	AFB1	Sols contaminés HAP	Teniola et al., 2005 & Wu et al., 2009
	NCB1492 (Delftia/ Comamonas group)	FB1	Sols	Benedetti et al., 2006
	ATCC 55552 or 2412.1	FB1	Tiges maïs	Duvick et al., 2000; Heintl et al., 2011
	Sphingopyxis sp. MTA144	FB1	Sols	Täubel 2005; Heintl et al., 2010
	Eubacterium bifforme	OTA	Intestin porc	Upadhaya et al., 2012
	Lactobacillus vitilinus, Sphingomonas spp., Stenophomona spp., Eubacterium spp.	OTA	Fluides rumen	Schatzmayr et al., 2006
	Pediococcus parvulus	OTA	Vin	Abrunhosa et al., 2014
	Lactobacillus spp. and Leuconostoc spp.	ZEN	Collection	Niderkorn et al., 2007
	Eubacterium sp. BBSH 797	TCTA ; DON	Fluides rumen bovins	Fuchs et al., 2002
	E3- 39 (Agrobacterium/ Rhizobium group)	DON, 3- ADON	Sols	Shima et al., 1997
	Clostridiales , Anaerofilum sp., Collinsella sp., and Bacillus spp.	DON	Intestin poulet	Yu et al., 2010
	Lactobacillus plantarum	Patuline	Aliments fermentés pour animaux	Hawar et al., 2013
	Gluconobacter oxydans	Patuline	Pommes	Ricelli et al., 2007
Levures	Exophiala spinifera and Rhinocladiella atrovirens	FB1	Tissus maïs	Duvick 1998 -2001. Blackwell et al., 1999
	Saccharomyces cerevisiae	Patuline	Origine commerciale	Most and Long, 2002
	Trichosporon mycotoxinivorans	OTA, ZEN, DON	Intestin de termite <i>Mastotermes darwiniensis</i>	Schatzmayr et al., 2006
	Geotrichum spp., Metschnikowia spp., Kluyveromyces spp., Saccharomyces spp.	AFB1, ZEN & DON	Non documenté	Repeckiene et al 2013

Approche globale: Comparaison de microbiotes

Stratégie d'étude: exemple d'une stratégie appliquée aux ensilages grains

(Martinez et al, thèse CIFRE/Lallemand)

**Enrichissement du microbiome
à partir des ensilages**

1g maïs + 15mL PBS
(24X)

Gradient de sonication .
Centrifugations successives.

Culot microbien
(débarassé de l'ADN de maïs)

Extraction d'ADN

Vérification de la qualité

Dosage et amplification des gènes de
référence (*Mac1*, *V34*)

Analyse Métagénomique:

- ✓ Extraction d'ADN du microbiome.
- ✓ Shotgun whole genome sequencing.
- ✓ Illumina HiSeq V3 paired- end (100 pb)

ADN : 4-15µg ✓

Etape préliminaire: valider la méthode d'extraction ADN microbien

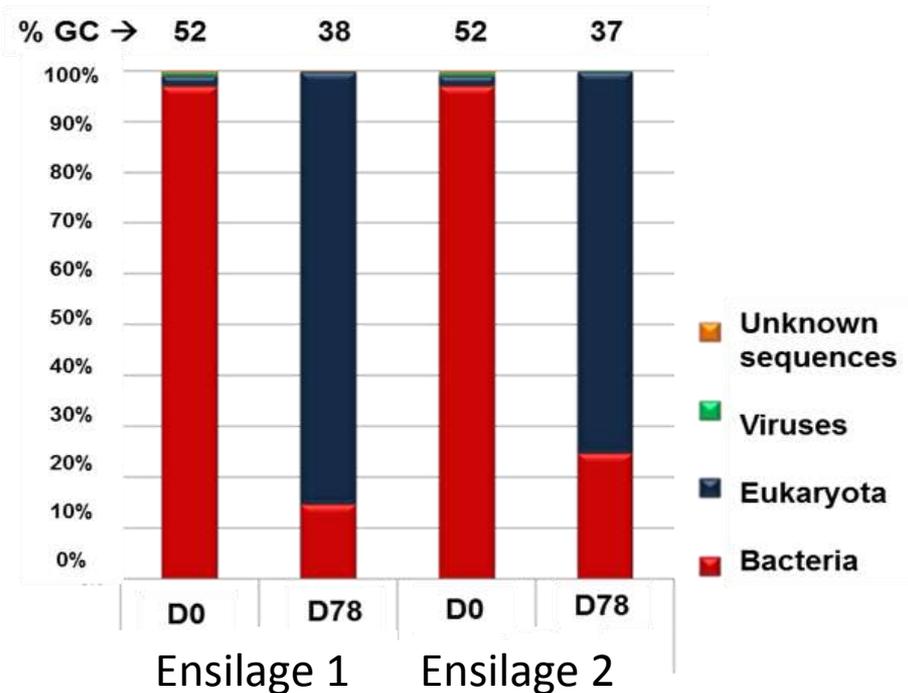
Ensilage	Temps de fermentation	QC Analyse			
		Echantillon	Total sequences (Mi.)	%GC	Mapping /genome de référence maïs(%)
S1	0	S1D0	R1 48.5	R1 52	0.36
			R2 53	R2 53	
S1	78	S1D78	R1 48.8	R1 38	0.12
			R2 38	R2 38	
S2	0	S2D0	R1 41.6	R1 52	0.34
			R2 52	R2 52	
S2	78	S2D78	R1 54.6	R1 37	0.05
			R2 37	R2 37	

Evolution/fermentation

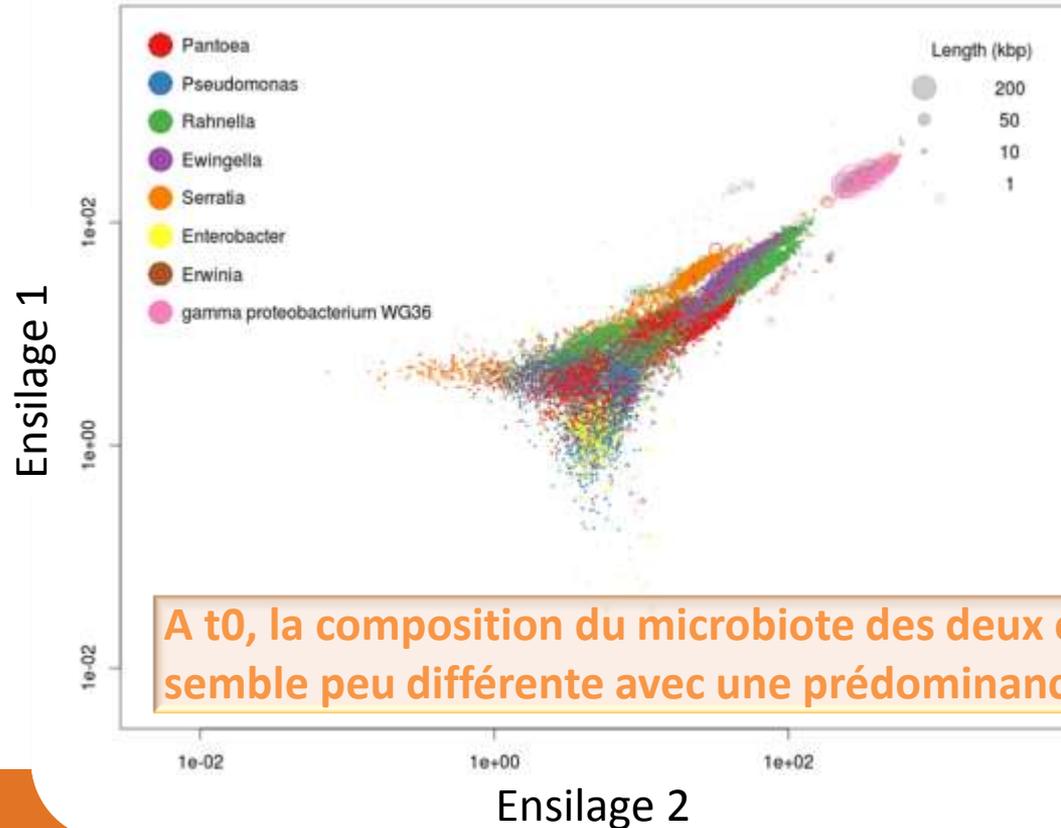
Nb important de séquences

Très faible contamination maïs

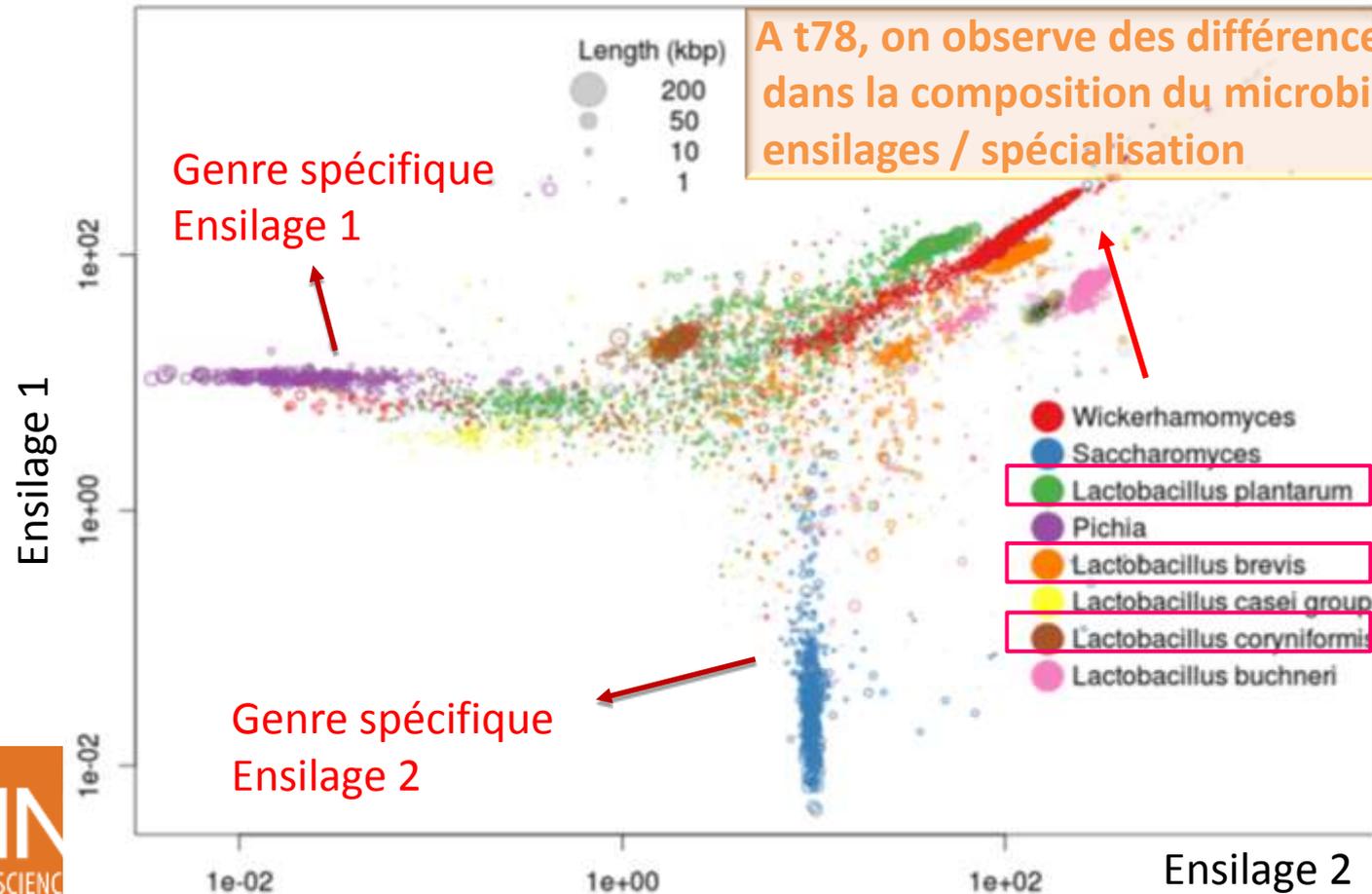
Une première image: un changement conséquent dans la structure du microbiote au cours de la fermentation



Composition du microbiote des deux ensilages



Composition du microbiote des deux ensilages



A t78, on observe des différences nettes dans la composition du microbiote des deux ensilages / spécialisation

Comprendre les mécanismes de dégradation

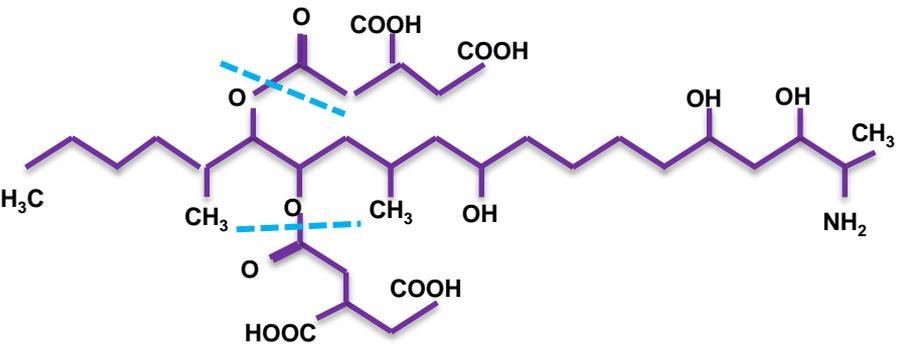
Identifier les métabolites de dégradation

Marqueurs
biochimiques

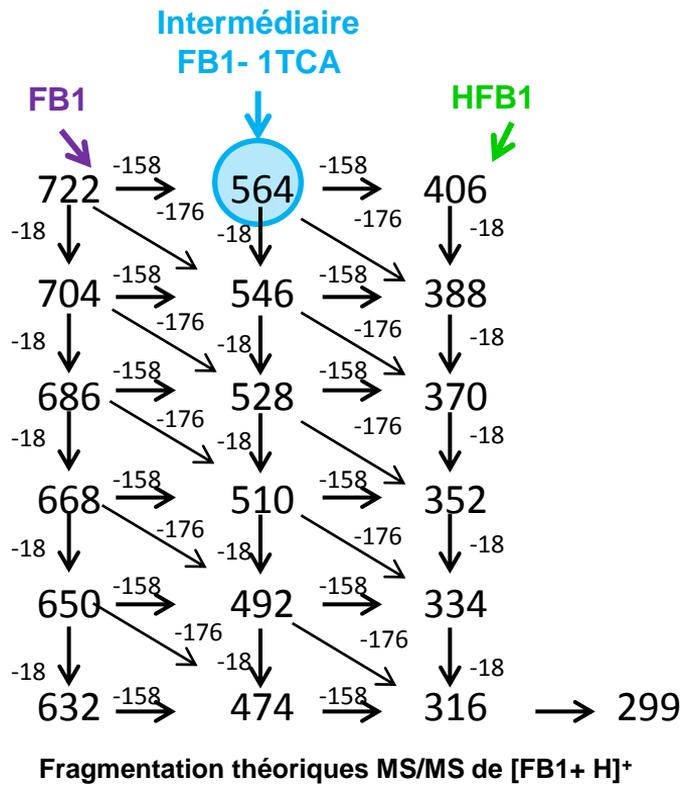
Repérer les activités enzymatique/gènes

Marqueurs
moléculaires

Métabolites marqueurs de la dégradation des fumonisines

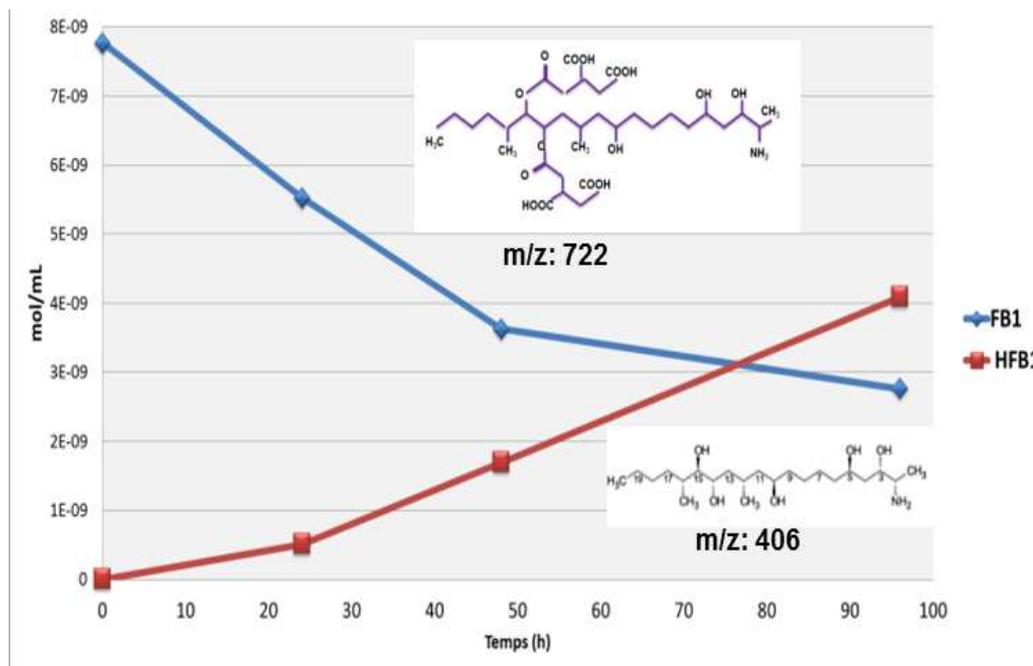


34 métabolites théoriques

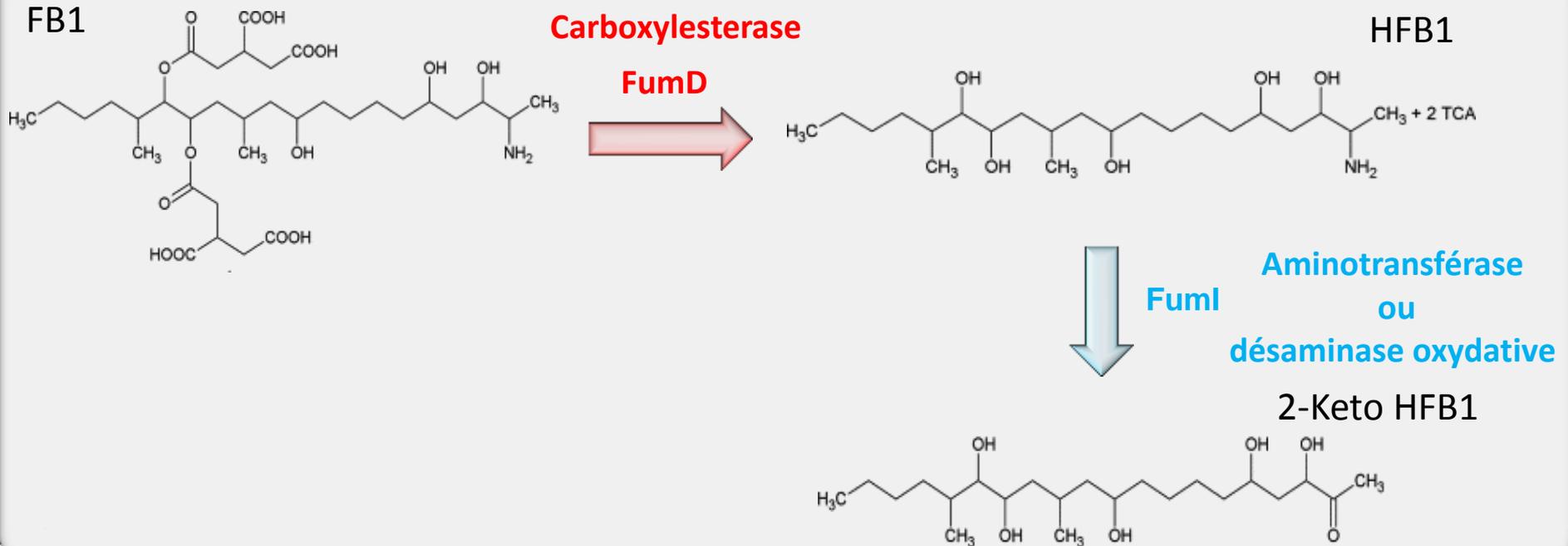


Validation de la capacité à métaboliser la fumonisine d'un isolat candidat

Cinétique de FB1 et HFB1 in vitro par l'activité de la souche ATCC 55552



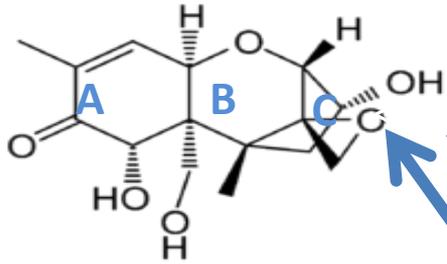
Voie de dégradation de la fumonisine B1



Les voies chimiques de dégradation d'autres mycotoxines

DON

Minéralisation



Acétylation

Oxydation

Epimérisation

Glycosylation

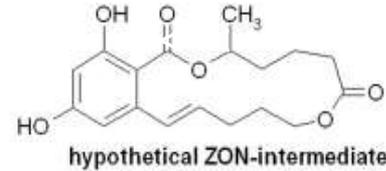
Deepoxydation

ZEA

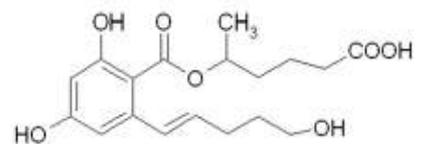
Vekuri et al., 2010



a) *Trichosporon mycotoxinivorans*



specific esterase/lactonase



De l'identification à l'exploitation

- Définir les conditions optimales d'expression des potentiels de dégradation :
Température, pH, activité de l'eau,
- Installation du/des microorganismes au sein du consortia existant?
- Vérification de l'absence de toxicité des produits de dégradation



Autorisation de mise sur le marché

Seul produit sur
le marché



- Additif alimentation animal
- Préparation enzymatique ► fumonisine decarboxylase produite par une levure génétiquement modifiée *Komagataella pastoris*

EFSA Journal 2014; 12(5): 36667

Merci de Votre Attention



Pour plus d'informations sur les approches métagénomiques
INRA Bordeaux MYCSA : Nadia Ponts ● nadia.ponts@bordeaux.inra.fr
INRA Bordeaux BFP: Sébastien Theil ● sebastien.theil@bordeaux.inra.fr