

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des procédés et de l'environnement

Présentée et soutenue par :

GASTELUM-MARTINEZ Elida

le : vendredi 9 mars 2012

Titre :

Interaction entre *Fusarium langsethiae* et *Geotrichum candidum* pour la réduction de la concentration de la toxine T-2 dans le procédé de brasserie

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

ENSAT, ENSIACET

Directeur(s) de Thèse :

MATHIEU, Florence et TAILLANDIER, Patricia

Rapporteurs :

GALINDO, Sabine Pr. Université Montpellier 2, Montpellier.

FICK, Michael Pr. ENSAIA, Université de Lorraine, Nancy

Membre(s) du jury :

OSWALD, Isabelle Dr. INRA ToxAlim, Toulouse

BOIVIN, Patrick Directeur IFBM, Nancy

Résumé

En France, la récente apparition et implantation de l'espèce *Fusarium langsethiae* sur les orges de brasserie est devenue une source d'inquiétude. Ce champignon étant connu comme producteur de toxines T-2 et HT-2 cela pose le problème de la présence éventuelle de ces mycotoxines dans la bière. Des études ont proposé la levure *Geotrichum candidum* comme possible outil de contrôle du niveau de contamination par ces molécules. Par contre, le mécanisme d'action est encore inconnu. L'objectif de ce travail était de comprendre l'interaction entre *F. langsethiae* et *G. candidum* pour évaluer l'effet sur le développement de *F. langsethiae* et sur sa production de la toxine T-2. Nous avons évalué l'interaction entre ces micro-organismes en utilisant des cultures séquentielles et des co-cultures. Dans ce dernier cas la différenciation des deux micro-organismes a été faite par DOPE-FISH et par quantification de l'ADN. Les résultats ont montré que la croissance de *F. langsethiae* n'est pas inhibée dans un milieu pré-fermenté par *G. candidum*. Par contre, la présence d'un agent actif thermorésistant produit lors du développement de *G. candidum* affecte la concentration de la toxine T-2. Une réduction supérieure à 90% est observée en comparaison au témoin. Dans les co-cultures on obtient le même pourcentage de réduction de la concentration de la toxine par rapport au témoin. Dans ce cas les deux micro-organismes se développent mais en moindre quantité que dans leur culture pure, *F. langsethiae* semblant plus inhibé que *G. candidum*.

Abstract

F. langsethiae has been recently installed and detected in French barley used for malting. This species is known as a T-2 and HT-2 mycotoxin producer and for this reason, the possible presence of these mycotoxins in beer is a concern. *G. candidum* has been suggested to have a control activity in this issue, however the mechanisms is not yet described. The aim of this work was to understand the interaction between *F. langsethiae* and *G. candidum* to identify any effect in *F. langsethiae* growth and the T-2 toxin production. In this work, the interaction was evaluated using sequential cultures and co-cultures. Differentiation of these microorganisms in co-culture was achieved using DOPE-FISH and DNA quantification. Results showed that in the medium prefermented by *G. candidum* *F. langsethiae* growth was not inhibited but a thermoresistant active agent affected the T-2 toxin concentration during *F.*

langsethiae development. A reduction over 90% of the T-2 toxin was observed in comparison to the concentration detected in the control. For mixed cultures the same toxin concentration reduction was observed while both microorganisms grew but at a lesser extent compared to pure cultures. In this case the growth of *F. langsethiae* was more affected than the one of *G. candidum*

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS/INPT/UPS) au sein du département de Bioprocédés et Systèmes Microbiens sur le site de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse.

Je remercie Sabine GALINDO, professeure à l'Université Montpellier 2 et Michel FICK, professeur de l'ENSAI, Université de Lorraine de Nancy d'avoir accepté la tâche de rapporteurs de ce mémoire. J'exprime également mes remerciements à Isabelle OSWALD, Directeur de recherche de l'INRA ToxAlim de Toulouse et Patrick BOIVIN, directeur de l'IFBM de Nancy de participer au jury comme examinateurs.

Je remercie aussi Florence MATHIEU et Patricia TAILLANDIER professeures à l'Institut National Polytechnique de Toulouse et plus particulièrement à l'ENSAT et l'ENSIACET, respectivement pour m'avoir accueillie au labo, m'avoir proposé cette thèse et surtout pour la confiance qu'elles m'ont accordée tout au long du travail, simplement MERCI.

Je tiens à remercier Stephane COMPANT maître de conférences à l'ENSAT pour la collaboration et le soutien qu'il a porté à mon travail.

Je remercie également le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) du Mexique pour avoir financé durant trois ans ma bourse sans laquelle je n'aurais pas pu réaliser cette thèse.

J'exprime ma gratitude envers l'IFBM pour le soutien pendant le déroulement de cette thèse.

Au sein du laboratoire, je souhaite exprimer ma profonde gratitude et dire toute mon affection à Marion DARIET, Philippe ANSON et Patricia NOUVET pour toute votre aide dès le début de ma thèse et surtout votre amitié, GRACIAS. Je remercie aussi les doctorants et les stagiaires Safwan, Hussnain, Atika, Saïma, Carole, Rym, Adeline... pour être plus que mes amies, vous faites partie de ma famille, sans vous la vie au labo aurait été sans couleur.

Mes remerciements à l'ensemble des personnels permanents ou non du laboratoire que j'ai pu connaître tout au long de cette thèse de près ou de loin.

Merci à toutes les personnes qui ont touché ma vie d'une manière ou d'une autre, positive ou négative, merci, grâce à vous je suis ce que je suis maintenant.

Quiero agradecer a Dios por darme la vida y ponerme en el camino que me ha puesto, gracias por no dejarme y acompañarme en los momentos bellos y sobre todo en los difíciles. Gracias también a todos mis amigos mexicanos Angel, Lety, Zindy, Tandy, Nico, « Yarida » y la familia Parra Polanco Paty, Jorge, Junior y Andrea por prestar su casa cada fin de semana, por su amistad, apoyo, ayuda... gracias a todos no tengo palabras para expresar mi gratitud, lo mucho que los quiero e importante que son todos ustedes en mi vida. Gracias por se mi nueva familia.

A los amigos ecuatorianos, argentinos y paraguayos, Fabián, Tania, Catherine, Tony, Gabriel, Mauro ; Jorge y Sergio Saraniche y Paula Berzotti y la beba Maia ; Gastón y Gastón Javier, gracias a ustedes el tiempo se pasó agradablemente. Thomas Chevrolat tu seras toujours dans notre coeur, merci d'être un très bon ami.

Merci aussi à Caroline Strub, pour être une amie, m'aider, écouter et surtout pour être très gentille et patiente au début de mon séjour à Toulouse.

Les amis Paul, Nico, Caroline, Adrien, Mathis, Gérard et Sophie merci pour tout votre aide et surtout pour être très bons amis, pour nous montrer la belle vie française, les fromages et les vins. Nous sommes très ravis de vous avoir connu.

Finalmente, quiero agradecer a toda mi familia por haber creído en mi todo el tiempo, por su apoyo incondicional y sobre todo su amor. Gracias mami por ser esa persona que me apoyó e impulsó a ser siempre mejor cada día, te amo con todo mi corazón, y le doy gracias a Dios por que te tengo en mi vida y que te tengo como madre. Gracias a mi papá Roberto por ser ese apoyo por los valores que me enseñaste, pero sobre todo por tu inmenso amor, gracias papá por ser el gran padre que eres. A mi esposo Huri por acompañarme cada fin de semana al laboratorio, por tu apoyo en los momentos difíciles y por creer y seguir luchado por nosotros, te amo y agradezco que seguimos juntos. A mi hijo Gaiael que eres el motor de cada día, por los besos y abrazos matutinos que me despertaban cada día y tus sonrisas que me llenan de vida. Los amo con todo mi corazón y sin ustedes esta tesis no tendría razón de ser. A toda mi familia, abuelita Elida, abuelito Manuel, Gaby, Raúl, Jona, Gera, Fam. Bonilla Peña, gracias por el apoyo incondicional, los quiero mucho.

Merci à toi pour être là...

Abréviations

1-AN: 1-anthroynitrile

ACN: Acétonitrile

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

ATA: Aleucie toxique alimentaire

CTS: Cargill Texturizing Solutions

DMAP: 4-diméthylaminopyridine

HPLC FLD: Chromatographie en phase liquide à haute performance avec détecteur de fluorescence (en anglais: High performance liquid chromatographie with fluorescence detection)

IFBM: Institut Français des Boissons de la Brasserie et de la Malterie. (54500 Vandoeuvre les Nancy)

MFF: Milieu pré-Fermenté par *Fusarium langsethiae*

MFG: Milieu pré-Fermenté par *Geotrichum candidum*

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose Broth

PLA: Phenyllatic acid

Rpm: Rotation par minute

Ym: Yeast Medium

Liste des figures

Figure 1. Structure chimique des aflatoxines B1, B2, G1 et G2.	19
Figure 2. Structure chimique de l'ochratoxine A.	21
Figure 3. Structure chimique de la zéaralénone (ZEA).	23
Figure 4. Structure chimique des fumonisines B1 et B2.	25
Figure 5. Structure chimique de trichothécane.	27
Figure 6. Structure chimique des trichothécènes A.	28
Figure 7. Structure chimique des trichothécènes B.	28
Figure 8. Structure chimique la Crotochine, trichothécènes du groupe C.	29
Figure 9. Structure chimique générale des trichothécènes D.	29
Figure 10. Structure chimique des toxines T-2 et HT-2.	30
Figure 11. Voie de biosynthèse de la toxine T-2 chez <i>F. sporotrichioides</i> (Alexander et al., 2008).	31
Figure 12. Voies métaboliques possibles de transformation de la toxine T-2 dans le rumen. Réactions (1) : Deepoxidation, (2) : Deacetylation et (3) : Isovaleryl deesterification (EFSSA Rapport Mars 2009).	37
Figure 13. Etapes de maltage.	49
Figure 14. <i>Geotrichum candidum</i> (a) forme filamenteuse (b) cellules libres.	65
Figure 15. <i>Fusarium langsethiae</i> 035.	65
Figure 16. Schéma général de la préparation des milieux à base d'orge.	66
Figure 17. Schéma général de la préparation des milieux pré-fermentés.	68
Figure 18. Représentation d'un bioréacteur à membrane (BRM).	69
Figure 19. Schéma de la dérivation des toxines T-2 et HT-2 (1-AN : 1-Antroynitrile ; DMAP : 4- diméthylaminopyridine).	74
Figure 20. Méthodologie DOPE-FISH pour <i>F. langsethiae</i> et <i>G. candidum</i>	77
Figure 21. Milieu d'infusion de grains d'orge (MGO).	81
Figure 22. Spectre de la lumière blanche.	81
Figure 23. Suivis de l'absorbance et de la température pendant l'infusion de grains d'orge pour la préparation du milieu MGO.	82
Figure 24. Grains d'orge après différents temps de broyage.	83
Figure 25. Phase amidonnée trouvée pendant l'infusion de grains d'orge broyés.	83
Figure 26. Suivis de l'absorbance et de la température pendant l'infusion de grains d'orge broyés pour la préparation du milieu MOB.	84
Figure 27. Coloration de milieu MGO relation 1:1 (grains d'orge: H ₂ O) en fonction du temps d'infusion (minutes).	84

Figure 28. Suivis de l'absorbance et de la température pendant l'infusion de grains d'orge pour la préparation du milieu MGO relation 1:1.....	85
Figure 29. MOB après refroidissement, solidification du milieu.	85
Figure 30. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 en culture pure, suivi du pH et de la consommation du glucose dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).....	95
Figure 31. Coloration de milieu Ym pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 035.	95
Figure 32. Comparaison de la croissance et pH de <i>F. langsethiae</i> 035 et 033 en culture pure dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).	96
Figure 33. Croissance de <i>G. candidum</i> en culture pure, suivis de pH et de la consommation de glucose dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).....	97
Figure 34. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 sur le milieu de culture MFG à différents temps de pré-fermentation (3, 5, 7 et 10 jours) de <i>G. candidum</i> . La croissance témoin de <i>F. langsethiae</i> est obtenue sur Ym.....	100
Figure 35. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 dans le milieu MFG-3j et Ym (témoin).	103
Figure 36. Effet du milieu MFG-3j sur la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 (Témoin : milieu Ym).	103
Figure 37. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 dans le milieu Témoin Ym et MFG-3j (22°C, 200 rpm, 10% inoculation).....	105
Figure 38. Effet du milieu MFG-3j sur la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 (Témoin : milieu Ym).	105
Figure 39. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 dans les milieux Témoin Ym (22°C, 200 rpm, 10% inoculation), MFG-1j30°C et MFG-3j30°C	106
Figure 40. Effet du milieu MFG-1j30°C et MFG-3j30°C sur la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033.	107
Figure 41. Croissance de <i>G. candidum</i> dans les milieux Ym et MFF à 22° C, 200 rpm et 10% inoculation (Le milieu MFF est obtenue après 3 jours de culture dans le milieu Ym, 22° C, 200 rpm et 10% inoculation).	108
Figure 42. Suivi de la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de <i>G. candidum</i> dans le milieu MFF (MFF+ Géo, 22° C, 200 rpm, 10% inoculation). Le milieu MFF est un milieu pré-fermenté par <i>F. langsethiae</i> non ensemencé par <i>G. candidum</i> servant de témoin (22°C, 200rpm).	109
Figure 43. Interaction directe entre <i>F. langsethiae</i> 035 et <i>G. candidum</i> en boîte de Pétri (Milieu Ym, 12 jours, 22° C, 10µL d'inoculation).	113
Figure 44. Schéma représentatif de l'équipement de filtration frontale utilisé (Sartorius).	113
Figure 45. Détermination graphique de la résistance spécifique du gâteau K ₃	115
Figure 46. Effet de différents milieux sans et avec <i>F. langsethiae</i> 033 et <i>G. candidum</i> sur le temps et le volume de filtration en filtration frontale.	117
Figure 47. Colmatage de la membrane du BRM à cause de la croissance en filaments de <i>F. langsethiae</i> 033 (5 jours, 22° C).	119

Figure 48. Effet de l'agitation et du volume de culture en fioles d'Erlenmeyer sur la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033.....	120
Figure 49. Croissance (g/L) de <i>F. langsethiae</i> 033 et <i>G. candidum</i> en culture pure et co-culture (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).....	122
Figure 50. Production de la toxine T-2 par <i>F. langsethiae</i> 033 en culture pure et co-culture avec <i>G. candidum</i> (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).	123
Figure 51. Comportement du pH pendant les cultures pures et la co-culture de <i>F. langsethiae</i> 033 et <i>G. candidum</i> (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).....	124
Figure 52. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 et <i>G. candidum</i> en culture pure et co-culture (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).....	125
Figure 53. Production de la toxine T-2 par <i>F. langsethiae</i> 035 en culture pure et co-culture avec <i>G. candidum</i> (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).	126
Figure 54. Suivi de pH pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 et <i>G. candidum</i> en culture pure et co-culture (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).	127
Figure 55. Coloration du milieu Ym a) Culture pure <i>G. candidum</i> ; b) Culture pure <i>F. langsethiae</i> 035 ; c) Co-culture <i>F. langsethiae</i> 035 et <i>G. candidum</i>	128
Figure 56. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 et <i>G. candidum</i> en culture pure et en co-culture (22° C, 200 rpm, 3% inoculation).	129
Figure 57. Production de la toxine T-2 par <i>F. langsethiae</i> 035 en culture pure et en co-culture avec <i>G. candidum</i> (22° C, 200 rpm, 3% inoculation).....	130
Figure 58. Suivi du pH pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 et <i>G. candidum</i> en culture pure et co-culture (22° C, 200 rpm, 3% inoculation).	131
Figure 59. Auto-fluorescence jaune de <i>F. langsethiae</i> 033 à 470 nm.	132
Figure 60. DOPE-FISH de <i>G. candidum</i> à 470 nm.....	132
Figure 61. Différentiation entre <i>F. langsethiae</i> 033 et <i>G. candidum</i> par DOPE-FISH. Photos de cultures pures et co-culture (22°C, 200rpm, 10% inoculation, t0 à t5 : temps d'incubation en jours).	133
Figure 62. Différentiation entre <i>F. langsethiae</i> 035 et <i>G. candidum</i> par DOPE-FISH. Photos de cultures pures et co-culture (22°C, 200rpm, 10% inoculation, a-e : temps d'incubation t0 à t4 jours de <i>F. langsethiae</i> 035 en culture pure, f-j : temps d'incubation t0 à t4 jours de <i>G. candidum</i> en culture pure et k-o : temps d'incubation t0 à t4 jours de <i>F. langsethiae</i> 035 et <i>G. candidum</i> en co-culture).	134
Figure 63. Quantification d'ADN (nombre de génomes), de la biomasse (g/L) et la production de la toxine T-2 (µg/mL) pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 en culture pure (22° C, 200 rpm, 4 jours, 10% inoculation).....	136
Figure 64. Quantification de l'ADN (nombre de génomes) et de la biomasse (g/L) pendant la croissance de <i>G. candidum</i> en culture pure (22° C, 200 rpm, 4 jours, 10% inoculation).	136
Figure 65. Quantification d'ADN pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 et <i>G. candidum</i> en co-culture (22° C, 200 rpm, 4 jours, 10% inoculation).....	137

Figure 66. Effet des traitements thermiques du milieu MFG sur la croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 (Milieu témoin : Ym, milieu non traité MFG, milieu MFG traité à 100°C pendant 30 min : Tt1, milieu MFG traité à 120°C pendant 20 min : Tt2).....	141
Figure 67. Effet des traitements thermiques du milieu MFG sur la concentration de la toxine T-2 pendant la culture de <i>F. langsethiae</i> 035 (Milieu témoin : Ym, milieu non traité MFG, milieu MFG traité à 100°C pendant 30 min : Tt1, milieu MFG traité à 120°C pendant 20 min : Tt2).....	142
Figure 68. Effet des traitements enzymatiques du milieu MFG sur la croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 (Ym : milieu témoin, MFG : milieu pré-fermenté par <i>G. candidum</i> et non traité enzymatiquement, E1 : milieu MFG traité avec l'enzyme Protéase XIV, E2 : milieu MFG traité avec l'enzyme α -chymotrypsine II, E3 : milieu MFG traité avec l'enzyme pepsine).	144
Figure 69. Effet des traitements enzymatiques du MFG sur la production de la toxine T-2 pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 035 (Ym : milieu témoin, MFG : milieu pré-fermenté par <i>G. candidum</i> et non traité enzymatiquement, E1 : milieu MFG traité avec l'enzyme Protéase XIV, E2 : milieu MFG traité avec l'enzyme α -chymotrypsine II, E3 : milieu MFG traité avec l'enzyme pepsine).	145

Liste des tableaux

Tableau 1. Teneurs maximales en aflatoxines ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en alimentation humaine.	20
Tableau 2. Teneurs maximales en aflatoxine B1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en alimentation animale.	20
Tableau 3. Teneurs maximales en OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$). dans les denrées alimentaires destinées à l'Homme	22
Tableau 4. Teneurs maximales recommandées en OTA pour les produits destinés à l'alimentation animale, selon la recommandation 2006/576/CE.	23
Tableau 5. Teneurs maximales en zéaralénone dans les denrées alimentaires en $\mu\text{g}/\text{kg}$	24
Tableau 6. Teneurs maximales dans les aliments pour animaux selon la recommandation 2006/576/CE.	24
Tableau 7. Teneurs maximales en fumonisines (somme B1+B2) dans les denrées alimentaires exprimées en $\mu\text{g}/\text{kg}$	26
Tableau 8. Teneurs maximales dans les aliments pour animaux recommandées par l'Union Européenne en fumonisines B1+B2 (Recommandation 2006/576/CE).	26
Tableau 9. Gènes de la voie de biosynthèse de trichotécènes selon l'espèce de <i>Fusarium</i>	32
Tableau 10. Espèces de <i>Fusarium</i> productrices de T-2 et HT-2.	33
Tableau 11. Production de toxines T-2 et HT-2 par différentes souches de <i>F. sporotrichioides</i> (Cultures à base de maïs, 15° C pendant 21 jours).	34
Tableau 12. Effets de la température et humidité sur la production des T-2 par <i>F. langsethiae</i> (différentes souches, sur grains d'orge, de blé et d'avoine (Rel 1 :1 :1), pendant 4 semaines) ; (Kokkonen et al., 2010).	35
Tableau 13. Moisissures et bactéries capables de transformer la toxine T-2 dans l'environnement (Sudakin, 2003).	38
Tableau 14. Différentes techniques de détection des toxines T-2 et HT-2 (Krska et al., 2001).	44
Tableau 15. Concentrations en mycotoxines ($\mu\text{g}/\text{kg}$) détectées dans des échantillons d'aliments pour animaux à partir de différentes régions d'Europe (Binder et al., 2007).	48
Tableau 16. Classification scientifique de <i>Geotrichum candidum</i> (http://www.mycobank.org/).	53
Tableau 17. Composition et concentration des milieux semi-synthétiques testés.	67
Tableau 18. Caractéristiques du module de filtration du BRM.	70
Tableau 19. Conditions opératoires de l'analyse de la toxine T-2 en HPLC-FLD.	75
Tableau 20. Caractéristiques des sondes utilisées dans la DOPE-FISH	76
Tableau 21. Effet de l'adition des nutriments dans le milieu MGO sur la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 et <i>G. candidum</i> (7 jours de culture, 22° C, 200 rpm, 10% inoculum).	86

Tableau 22. Effet de la concentration du milieu MGOx sur la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 et <i>G. candidum</i> . (7 jours de culture, 22° C, 200 rpm, 10% inoculation <i>F. langsethiae</i> 033 et 1% inoculation <i>G. candidum</i>).	87
Tableau 23. Effets de la concentration du milieu MEM sur la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 et de <i>G. candidum</i> (7 jours, 22° C, 200 rpm).	87
Tableau 24. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 et de <i>G. candidum</i> dans le milieu YEPD.	88
Tableau 25. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 et de <i>G. candidum</i> dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm).	88
Tableau 26. Effet des différents milieux sur la concentration des toxines T-2 et HT-2 produites par <i>F. langsethiae</i> 033 (7 jours, 22° C, 200 rpm).	90
Tableau 27. Méthodes de quantification des toxines T-2/HT-2 par HPLC-FLD.	91
Tableau 28. Effet de l'extraction avant la quantification des toxines T-2/HT-2 en HPLC-FLD.	92
Tableau 29. Concentrations de glucose (g/L) pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 dans les milieux MFG-3j, MFG-5j, MFG-7j et MFG-10j (22° C, 200 rpm, 10% inoculation). Le milieu Témoin est le milieu Ym.....	101
Tableau 30. Valeurs de pH pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 dans les milieux pré-fermentés MFG-3j, MFG-5j, MFG-7j et MFG-10j (22°, 200 rpm, 10% inoculation). Le milieu Témoin est le milieu Ym...	101
Tableau 31. Effet du mélange des milieux MFG et MFF sur la concentration de la toxine T-2, en fonction du temps de contact (22°C, 200 rpm).	110
Tableau 32. Valeurs de K_3 (s/m ³ /m ³) déterminées après filtration frontale des milieux de culture.	116
Tableau 33. Conditions de culture de <i>F. langsethiae</i> 033 et de <i>G. candidum</i> en BRM.	119
Tableau 34. Croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 sous agitation magnétique et différents volumes de milieu de culture.	121
Tableau 35. Quantification de l'ADN de <i>F. langsethiae</i> 033 et de <i>G. candidum</i> en culture pure et en co-culture (22° C, 200 rpm, 4 jours, 10% inoculation).	135

Index

Introduction générale

1. Etude bibliographique.....	18
1.1 Les mycotoxines.....	18
1.1.1 Les aflatoxines.....	18
1.1.2 Les ochratoxines.....	21
1.1.3 La zéaralénone.....	23
1.1.4 Les fumonisines.....	25
1.1.5 Les trichothécènes (TCT).....	27
1.2 Les toxines T-2 et HT-2.....	30
1.2.1 Voie de biosynthèse de la toxine T-2 chez <i>F. sporotrichioides</i>	31
1.2.2 Micro-organismes producteurs de T-2 et HT-2.....	32
1.2.3 Facteurs qui affectent la production des toxines T-2/HT-2.....	33
1.2.4 Propriétés toxicologiques.....	36
1.2.5 Méthodes de détection des toxines T-2 et HT-2.....	42
1.3 Contamination des céréales par <i>F. langsethiae</i> et la toxine T-2.....	45
1.4 Problèmes liés à la contamination fongique en brasserie.....	48
1.5 Méthodes pour contrôler les contaminations fongiques et toxiques.....	51
1.6 <i>Geotrichum candidum</i> : option de bio-contrôle.....	53
1.6.1 Taxonomie, morphologie et diversité.....	53
1.6.2 Sources de carbone et d'azote.....	54
1.6.3 Activité enzymatique.....	55
1.6.4 Quelques applications de <i>G. candidum</i> et de ses enzymes.....	56
1.6.5 Interaction de <i>G. candidum</i> avec d'autres micro-organismes.....	57
1.6.6 <i>Geotrichum candidum</i> – IFBM levure de malterie REF : X16010211.....	58
1.7 Etudes des interactions entre micro-organismes.....	59
1.7.1 Interactions directes.....	59
1.7.2 Interactions indirectes.....	60
1.7.3 Stratégies expérimentales pour évaluer les interactions.....	61
1.8 Description du problème.....	63
1.9 Objectif.....	63

2. Matériels et Méthodes	65
2.1 Les micro-organismes.	65
2.2 Les milieux de culture.	66
2.2.1 Milieu de conservation.....	67
2.2.2 Milieux de fermentation.	67
2.2.3 Milieux pré-fermentés.	67
2.3 Les cultures.	68
2.3.1 Pré-cultures.....	68
2.3.2 Cultures Pures.	69
2.3.3 Bioréacteur à membranes (BRM).....	69
2.3.4 Fermentations séquentielles.....	70
2.3.5 Co-culture.....	71
2.4 Caractérisation préliminaire du surnageant de la culture de <i>G. candidum</i> (MFG).	71
2.4.1 Traitements thermiques du milieu MFG.....	71
2.4.2 Traitements enzymatiques du milieu MFG.....	72
2.5 Méthodes analytiques.	73
2.5.1 Quantification de biomasse : méthode gravimétrique.....	73
2.5.2 Dosage du glucose par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).	73
2.5.3 Dosage des toxines par HPLC couplé à un détecteur de fluorescence FLD.	73
2.5.4 Double-labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (DOPE-FISH). 75	
2.6 Quantification d'ADN	78
2.6.1 Extraction de l'ADN génomique.....	78
2.6.2 Dosage des acides nucléiques.....	78
2.6.3 Quantification de l'ADN de <i>F. langsethiae</i> / <i>G. candidum</i>	78
2.7 Calculs des paramètres stœchiométriques et cinétiques.	79
3. Sélection du milieu de culture.	80
3.1 Création du milieu de culture à base de grains d'orge entiers (MGO).	80
3.1.1 Infusion de grains d'orge entiers.....	80
3.1.2 Infusion de grains d'orge broyés.....	82
3.1.3 Infusion de grains d'orge (MGO) ratio 1:1.	84
3.1.4 Conclusion de la méthodologie d'infusion.....	85
3.2 Résultats de croissance de <i>F. langsethiae</i> et <i>G. candidum</i> sur différents milieux.	86
3.2.1 Milieu à base de grains d'orge infusés (MGO).....	86

3.2.2	Milieu d'extrait de malt (MEM).....	87
3.2.3	Milieu Yeast Extract-Peptide-Dextrose (YEPD).	88
3.2.4	Milieu Ym.	88
3.3	Résultats de la production des toxines T-2 et HT-2 par <i>F. langsethiae</i> 033 sur les différents milieux de culture.	89
3.4	Conclusion.....	90
4.	Méthode de détermination de la toxine T-2 en HPLC-FLD.	91
4.1	Sélection de la méthodologie.....	91
4.2	Quantification des toxines sans extraction.	92
4.3	Conclusion.....	93
5.	Cultures pures.....	94
5.1	Cultures pures de <i>F. langsethiae</i>	94
5.1.1	<i>F. langsethiae</i> 033.	94
5.1.2	<i>F. langsethiae</i> 035.	95
5.2	Culture pure de <i>G. candidum</i>	96
5.3	Comparaison des cultures pures de <i>F. langsethiae</i> et <i>G. candidum</i>	97
6.	Interaction indirecte entre <i>F. langsethiae</i> et <i>G. candidum</i>.	99
6.1	Culture séquentielle : croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 et 035 dans le milieu MFG.	99
6.1.1	Sélection du temps de culture (3, 5, 7 et 10 jours à 22°C) de <i>G. candidum</i> pour l'obtention du MFG : Effet sur la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033 et 035 et la production de la toxine T-2.....	99
6.1.2	Effet de la température (30°C) et du temps de culture (1 et 3 jours) de <i>G. candidum</i> sur la qualité du milieu MFG.....	106
6.2	Culture séquentielle : croissance de <i>G. candidum</i> dans le MFF.	108
6.3	Interaction de MFG et MFF.	109
6.4	Conclusion de l'interaction indirecte.	110
7.	Interaction directe.	112
7.1	En boîte de Pétri : milieu Ym.	112
7.2	Bioréacteur à membrane (BRM).....	113
7.2.1	Tests préliminaires de colmatage en filtration frontale sur les milieux présélectionnés.	113
7.2.2	Première culture en BRM.....	118
7.2.3	Effet de l'agitation magnétique.	119

7.3	Co-culture.	121
7.3.1	Inoculation à 10%.	122
7.3.2	Inoculation à 3%.	129
7.4	Différentiation de <i>F. langsethiae</i> et <i>G. candidum</i> par Double-labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization (DOPE-FISH).	131
7.5	Quantification de l'ADN.	135
7.6	Conclusion de l'interaction directe.	138
8.	Caractérisation partielle du MFG.	140
8.1	Tests thermiques.	140
8.2	Tests enzymatiques.	143
9.	Conclusions.	147
10.	Perspectives.	151
11.	Références Bibliographiques	152
12.	ANNEXES.	162
	Annexe 1 : CONSERVATION DE <i>Fusarium langsethiae</i> .	162
	ANNEXE 2: Conservation de <i>Geotrichum candidum</i> .	165
	ANNEXE 3 : Perte de la production des toxines par <i>F. langsethiae</i> .	167
	ANNEXE 4 : Problème de dissolution de la toxine T-2 dans le milieu Ym.	168

Introduction

Les céréales comme l'orge ou le blé sont fréquemment contaminées par la présence de moisissures particulièrement si les conditions climatiques (température et humidité) sont appropriées. En France, la récente apparition et implantation de l'espèce *Fusarium langsethiae* sur les orges de brasserie est devenue une source d'inquiétude. Cette espèce semble avoir supplanté d'autres *Fusarium* au cours de ces dernières années. Le risque de l'implantation de cette espèce n'est pas seulement lié à la contamination des grains d'orge au champ, mais aussi à la production par ce *Fusarium* de molécules toxiques pour l'homme et l'animal : les toxines T-2 et HT-2.

Les toxines T-2 et HT-2 sont connues pour inhiber la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines. Pendant la production de la bière, les conditions très particulières de température et d'humidité lors du maltage déclenchent le développement des moisissures contaminantes comme *F. langsethiae* et par conséquent la production de ses toxines comme la T-2. Cette contamination fongique a des effets négatifs dans les étapes de filtration et sur la qualité finale de la bière avec la possible présence de la toxine dans le produit fini. Actuellement, il n'y a pas encore de réglementation qui limite les concentrations maximales tolérables de ces toxines dans les aliments destinés à la consommation humaine ou animale.

Le projet ANR-BARSAFE (ANR-07-PNRA-025) a notamment pour but d'aboutir à une meilleure connaissance de la physiologie du champignon *F. langsethiae* au champ sur l'orge et à la mise en place de moyen de lutte biologique afin de limiter la production des toxines T2/HT2 lors du process d'élaboration de la bière. Ces travaux contribueront à la mise en place d'une réglementation de la présence des toxines T2/HT2 dans la filière bière.

Le présent travail s'inscrit dans ce projet ANR et concerne l'utilisation de la levure filamenteuse *Geotrichum candidum* en tant que biocontrôle permettant de réduire la concentration finale des toxines T2/HT2 dans la bière.. A l'heure actuelle, si quelques essais d'ajout de cette levure lors du process d'élaboration de la bière (lors du maltage) présagent un effet de biocontrôle intéressant, le mode d'action est inconnu. Ainsi, le principal objectif des travaux présentés ci-après est donc l'étude de l'interaction entre *F. langsethiae* et *G. candidum* qui conduit à une réduction de la concentration finale des toxines T2/HT2 dans la bière.

Dans la partie ‘revue bibliographique’, on présentera de manière générale les types de mycotoxines produites par différentes moisissures qui contaminent les céréales en se focalisant sur la présence du champignon *F. langsethiae* sur les grains d’orges utilisés pour la malterie et les conséquences pour la filière de la production des toxines T2/HT2. Un bilan sera fait sur l’utilité d’ajouter la levure *G. candidum* lors du maltage. Un focus sera également fait sur la manière de mener des travaux d’interactions microbiennes en laboratoire.

La partie ‘matériels et méthodes’ présente la mise en œuvre de l’ensemble des outils expérimentaux pour conduire les tests d’interaction entre *F. langsethiae* et *G. candidum* et comprendre ce qui se passe lors cette interaction microbienne.

Les résultats sont présentés en différentes sections en fonction du développement du travail: tout d’abord, la sélection du milieu de culture liquide pour les deux micro-organismes, la conduite des cultures pures de ces micro-organismes, les résultats d’interactions indirecte et directe, et finalement les analyses préliminaires de caractérisation de l’agent produit par *G. candidum* mis en jeu dans la réduction de la concentration finale des toxines T2/HT2.

Enfin, les conclusions, discussions de ce travail et les perspectives proposées sont dans la dernière partie.

1. Etude bibliographique.

1.1 Les mycotoxines.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, non protéiques toxiques, naturellement produites par des micro-organismes fongiques qui se développent dans plusieurs environnements. Ce sont des métabolites secondaires parce qu'elles ne sont pas directement nécessaires à la vie des champignons, mais elles sont produites après la croissance exponentielle, suite à un stress. Les toxines sont trouvées dans les spores et le mycélium, et diffusent dans le substrat qu'elles contaminent.

Il y a plus de 400 mycotoxines dans le monde, mais les mycotoxines les plus fréquentes qui contaminent les produits alimentaires sont les aflatoxines, les ochratoxines, la zéaralénone, les fumonisines, et les trichothécènes.

1.1.1 Les aflatoxines.

Actuellement 18 aflatoxines différentes ont été identifiées parmi lesquelles l'aflatoxine B1 (AFB1) et les aflatoxines B2 (AFB2), G1 (AFG1) et G2 (AFG2). Il existe des formes hydroxylées des aflatoxines B1 et B2 appelées aflatoxines M1 et M2 (M pour « Milk » en anglais). L'hydroxylation se réalise dans le tractus digestif de certains animaux. Les dérivés sont retrouvés dans le lait ainsi que les urines et les fèces. Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire de 312 à 330 g/mol, très peu solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants non polaires. Sous lumière ultra-violette, elles fluorescent : en bleu pour les AFB « blue », et en vert pour les AFG « green ». Les aflatoxines sont constituées à partir d'un assemblage de coumarine et de 3 furanes. La Figure 1 montre la structure générale des aflatoxines. Les plus communes sont les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 qui sont susceptibles d'être produites par certaines souches d'espèces appartenant au genre *Aspergillus* telles que *A. flavus* pouvant produire les aflatoxines B1 et B2. *A. parasiticus* et *A. nomius* peuvent produire, en plus, les aflatoxines G1 et G2. *A. flavus* est le principal agent de contamination du maïs et des graines de coton, tandis qu'*A. parasiticus* est présent surtout dans les graines d'arachide. L'aflatoxine B1 est reconnue comme étant l'un des plus puissants cancérigènes d'origine naturelle.

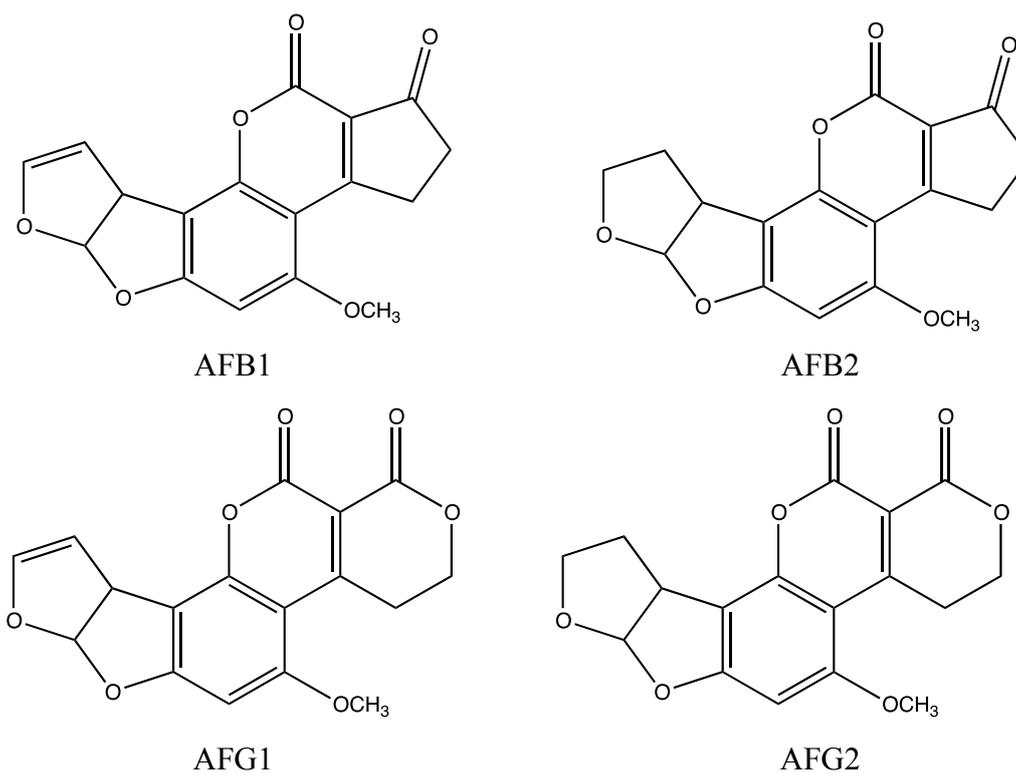


Figure 1. Structure chimique des aflatoxines B1, B2, G1 et G2.

Dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2011/CE et ses modifications) fixant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et de la directive 2002/32 (et ses modifications) sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux, des teneurs maximales ont été fixées pour les aflatoxines (

Tableau 1 et Tableau 2). Les concentrations maximales acceptées varient par rapport au type de consommateur et au type de grains. Par exemple pour les produits à base de céréales, la teneur d'aflatoxine B1 acceptée est entre 2 et 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les adultes mais si ces produits sont destinés aux enfants la concentration maximale est de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tableau 1. Teneurs maximales en aflatoxines ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en alimentation humaine.

Aflatoxines	Matrice	Teneur maximale en $\mu\text{g}/\text{kg}$
Aflatoxine B1	Arachides (cacahuètes) + autres grains + fruits secs	De 2,5 ou 8 selon le produit et son stade de transformation
	Céréales	2 ou 5 selon le produit et son stade de transformation
	Certaines épices	5
	Préparations à base de céréales pour enfants en bas âge	0,1
Aflatoxines B1 + B2 + G1 + G2	Arachides (cacahuètes) + autres grains + fruits secs	De 4, 10 ou 15 selon le produit et son stade de transformation
	Céréales	4 ou 10 selon le produit et son stade de transformation
	Certaines épices	10
Aflatoxine M1	Lait	0,05
	Préparations pour enfants en bas âge	0,025

Tableau 2. Teneurs maximales en aflatoxine B1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en alimentation animale.

Type d'aliments	Teneur maximale en $\mu\text{g}/\text{kg}$ (teneur en humidité de 12%)
Toutes les matières des aliments pour animaux	20
Aliments complets pour bovins, ovins et caprins à l'exception de :	20
- Aliments complets pour bétail laitier	5
- Aliments complets pour veaux et agneaux	10
Aliments complets pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complets	10
Aliments complémentaires pour bovins, ovins et caprins (à l'exception des aliments complémentaires pour bétails laitiers, veaux et agneaux)	20
Aliments complémentaires pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complémentaires	5

1.1.2 Les ochratoxines.

Les ochratoxines sont des métabolites secondaires produits par des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Les ochratoxines sont une famille de toxines avec une structure à base d'isocoumarine parfois chlorée couplée par une liaison amide à une molécule de L-phénylalanine. Leur présence est liée au climat, particulièrement lors de la récolte, et aux conditions de stockage après récolte. Parmi les 9 ochratoxines décrites, seules l'ochratoxine A (OTA) et très rarement l'ochratoxine B ont été retrouvées sur des produits végétaux.

L'ochratoxine A (Figure 2) est produite sous les climats froids et tempérés par *P. verrucosum* et en régions chaudes et tropicales par *A. ochraceus* reconnu comme *A. westerdijkiae* (Samson et al., 2006). *P. verrucosum*, spécifiquement associé aux céréales stockées, est très commun en Europe du Nord et Canada. *A. westerdijkiae* est le champignon le plus commun dans le café vert et les épices. Il est également retrouvé sur les graines de cacao, le soja, les cacahuètes, le riz et le maïs. Un autre *Aspergillus* producteur d'OTA susceptible de contaminer la filière raisin est *A. carbonarius* (Bejaoui et al., 2006).

Bien que les infections fongiques puissent avoir lieu avant et après récolte, la synthèse de l'ochratoxine A se fait surtout lors du stockage. Les denrées alimentaires à haut risque de contamination par l'ochratoxine sont les céréales.

L'OTA est connue pour sa néphrotoxicité. Elle s'avère également immunotoxique, tératogène et neurotoxique. Son pouvoir cancérigène est établi chez l'animal, mais les preuves sont encore insuffisantes chez l'homme.

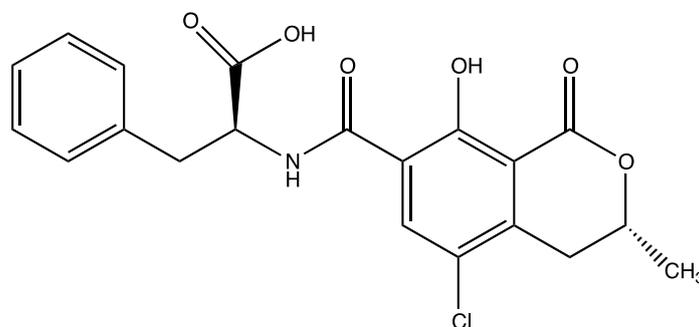


Figure 2. Structure chimique de l'ochratoxine A.

Pour l'alimentation humaine, dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE) fixant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, les teneurs maximales ont été fixées pour l'OTA (Tableau 3).

Tableau 3. Teneurs maximales en OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$). dans les denrées alimentaires destinées à l'Homme

Matrice	Teneur maximale ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Grains de céréales brutes (y compris le riz et le sarrasin)	5
Produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation directe)	3
Préparation à base de céréales pour enfants en bas âge et aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons	0,5
Raisins secs (Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	10
Grains de café torréfié et café torréfié moulu	5
Café soluble (instantané)	10
Vin (rouge, blanc et rosé et autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins)	2
Jus de raisin, ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons, y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué.	2

Pour l'alimentation animale, aucune teneur maximale en OTA n'est fixée dans les aliments pour animaux. Cependant, l'Union Européenne recommande (Recommandation 2006/576/CE de la commission du 17 août 2006 concernant la présence de déoxynivalénol, de zéaralénone, d'ochratoxine A, des toxines T-2 et HT-2 et de fumonisines dans les produits destinés à l'alimentation animale) d'appliquer des teneurs maximales en OTA dans les matières premières et aliments destinées à l'alimentation animale (Tableau 4).

Tableau 4. Teneurs maximales recommandées en OTA pour les produits destinés à l'alimentation animale, selon la recommandation 2006/576/CE.

Matrice	Teneur maximale en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux : céréales, produits et sous produits de céréales et fourrages	250
Aliments complémentaires et complets pour :	
Les porcs	50
Les volailles	100

1.1.3 La zéaralénone.

La zéaralénone (ZEA) est une mycotoxine qui contamine les céréales (maïs, shorgo, orge, blé, riz, avoine...), principalement au champ, lors du stockage ou la transformation. Les espèces de champignons productrices appartiennent pour la plupart au genre *Fusarium*. La ZEA ou F-2 toxine est produite principalement par *F. graminearum* et *F. culmorum* (Grosjean and Barrier-Guillot, 2004). Elle a une structure chimique à base d'une lactone de l'acide résorcyclique (Figure 3).

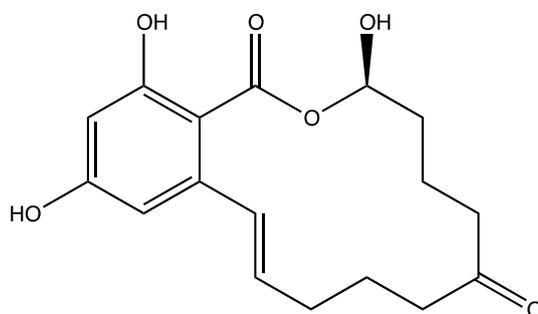


Figure 3. Structure chimique de la zéaralénone (ZEA).

Pour l'alimentation humaine, le règlement 1126/2007/CE modifiant le règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) fixe les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, notamment pour la zéaralénone (Tableau 5). Pour l'alimentation animale (matières premières et alimentaires), aucune teneur maximale en zéaralénone n'est fixée, bien que la Commission européenne fasse des recommandations : 2006/576/CE (Tableau 6).

Tableau 5. Teneurs maximales en zéaralénone dans les denrées alimentaires en µg/kg.

Produit	Teneur maximale (µg/kg)
Céréales brutes autres que le maïs.	10
Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide.	350
Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales, son et germe en tant que produit fini commercialisé pour la consommation humaine directe.	75
Huile de maïs raffinée.	400
Pain (y compris les petits produits de boulangerie), pâtisseries, biscuits collations aux céréales et céréales pour petit-déjeuner à base de maïs).	50
Maïs destiné à la consommation humaine directe, collations au maïs et céréales pour petit-déjeuner à base de maïs).	100
Préparations à base de céréales (à l'exception de préparation à base de maïs) et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge.	20
Préparations à base de maïs destinées aux nourrissons et enfants en bas âge.	20
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est supérieure à 500µm auxquelles s'applique le code NC 110313 ou 11032040 et autres produits de mouture de maïs dont la taille des particules est supérieure à 500µm destinés à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 19041010.	200
Fractions de mouture de maïs dont la taille des particules est inférieure à 500µm auxquelles s'applique le code NC 110220 et autres produits de mouture de maïs dont la taille des particules est inférieure à 500µm destinés à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 19041010.	300

Tableau 6. Teneurs maximales dans les aliments pour animaux selon la recommandation 2006/576/CE.

Produits	Teneur maximale en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux :	
Les céréales et sous-produits céréaliers	2000
Les sous-produits de maïs	300
Aliments complémentaires et complets pour :	
Les porcelets et les jeunes truies	100
Les truies et les porcs d'engraissement	250
Les veaux, le bétail laitier, les ovins (y compris les agneaux) et les caprins (y compris les chevreaux)	500

1.1.4 Les fumonisines.

Les fumonisines font aussi parties des toxines appelées fusariotoxines. Elles sont produites principalement par *F. verticilloides* et *F. proliferatum*. Les fumonisines constituent un groupe d'au moins 15 mycotoxines structurellement reliées. Les plus importantes sont les fumonisines B1 et B2 (Figure 4). Ces mycotoxines sont constituées par une chaîne hydroxylée et hydrocarbonée avec des groupes méthyl et amine. La fumonisine B1 a un groupe hydroxyle de plus que la B2 (European Mycotoxins Awareness Network).

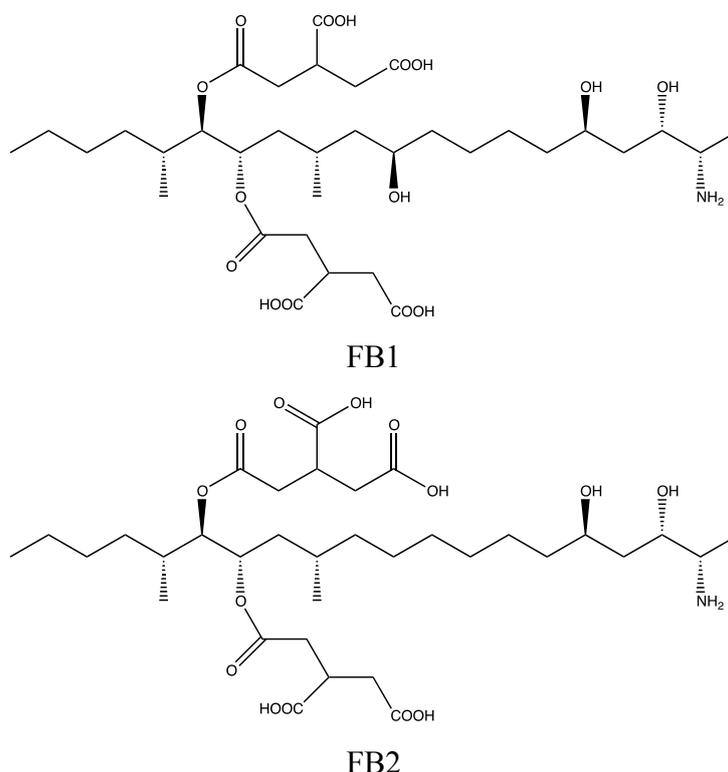


Figure 4. Structure chimique des fumonisines B1 et B2.

En alimentation humaine, dans le cadre du règlement 1126/2007/CE modifiant le règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) fixant les teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, des teneurs maximales ont été fixées pour les fumonisines (Tableau 7).

Tableau 7. Teneurs maximales en fumonisines (somme B1+B2) dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg.

Produit	Teneur max.(µg/kg)
Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide.	4000
Maïs destiné à la consommation humaine directe, aliments à base de maïs destiné à la consommation humaine directe.	1000
Céréales pour petit-déjeuner à base de maïs et collations à base de maïs.	800
Préparations à base de maïs et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge.	200
Fractions de mouture de maïs de taille de particules > 500µm auxquelles s'applique le code NC 110313 ou 11032040 et autres produits de mouture de maïs de taille de particules > 500µm ou destiné à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 19041010.	1400
Fractions de mouture de maïs de taille de particules ≤ 500µm auxquelles s'applique le code NC 110220 et autres produits de mouture de maïs de taille de particules ≤ 500µm ou destiné à la consommation humaine directe auxquelles s'applique le code NC 19041010.	2000

En alimentation animale, aucune teneur maximale en fumonisines n'est fixée dans les matières premières et les aliments pour animaux par la Directive 2002/32. Néanmoins, la Commission recommande (Recommandation 2006/576/CE) d'appliquer des teneurs maximales en fumonisines B1 + B2 dans les matières premières et aliments destinés à l'alimentation animale (Tableau 8).

Tableau 8. Teneurs maximales dans les aliments pour animaux recommandées par l'Union Européenne en fumonisines B1+B2 (Recommandation 2006/576/CE).

Produit	Teneur maximale recommandée en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux :	
Le maïs et les produits à base de maïs.	60 000
Aliments complémentaires et complets pour :	
Les porcs, les équidés, les lapins et les animaux familiers.	5 000
Les poissons.	10 000
La volaille, les veaux (<4 mois), les agneaux et les chevreaux.	20 000
Les ruminants adultes (>4 mois) et les visons.	50 000

1.1.5 Les trichothécènes (TCT).

Les trichothécènes sont des fusariotoxines composées exclusivement d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Le premier trichothécène a été isolé en 1948 à partir du champignon *Trichothecium roseum*. Grâce à ce microorganisme et depuis cette époque, ces molécules sont connues comme des trichothécènes (Desjardins et al., 1993). Ces mycotoxines appartiennent au groupe des sesquiterpénoïdes qui possèdent un squelette de trois cycles appelé trichothécane (Figure 5) formé par un cyclopentane, un cycle à six chaînons oxygénés et quatre groupes méthyles. Tous les trichothécènes possèdent une double liaison en position 9-10 ainsi qu'un groupement époxyde en position 12-13. Sur la structure générale des trichothécènes peuvent figurer en différentes positions des groupes hydroxyles, acyles ou époxydes. Les trichothécènes possèdent six centres de chiralité.

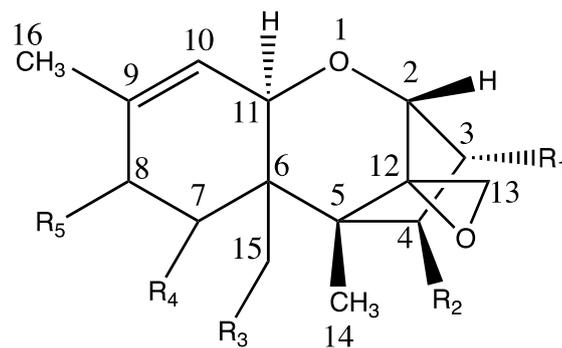
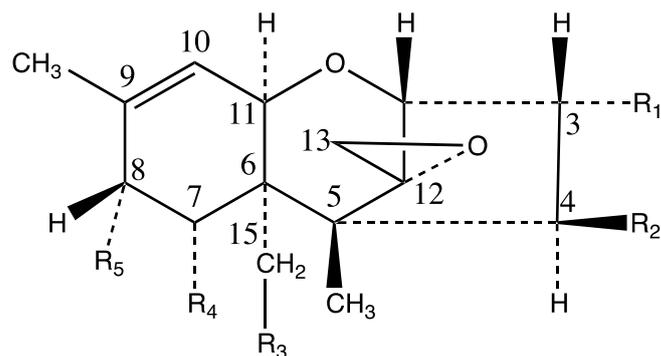


Figure 5. Structure chimique de trichothécane.

Dans les années 70, plus de quarante trichothécènes sont isolés et classés en quatre groupes en fonction des substituants trouvés dans la molécule. Actuellement entre 150 et 170 toxines de type trichothécène sont connues (Čonková et al., 2003; Krska et al., 2001).

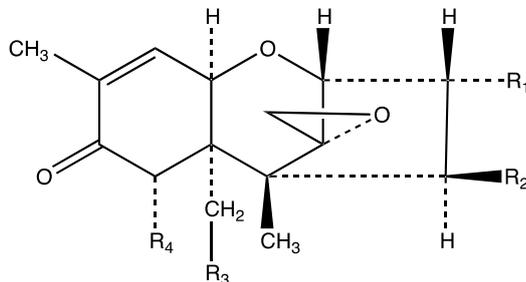
- Groupe A : ces trichothécènes n'ont pas de fonction cétone en C8. Les plus importants sont la toxine T-2, HT-2 et le diacétoxycirpénol. La Figure 6 montre les structures chimiques des ses représentants.



Trichothécènes	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
T-2 toxine	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2 toxine	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetoxyscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
Neosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OH

Figure 6. Structure chimique des trichothécènes A.

- Groupe B : ces trichothécènes ont une fonction cétone en C8 (Figure 7). Les plus importants sont le nivalénol, le déoxynivalénol (DON) et la fusarénone-X.



Trichothécènes	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Nivalénol	OH	OH	OH	OH
Déoxynivalénol	OH	H	OH	OH
Fusarénone-X	OH	OAc	OH	OH
Diacetylnivalénol	OH	OAc	OAc	OH
3-Acetyldeoxynivalénol	OAc	H	OH	OH
15-Acetyldeoxynivalénol	OH	H	OAc	OH

Figure 7. Structure chimique des trichothécènes B.

- Groupe C : ces trichothécènes ont un époxyde supplémentaire en C7-C8 ou C9-C10 comme la crotocine (Figure 8).

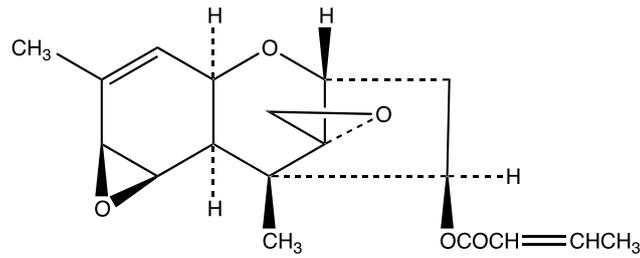
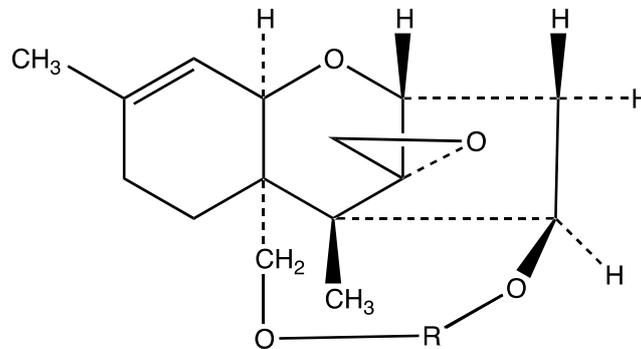


Figure 8. Structure chimique la Crotonine, trichothécènes du groupe C.

- Groupe D : ces trichothécènes ont un macrocycle entre C4 et C15 comme les verrucarines, les roridines (Figure 9) et les satratoxines.



Trichothécènes	R
Roridine A	-C(=O)CH(OH)CH(CH ₃)CH ₂ CH ₂ OC(CHOH)CH=CHCH=CHC(=O)-

Figure 9. Structure chimique générale des trichothécènes D.

Les trichothécènes des groupes A et B sont les plus fréquemment retrouvés dans les denrées alimentaires. L'exposition aux TCT des groupes C et D est plus fréquemment réalisée par voies cutanée et respiratoire.

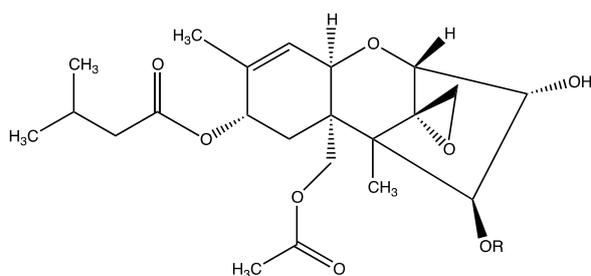
Les trichothécènes se présentent en général sous la forme de poudres incolores et cristallisables. Leur poids moléculaire varie de 154 à 697 daltons, pour la plupart entre 300 et 600 daltons. Ils sont optiquement actifs et n'absorbent pas les radiations ultraviolettes ou visibles, excepté ceux du groupe D qui absorbent à 260 nm grâce à des doubles liaisons conjuguées.

Ce sont des composés neutres d'un point de vue acido-basique. Ils sont généralement solubles dans les solvants modérément polaires tels que les alcools, les solvants chlorés, l'acétate d'éthyle ou l'éther éthylique.

Ces mycotoxines sont remarquablement stables à la température, même lorsqu'elles sont conservées longtemps à température ambiante. La toxicité des trichothécènes provient essentiellement du groupe époxyde. Dans la toxine T-2, ce groupe détermine fortement sa toxicité, si le cycle est ouvert la toxicité diminue de manière significative (Peng et al., 1996). Les trichothécènes ne sont pas non plus détruits lors de la cuisson des aliments.

1.2 Les toxines T-2 et HT-2.

La toxine T-2 (12,13-époxytrichothéc-9-ène-3 α , 4 β , 8 α , 15-tétraol, 4,15-diacétate 8-isovalérate) et la toxine HT-2 (12,13-époxytrichothéc-9-ène-3 α , 4 β , 8 α , 15-tétraol, 15-diacétate 8-isovalérate) sont les toxines les plus représentatives du groupe A des trichothécènes (Figure 10). Les formules chimiques sont C₂₄H₃₄O₉ et C₂₂H₃₂O₈ pour la T-2 et l'HT-2 ; les poids moléculaires de 466,50 et de 424,5 Da respectivement. Leurs points de fusion sont respectivement de 151-152° C et ils sont solubles dans les solvants organiques polaires comme l'acétone, l'acétonitrile, le chloroforme, le diéthyle éther, l'éthyle acétate ou le dichlorométhane.



Toxine T-2 : R=Ac

Toxine HT-2 : R=H

Figure 10. Structure chimique des toxines T-2 et HT-2.

Ces toxines sont produites par de nombreuses espèces de *Fusarium*. Les grains les plus contaminés sont le blé, le maïs, l'avoine, le seigle, le riz, les fèves et le soja.

1.2.1 Voie de biosynthèse de la toxine T-2 chez *F. sporotrichioides*.

La voie de biosynthèse des trichothécènes contient de multiples réactions complexes qui commencent avec la cyclisation du farnesyl pyrophosphate (FPP) pour donner la molécule de trichodiène, et finir avec la production de différents toxines comme : 3-aDON, nivalenol, 15-aDON, T-2 ou HT-2 selon l'espèce de *Fusarium* et les conditions de culture.

Puis des réactions d'oxygénation, d'isomérisation, de cyclisation et d'estérification sont effectuées pour arriver à la toxine T-2 à partir du FPP. La trichodiène synthase est l'enzyme qui catalyse la première réaction de cyclisation à partir du farnesyl pyrophosphate. Cette enzyme est une enzyme de type terpène cyclase impliquée dans la biosynthèse de terpènes cycliques. La trichodiène synthase est un homodimère avec une sous-unité de 45kDa qui est régulée par le gène *Tri5* et qui a besoin de la présence de Mg^{2+} et est inhibé par le pyrophosphate (Blesa et al., 2010; Desjardins et al., 1993; Sweeney and Dobson, 1998). La Figure 11 montre les gènes impliqués dans la synthèse de la toxine T-2 à partir du gène *Tri5* jusqu'au gène *Tri8*.

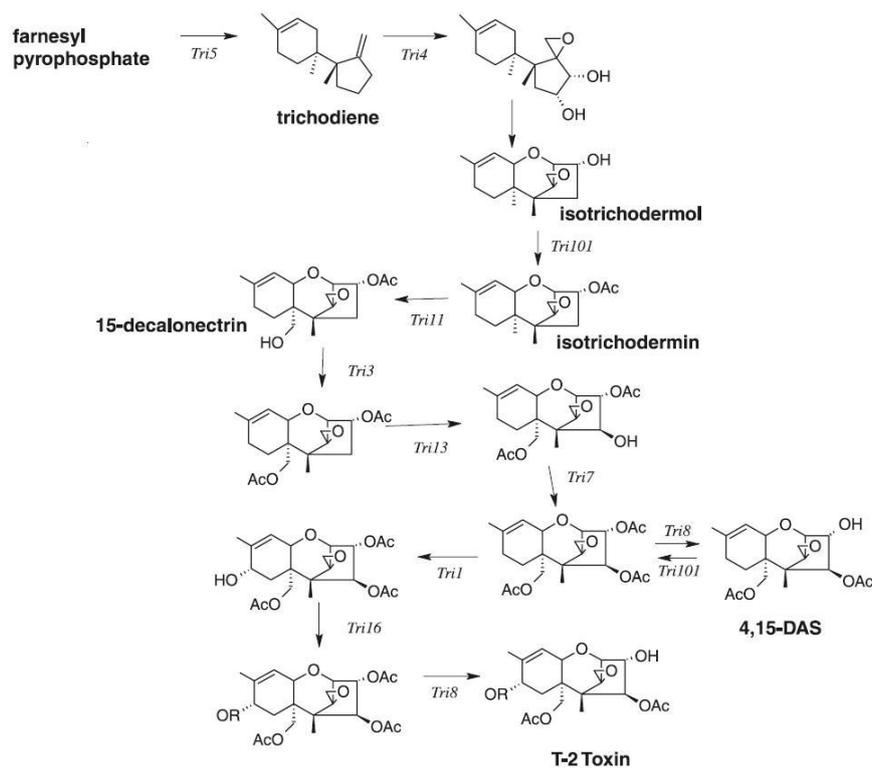


Figure 11. Voie de biosynthèse de la toxine T-2 chez *F. sporotrichioides* (Alexander et al., 2008).

Les gènes qui codent les réactions de la voie de biosynthèse sont présentés dans le Tableau 9. Des études moléculaires réalisées notamment chez *F. sporotrichioides* et *F. graminearum* ont permis de confirmer la présence de l'ensemble de ces gènes chez ces 2 espèces. Chez les autres espèces présentées dans le Tableau 9, les résultats sont encore à compléter. Dans le cas de *F. langsethiae* seul le gène *Tri5* a été identifié. La séquence du gène *Tri5* a été exploitée dans le développement de tests basés sur l'utilisation de la PCR pour détecter les espèces productrices de trichothécènes et pour étudier la voie de biosynthèse de trichothécènes dans les espèces de *Fusarium*. Wilson et al. (2004) ont trouvé que *F. langsethiae* et *F. sporotrichioides* partagent une similarité dans les régions 5'- du gène *Tri5* et pour cette raison *F. langsethiae* a la capacité de produire la toxine T-2.

Tableau 9. Gènes de la voie de biosynthèse de trichothécènes selon l'espèce de *Fusarium*.

	Tri8	Tri7	Tri3	Tri4	Tri6	Tri5	Tri10	Tri9	Tri11	Tri12	Tri13	Tri14	Tri1	Tri16	Tri15	Tri101
<i>F. graminearum</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>F. sporotrichioides</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>F. culmorum</i>			X	X	X	X	X	X	X	X						X
<i>F. cerealis</i>			X	X	X	X	X	X	X	X						X
<i>F. lunulosporum</i>			X	X	X	X	X	X	X	X						
<i>F. pseudograminearum</i>			X	X	X	X	X	X	X	X						X
<i>F. sambucinum</i>						X	X									
<i>F. poae</i>						X										
<i>F. langsethiae</i>						X										
<i>F. kyushuense</i>						X										

X : présence du gène donné chez l'espèce de *Fusarium* choisie

1.2.2 Micro-organismes producteurs de T-2 et HT-2.

Les trichothécènes sont produits par plusieurs genres de champignons comme *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Verticimonosporium*, et *Phomopsis* (Čonková et al., 2003). Le genre *Fusarium* est le principal producteur de ces toxines.

Les espèces connues productrices de toxines T-2 et HT-2 sont listées dans le Tableau 10. Le potentiel toxique des espèces de *Fusarium* diffère selon les types de souches et l'origine géographique. La production de mycotoxines par *Fusarium* est fortement affectée par l'oxygène, le pH, l'environnement, la pression osmotique et la température.

Fusarium langsethiae est de plus en plus répandue sur les céréales dans les pays d'Europe. Elle a été isolée à partir de grains de blé, d'avoine et d'orge contaminés dans les régions centrale et nordique. Elle est proposée comme la principale productrice de T-2 et de HT-2 en Finlande (Edwards et al., 2009) et est responsable des concentrations des toxines T-2 et HT-2 supérieures à 350 et 500 µg/kg respectivement, dans les céréales de Norvège (Medina and Magan, 2011). Cette espèce de *Fusarium* est récemment la plus fréquemment isolée dans l'orge en France (Fournier and Boivin, 2007).

Tableau 10. Espèces de *Fusarium* productrices de T-2 et HT-2.

Espèce de <i>Fusarium</i>	Référence
<i>F. sporotrichioides</i>	Moss and Thrane (2004)
<i>F. poae</i>	Moss and Thrane (2004)
<i>F. sambucinum</i>	Moss and Thrane (2004)
<i>F. tumidum</i>	Moss and Thrane (2004)
<i>F. armeniacum</i>	Moss and Thrane (2004)
<i>F. musarum</i>	Moss and Thrane (2004)
<i>F. langsethiae</i>	Strub et al. (2010)

1.2.3 Facteurs qui affectent la production des toxines T-2/HT-2.

La croissance d'un champignon toxigène et son potentiel toxique sont affectés par des facteurs environnementaux comme la température, l'humidité, le pH, les interactions microbiennes, le type de moisissures, la composition et disponibilité en nutriments. Dans le champ les conditions qui peuvent affecter la production de mycotoxines sont le climat, les pratiques agricoles, la plante hôte et la présence d'autres micro-organismes dans la plante (Kokkonen et al., 2010).

Le métabolisme secondaire des moisissures est régulé par des mécanismes génétiques qui répondent aux stimulations de l'environnement. Le même champignon peut produire différentes mycotoxines dans différentes conditions de culture. La capacité de production des mycotoxines peut varier selon les espèces fongiques et les souches. Par exemple, le Tableau 11 montre les résultats de Marasas et al. (1987) où différentes souches (NRRL 3299, NRRL 3510, M-1-1, HPB 071178-13 et F-38) de la même espèce de *F. sporotrichioides* ont produit

différentes concentrations de toxines dans les mêmes conditions de culture. Même si l'espèce ou la souche possèdent les gènes pour la biosynthèse, les toxines ne sont produites que dans des conditions particulières que ce soit au laboratoire ou au champ.

Tableau 11. Production de toxines T-2 et HT-2 par différentes souches de *F. sporotrichioides* (Cultures à base de maïs, 15° C pendant 21 jours).

Souche	Production de toxines (mg/kg)	
	Toxine T-2	Toxine HT-2
NRRL 3299	930	110
NRRL 3510	1 300	200
M-1-1	660	120
HPB 071178-13	460	64
F-38	130	36

Kokkonen et al. (2010) ont testé différentes conditions de culture (température, humidité et milieu de culture de grains : d'orge, d'avoine et de blé (Relation 1 :1 :1) avec différentes espèces et souches. Dans le cas de *F. langsethiae*, toutes les souches testées ont produit 4 trichothécènes (T-2, HT-2, DAS, NEO) dans toutes les conditions évaluées. Dans cette étude, la souche, le substrat et les facteurs environnementaux ont affecté les concentrations produites de la toxine T-2. Le Tableau 12 montre les changements dus aux variations en température et humidité dans les concentrations des toxines T-2 et HT-2 obtenues pour la même espèce mais avec différentes souches. Les concentrations en toxines T-2 et HT-2 trouvées chez les souches de *F. langsethiae* 05010, 05013 et 05014 à 15° C et avec une a_w de 0,994 sont très supérieures à celles obtenues à 25° C avec la même valeur d' a_w . Par exemple pour la souche 05010, les concentrations en T-2/HT-2 sont respectivement de 91 et 23 mg/kg à 15°C, pour une a_w de 0,994 contre 3,90 mg/kg et 4,50 à 25°C pour la même valeur d' a_w . Par contre, pour une même température (25°C), les productions de toxines sont quasiment similaires quelque soit la valeur de l' a_w . Ainsi, pour la souche 05013, la concentration en toxine T-2 est de 1,50 mg/kg à une valeur d' a_w de 0,994 contre 1,70 mg/kg à une valeur d' a_w de 0,960. Les auteurs ont conclu que la disponibilité et le type de substrat sont des facteurs qui affectent la quantité et qualité de la production de mycotoxines et il est

possible que l'origine de la souche détermine la production des toxines dans le même substrat. C'est à dire que les souches isolées à partir de blé se développent mieux dans les milieux à base de blé. D'après ces résultats, ils ont confirmé que les souches fongiques d'une même espèce et d'une même région d'origine (Finlande, dans ce cas), peuvent différer dans la production des mycotoxines. Par contre, les résultats des études *in vivo* ne peuvent pas être extrapolés *in planta* parce que dans le champ plusieurs facteurs peuvent affecter le développement fongique et la production de mycotoxines. De manière générale ils ont conclu que *F. langsethiae* et *F. sporotrichioides* se développent dans des conditions humides et froides (a_w : 0,994 et 15° C) avec une forte production de trichothécènes de type A.

Tableau 12. Effets de la température et humidité sur la production des T-2 par *F. langsethiae* (différentes souches, sur grains d'orge, de blé et d'avoine (Rel 1 :1 :1), pendant 4 semaines) ; (Kokkonen et al., 2010).

<i>F. langsethiae</i>		a_w : 0,994, 15° C		a_w : 0,994, 25° C		a_w : 0,960, 25° C	
Souche	Isolée de :	T-2 (mg/kg)	HT-2 (mg/kg)	T-2 (mg/kg)	HT-2 (mg/kg)	T-2 (mg/kg)	HT-2 (mg/kg)
05010	Avoine	91,0	23,0	3,90	4,50	3,90	4,10
05013	Blé	8,60	3,60	1,50	2,30	1,70	3,00
05014	Orge	36,0	13,0	6,90	7,10	3,40	4,00

Blesa et al. (2010) ont trouvé que la production de T-2 par *F. sporotrichioides* est proportionnelle à la concentration de glucose présent dans le milieu (PDA). Une concentration de 20% de glucose donne 1,45 mg de T-2 par kg. Ils ont émis l'hypothèse que la présence de glucose est positivement corrélée avec la production de T-2 parce que les trichothécènes sont considérés comme des dérivés des isoprénoides. Cette hypothèse est basée sur le fait que l'isopentenyl diphosphate est le principal intermédiaire de la biosynthèse d'isoprénoides, que l'acetyl CoA/mevalote est le précurseur universel des isoprénoides et que l'acetyl CoA est un des produits de la glycolyse.

Strub et al. (2010) ont étudié les effets des conditions de température (5-35° C) et d' a_w (0,630-0,997) sur la croissance de *F. langsethiae* et la production des toxines T-2/HT-2 sur grains d'orge. Ils ont trouvé que la température optimale et l'activité d'eau optimale sont de 28° C et de 0,997 respectivement.

Medina and Magan (2011) ont trouvé que la disponibilité de l'eau est le facteur qui contrôle la production des toxines T-2 et HT-2. Ils ont testé des souches isolées en Angleterre, Finlande, Norvège et Suède. Ils ont fait les tests sur un milieu à base de farine d'avoine, d'eau et d'agar (2%, w/v) pendant 10 jours. Ils ont trouvé des différences dans les concentrations de toxines détectées par rapport à l'origine des souches. La souche qui donne la plus forte concentration a pour origine la Suède. Dans la culture à une a_w de 0,995 et une température de 10°C, ils ont trouvé une concentration en toxine de 8 µg/g d'agar et à 20° C une concentration de 20 µg/g d'agar. A une température de 25° C cette même souche produit la toxine T-2 à une concentration inférieure à 1 µg/g d'agar avec une a_w de 0,95 mais avec une a_w de 0,99, la concentration en toxine est de 13 µg/g d'agar. La souche anglaise produit la toxine T-2 à 25°C à une concentration de 3 µg/g d'agar avec une a_w de 0,95 et de 11 µg/g d'agar avec une a_w de 0,99. Dans cette étude l' a_w et les températures optimales trouvées pour la production de T-2 et HT-2 sont entre 0,98-0,995 et 20-30° C respectivement.

1.2.4 Propriétés toxicologiques.

1.2.4.1 Métabolisme et dégradation de la toxine T-2.

Aucune donnée n'est disponible sur le métabolisme de la toxine T-2 et la toxine HT-2 chez l'homme. Par contre chez les animaux, la toxine T-2 est rapidement absorbée après ingestion dans la plupart des espèces et distribuée dans l'organisme sans accumulation dans un organe spécifique. Les concentrations plasmatiques maximales sont observées après 30 minutes chez les rongeurs (European-Commission, 2001).

Plusieurs études ont été réalisées concernant la voie de dégradation de la toxine T-2. La vie moyenne de la toxine T-2 dans le plasma est inférieure à 20 minutes. La toxine T-2 est rapidement métabolisée par déacétylation, hydroxylation, glucoronoconjugation et dé-époxydation. La principale voie de biotransformation est une déacétylation au niveau du carbone 4, qui aboutit à la formation de la toxine HT-2. Les résultats montrent que le métabolisme *in vivo* est catalysé par une carboxyestérase non spécifique, présente dans le sérum, le tractus gastro-intestinal des animaux et plusieurs tissus, principalement dans le foie. La HT-2 peut être ensuite deacétylée, hydroxylée et conjuguée selon différentes voies métaboliques en 3'-hydroxy HT-2, T-2 triol, 3'-hydroxy T-2 triol, 4-deacetylneosolaniol qui est converti en T-2 tetraol et ses conjugués glucoronides (European-Commission, 2001).

Dans le rumen, le carbone 4 de la toxine T-2 est rapidement déacétylé pour former la toxine HT-2 qui est ensuite déacétylée au niveau du carbone 15 en T-2 triol (Yoshizawa et al., 1981; Yoshizawa et al., 1980). L'isovaléryl-déacétylation du carbone 8 forme le néosolaniol (Westlake et al., 1987). Les voies de bioconversion ruminale de la T-2 sont résumées dans la Figure 12.

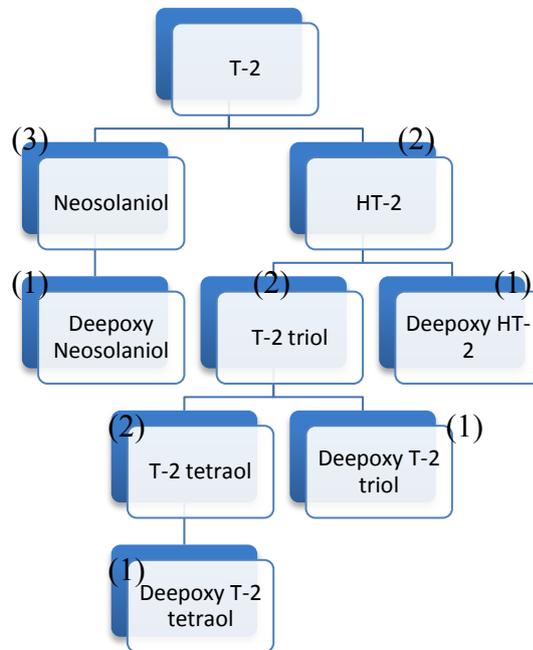


Figure 12. Voies métaboliques possibles de transformation de la toxine T-2 dans le rumen. Réactions (1) : Deepoxydation, (2) : Deacetylation et (3) : Isovaleryl deesterification (EFSSA Rapport Mars 2009).

Dohnal et al. (2008) ont observé que les métabolites de dégradation *in vivo* à partir de la toxine T-2 sont HT-2, T-2 triol, T-2 tetraol, 3'-hydroxy-T-2, et 3'-hydroxy-HT-2. La toxine T-2 est considérée de 1,5 à 1,7 fois plus toxique que la HT-2, et la HT-2 est 4,8 fois plus toxique que la molécule T-2 tétraol.

Sudakin (2003) expose dans sa revue l'existence de bactéries et de champignons ayant la capacité de dégrader la toxine T-2 (Tableau 13). Il rapporte que la stabilité des toxines T-2 et HT-2, est affectée par l'interaction avec d'autres micro-organismes en populations mixtes et la structure chimique des toxines peut être changée. C'est-à-dire que ces micro-organismes développent des mécanismes pour transformer la structure chimique des toxines pour réduire leur toxicité et de cette manière être moins affectés pendant l'interaction. Par contre, dans ce

rapport, les mécanismes de transformation des toxines T-2 et HT-2 par ces micro-organismes ne sont pas détaillés.

Tableau 13. Moisissures et bactéries capables de transformer la toxine T-2 dans l'environnement (Sudakin, 2003).

Moisissures	Bactéries
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Arthrobacter</i> sp.
<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Blastobacter natatorius</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Agrobacterium</i> sp.
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	
<i>Rhodotorula</i> sp.	
<i>Ulocladium</i> sp.	

1.2.4.2 Effets biochimiques causés par la toxine T-2.

Effets sur la synthèse d'ADN et ARN

La toxine T-2 inhibe la synthèse d'ADN et d'ARN *in vivo* à une concentration de 0,75 mg/kg poids corporel (une ou multiple doses) et *in vitro* à une concentration entre 0,1 et 1 ng/mL (European-Commission, 2001). Elle inhibe fortement l'incorporation de [³H]thymidine dans des lignées cellulaires de thymus à une concentration de 10 ng/mL dans le milieu de culture (EFSSA, rapport Mars 2009).

Effets sur la synthèse de protéines

La toxine T-2 a une forte affinité pour la sous-unité ribosomale 60S, et inhibe l'activité de la peptidyl transférase et par conséquent la synthèse des protéines est inhibée dans la phase d'initiation. Elle peut inhiber la synthèse des protéines *in vitro* et *in vitro* à une concentration de 0,01 ng/mL (European-Commission, 2001).

Effets sur les membranes et peroxydation de lipides

La toxine T-2 affecte la perméabilité de la membrane cellulaire *in vitro* à une concentration de 0,4 pg/mL. Une dose unique de 3,6 mg/kg de poids corporel augmente les peroxydes lipidiques dans le foie de rats (European-Commission, 2001).

Apoptose

La toxine T-2 cause l'apoptose *in vitro* des cellules HL-60 et RAW 264.7 à une concentration de 10 ng/mL et de 10 μ M dans les cellules Jurkat (avec les toxines HT-2, T-2 triol et T-2 tetraol) ; et *in vivo* à 10 mg/kg poids corporel dans les lymphocytes et d'autres tissus. Le mécanisme d'induction de l'apoptose n'est pas élucidé. Par contre, la toxine T-2 et ses métabolites T-2 triol et T-2 tetraol peuvent activer les kinases c-Jun N-terminal et/ou p38MAPK (European-Commission, 2001).

Autres effets

La toxine T-2 inhibe aussi le système de transport d'électrons mitochondrial dans les levures à cause de l'inhibition de l'enzyme succinique déshydrogénase (European-Commission, 2001).

1.2.4.3 Toxicité.

Des effets de toxicité aiguë sont observés lors de la consommation de la toxine T-2 entre 0,06 et 10 mg/kg de poids corporel chez plusieurs espèces. Les principaux effets relevés dans les études expérimentales comportent des symptômes non-spécifiques comme la perte de poids, l'inappétence, des dermatites, des vomissements, des diarrhées, des hémorragies ainsi que des lésions nécrotiques des épithéliums stomacal et intestinal, de la moelle osseuse, de la rate, des testicules et des ovaires.

La toxine T-2 a une haute toxicité avec des valeurs de DL₅₀ pour les rongeurs entre 5 à 10 mg/kg de poids corporel et par contre, pour la toxine HT-2 il n'y a pas de valeurs de DL₅₀ (European-Commission, 2001).

1.2.4.4 Génotoxicité.

Les données des études de génotoxicité sur la toxine T-2 sont contradictoires et il est difficile de tirer une conclusion définitive. D'après des tests effectués chez des bactérie et levure (*Salmonella typhimurium* et *Saccharomyces cerevisiae*) la toxine T-2 n'induit pas de changement dans l'ADN, il n'y aurait pas de mutation génétique. De manière contraire, dans les cellules de hamsters chinois de type V79, des aberrations chromosomiques sur les cellules sont trouvées à une concentration de 0,1 µg/mL de T-2 et chez *Drosophila melanogaster*, les essais de mutations récessives liées au sexe sont l'un positif et l'autre négatif (European-Commission, 2001).

1.2.4.5 Cancérogénicité.

Les tests de cancérogénicité de la toxine T-2 chez l'homme ont été négatifs en tant qu'initiateur ou promoteur de l'induction de la tumeur de la peau. L'IARC (1993) a conclu qu'il n'y avait pas assez de données à propos de la cancérogénicité chez l'homme causée par des toxines produites par *F. sporotrichioides* et que l'évidence était limitée dans les tests faits sur des animaux. La conclusion de l'IARC est que les toxines produites par *F. sporotrichioides* ne sont pas classées comme cancérogènes pour l'homme (European-Commission, 2001).

1.2.4.6 Immunotoxicité.

Sur les modèles cellulaires humains, la toxine T-2 inhibe la production d'immunoglobulines IgA, IgG et IgM. Il n'y a pas de donnée concernant l'exposition de l'homme à la toxine T-2, par contre des effets sur des lymphocytes humains ont été enregistrés en Russie à cause de l'Aleucie Toxique Alimentaire « Alimentary Toxic Aleukia » (ATA) où la toxine T-2 est présumée être responsable (European-Commission, 2001).

1.2.4.7 Effets chez l'homme.

L'ATA déclarée en Russie dans les années 1941-1947 est associée à la présence des espèces de *Fusarium* dans les grains stockés en hiver. La présence de *F. poae* et *F. sporotrichioides*, producteurs de trichothécènes comme les toxines T-2 et HT-2 a été établie.

Des échantillons de grains contaminés ont été testés sur la peau des animaux et des effets toxiques ont été trouvés. L'épidémie la plus importante est reportée en 1944, mais des autres cas ont été rapportés en 1952, 1953 et 1955 surtout chez les gens qui consomment le blé stocké pendant l'hiver.

Les symptômes cliniques consistent en vomissements, douleurs abdominales et diarrhées suivis de l'apparition de leucopénie, d'hémorragies du nez et de la gorge, de réduction de la moelle osseuse et de fièvre. En considérant la sévérité des lésions nécrotiques dans la cavité orale, l'œsophage et l'estomac peuvent être affectés et la possibilité de mort est élevée. Dans une seconde étape de l'ATA les effets sont plus marqués en présence de leucopénie, aplasie de la moelle osseuse et infections. Lors de la troisième étape, l'atteinte du système hématopoïétique s'intensifie et le nombre de cellules circulantes diminue. Le nombre de thrombocytes tombe alors que le nombre de leucocytes chute et le nombre d'érythrocytes sont aussi réduits.

Lors d'une épidémie en Chine, chez 165 personnes qui avaient consommé du riz contaminé par *F. heterosporum* et *F. graminearum*, 50% des personnes ont présenté des symptômes comme des nausées, vertiges, vomissements, distension abdominale et douleur, frissons et diarrhées. Le riz a été évalué avec la méthode ELISA et des concentrations en toxine T-2 entre 180 et 420 µg/kg ont été détectées (European-Commission, 2001)

1.2.4.8 Valeurs toxicologiques de référence et réglementation.

L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (The European Food Safety Authority - EFSA) a établi que la détermination de la toxicité *in vivo* de la toxine T-2 doit inclure la toxine HT-2. Le comité a retenu l'étude réalisée par Rafai et al. (1995) chez le porc sur la T-2 comme étude pertinente. Les effets toxiques observés aux faibles doses dans cette étude sont des effets immunotoxiques et hématotoxiques. Comme il n'a pas été identifié de dose sans effet dans cette étude, c'est la plus petite dose avec effet (LOAEL) qui a été retenue, soit 0,029 mg/kg poids corporel/jour. Un facteur de sécurité de 500 (10x10x5) a été appliqué et la dose journalière tolérable provisoire des toxines T-2 et HT-2 est de 100 ng/kg p.c./jour.

La commission Européenne a établi avec les règlements N°. 856/2005 et N°. 1881/2006 les niveaux admissibles de certaines toxines de *Fusarium* dans les céréales et les produits à base de céréales qui sont entrés en vigueur le 1er juillet 2006. Les niveaux

admissibles pour la T-2 et la HT-2 dans les céréales non transformées et les produits à base de céréales sont encore en discussion. Le règlement N°. 105/2010 n'a pas encore fixé un niveau des mycotoxines T-2 et HT-2 dans la bière ou les aliments.

Les effets toxiques des mycotoxines sont connus à partir de modèles expérimentaux effectués sur animaux, mais l'extrapolation aux humains est difficile à faire. Ce problème est dû à l'absence d'information sur les problèmes de santé associés aux limites de consommation proposées et la possibilité d'une synergie avec d'autres mycotoxines. Les limites de consommation journalière sont établies à partir d'informations obtenues lors de tests sur animaux et elles peuvent être inexactes, parce qu'ils ne considèrent pas la différence de sensibilité entre les espèces d'animaux (Creppy, 2002).

1.2.5 Méthodes de détection des toxines T-2 et HT-2.

Le choix de la méthodologie pour la détection des trichothécènes est lié à la disponibilité des équipements, la limite de détection nécessaire, la composition du milieu, et les propriétés de la toxine à analyser (Krska et al., 2001).

Il y a plusieurs méthodes pour la détection des trichothécènes qui utilisent la chromatographie couche mince (Thin Layer Chromatography – TLC) décrite par « Association of Official Agricultural Chemists » (AOAC), mais les méthodes de chromatographie de gaz (GC) et la chromatographie à haute performance (HPLC) sont préférées grâce à leur sensibilité, sélectivité, précision, et exactitude. Les analyses par GC sont les méthodes les plus employées pour la détection des trichothécènes A. La détermination par HPLC avec détection UV n'est pas valable, surtout avec les trichothécènes A, à cause de l'absence de groupes ceto-conjugués en position C8. Par contre, des méthodes qui utilisent des dérivations post-colonnes peuvent être utilisées.

La plupart du temps, les trichothécènes comme les toxines T-2 et HT-2 sont extraites à partir de matrices solides (grains) en utilisant différents solvants organiques. Avant la détection par HPLC, une étape de nettoyage ou « Clean-Up » est nécessaire. L'extraction avec des solvants organiques est utilisée pour concentrer la toxine puisque parfois les concentrations sont très basses et cette étape améliore la précision. La sélection du solvant utilisé est guidée par les caractéristiques chimiques de la toxine à analyser. Après l'extraction, il faut considérer que les toxines ne seront pas complètement dans la phase liquide. Ainsi la

plupart du temps, le taux de récupération est inférieur à 100%. Il est possible que la récupération soit aussi supérieure à 100% à cause d'interférences dans les échantillons ou d'erreurs de détection. Les trichothécènes A sont moins polaires que le type B à cause de l'absence du groupe ceto dans la position C8 et du fait que les groupes hydroxylés sont moins fréquents. Pour la détection des toxines T-2 et HT-2 les extractions sont faites avec un mélange acétonitrile-H₂O (80/20, v/v) (Trebstein et al., 2009) ou méthanol-H₂O (80/20, v/v) (Pascale et al., 2003) ; ou méthanol-H₂O (90/10, v/v) (Lippolis et al., 2008; Trebstein et al., 2008; Visconti et al., 2005).

La purification (clean-up) des extraits est essentielle pour l'analyse des trichothécènes par chromatographie. Cette étape est très importante parce que les extraits sont contaminés par d'autres molécules, surtout si on souhaite détecter des niveaux bas de concentrations. Les procédés de « Clean-up » les plus communs sont l'extraction par phase solide (SPE) et les colonnes d'immuno affinité (IACs). Des colonnes pour les toxines T-2 et HT-2 comme l'IACs EASI EXTRACT de R-Biopharm (Trebstein et al., 2009) ou la Puri-Fast T-2/HT-2 IAC (www.libios.fr) sont disponibles. Les avantages des colonnes IACs sont que les extraits sont purifiés grâce à la spécificité des anticorps, ces colonnes sont pratiques pour des matrices complexes, sont précises, sensibles et rapides, et la quantité de solvants organiques utilisés est modérée. Par contre, leur inconvénient est la nécessité d'utiliser plusieurs étapes de nettoyage (Lattanzio et al., 2009).

Des tests de screening ou criblage sont utilisés pour le suivi des trichothécènes dans les aliments. La méthode ELISA à base d'anticorps est la plus courante. Par contre, des similitudes structurales entre les toxines et d'autres produits de la matrice peuvent modifier le signal et la méthode devient incertaine. Parfois, l'interaction entre la toxine et les anticorps doit atteindre un équilibre et cette étape peut durer jusqu'à 2 heures avant de faire la détection.

L'adaptation de la fluorescence aux méthodes de détection par HPLC a été récemment utilisée pour analyser les toxines T-2 et HT-2. Cela inclut l'utilisation de réactions de dérivation avec différents produits pour faciliter la détection des ces toxines comme le 1-anthroïlnitrile (Lippolis et al., 2008; Pascale et al., 2003; Trebstein et al., 2009; Trebstein et al., 2008; Visconti et al., 2005), le coumarin-3-carbonyl chloride (Dallasta et al., 2004; Jiménez et al., 2000), le 1-naphthoyl chloride, le 2-naphthroïlnitrile, le trifluoroaceticanhydride (Schollenberger et al., 2008) et le pyrene-1-carbonyl cyanide.

Le Tableau 14 présente plusieurs techniques de détection des toxines T-2 et HT à partir de matrices solides, les grains. Les méthodes de séparation comprennent la Chromatographie en Phase Gazeuse (GC), Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS), Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC), et les méthodes de détection sont la Capture d'Electrons (ECD), la Spectrométrie de Masse (MS) ou la mesure de la fluorescence (FLD). A partir de toute cette information, il est possible de comprendre la difficulté d'arriver à déterminer ces toxines de manière simple.

Tableau 14. Différentes techniques de détection des toxines T-2 et HT-2 (Krska et al., 2001).

Référence	Matrice	Extraction	Séparation/détection	Toxines testées
Luo et al. (1990)	Blé, Maïs	CH ₃ CN-H ₂ O	GC – ECD (TMS)	T-2/HT-2
Hietaniemi and Kumpulainen (1991)	Céréales et aliments	MeOH-H ₂ O	GC – MS (TMSI)	T-2/HT-2
Möller et al. (1992)	Céréales	CH ₃ CN-EtOAc-H ₂ O	GC – ECD (TRI-SIL-TBT)	T-2/HT-2
Croteau et al. (1994)	Maïs	CH ₃ CN-H ₂ O	GC – ECD (DMAP, HFBA)	T-2/HT-2
Scott and Trucksess (1997)	Blé, avoine	NA	GC – MS (TMS-HFB)	T-2/HT-2
Onji et al. (1998)	Céréales	CH ₃ CN-H ₂ O	GC – MS (dans la colonne)	T-2
Schollenberger et al. (1998)	Céréales et aliments	CH ₃ CN-H ₂ O	GC – MS (TFA)	T-2/HT-2
Scudamore et al. (1998)	Maïs	CH ₃ CN-4% KCl	GC – MS (TFAA)	T-2/HT-2
Groves et al. (1999)	Maïs	CH ₃ CN-H ₂ O	GC – MS (TMS)	T-2/HT-2
Langseth and Rundberget (1998)	Grains	CH ₃ CN-H ₂ O	GC – MS (PFPA)	T-2/HT-2
Josephs, 1999	Blé	CH ₃ CN-H ₂ O	GC – ECD (HFBI)	T-2/HT-2
Kotal et al. (1999)	Céréales	CH ₃ CN-H ₂ O CH ₃ CN-MeOH	GC – ECD (TFAA)	T-2/HT-2
Tanaka et al. (2000)	Blé, maïs	CH ₃ CN-H ₂ O	GC – MS (TMS)	T-2
Park et al. (1991)	Céréales	CH ₃ CN-H ₂ O	GM-MS (TMI-TMA-TMCS)	T-2
Rajakylä et al. (1987)	Blé	CH ₃ CN	HPLC – MS	T-2/HT-2
Berger et al. (1999)	Blé	CH ₃ CN-H ₂ O	HPLC – MS	T-2/HT-2
Mateo et al. (2002)	Maïs	CH ₃ CN-H ₂ O	HPLC – FLD	T-2/HT-2
Pascale et al. (2003)	Blé, maïs, orge, riz	MeOH-H ₂ O	HPLC – FLD	T-2
Visconti et al. (2005)	Blé, maïs, orge	MeOH-H ₂ O	HPLC – FLD	T-2/HT-2
Trebstein et al. (2009)	Avoine, aliment enfant, muesli	MeOH-H ₂ O	HPLC – FLD	T-2/HT-2

A ce jour, il n'y a pas beaucoup des méthodes officielles pour la détermination des trichothécènes. Le Comité Européen de Normalisation (CEN) a publié uniquement une méthode pour déterminer la toxine DON : « Determination of deoxynivalenol in animal feed – HPLC method with UV detection and immunoaffinity column clean-up (EN15791 : 2009) ». L'AOAC International a publié 2 méthodes officielles pour déterminer la DON à partir de grains de blé en utilisant la TLC ou la chromatographie en phase gazeuse. Par contre il n'y a pas de méthode pour la détection des toxines T-2 et HT-2.

Les méthodes de détection des trichothécènes se sont améliorées dans les années récentes. Plusieurs compagnies (Eurodiagnostica B. V., R-Biopharm AG, Romer Labs Diagnostica GmbH, Tecna S.r.l., et Neogen Corporation) ont développé des kits pour faciliter la détection de toxines T-2 et HT-2. De la même manière des recherches scientifiques ont contribué à la mise au point de méthodes mieux adaptées et rapides comme la dérivation avant la détection en HPLC suivie de la détection des toxines T-2 et HT-2 par fluorescence. Par contre, aucune des méthodes actuelles n'arrive à mesurer plusieurs et différentes toxines en même temps.

1.3 Contamination des céréales par *F. langsethiae* et la toxine T-2.

La présence de mycotoxines dans les céréales est un problème majeur mondial. En 2002, on a estimé que la production de blé et d'orge contaminés représente 2/3 de la production mondiale de céréales, et 80% de la production européenne. Les espèces mycologiques les plus fréquentes en Europe sont *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*. Le genre *Fusarium* est le principal pathogène des plantes agricoles qui se développe dans les régions à température modérée et qui occasionne la maladie des grains connue sous le nom de *Fusarium* Head Blight (FHB).

La contamination fongique peut commencer dans les champs ou avant le stockage si les conditions d'humidité et de température sont optimales. Elle est aussi possible pendant le stockage et les procédés de transformations des céréales en aliments. A partir d'une portion ou d'un grain complet contaminé, on peut isoler jusqu'à 9 espèces différentes de *Fusarium*. Le profil toxique des grains contaminés est déterminé non seulement par l'espèce pathogène prédominante mais aussi par la présence d'une espèce productrice de toxines (Logrieco et al., 2002).

Bottalico and Perrone (2002) ont fait une étude pour déterminer les espèces prédominantes en Europe qui contaminent le blé ayant développé la maladie FHB. Ces espèces sont listées par ordre de fréquence : *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. equiseti*, *F. tricinctum*, *F. cerealis*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum*, *F. subglutinans*, *F. solani* et *F. oxysporum*. Les espèces qui contaminent les grains FHB sont affectées par les conditions climatiques surtout la température et la présence de pluie au moment de l'étape de florescence, en plus des facteurs agronomiques comme la culture de sol, la fertilisation avec l'azote, l'utilisation de fongicides, la rotation des cultures, et le génotype de la plante hôte.

Torp and Nirenberg (2004) ont identifié *F. langsethiae* comme une nouvelle espèce de *Fusarium* en Finlande. Elle a été isolée à partir de blé, d'orge et d'avoine et on l'a trouvée dans plusieurs pays d'Europe. D'après ces résultats, *F. langsethiae* ressemble à *F. poae* sauf que sa croissance est moins rapide, elle a un développement différent au niveau du mycélium, et elle n'a pas d'odeur. Ils ont constaté que *F. langsethiae* produit plus de toxines T-2 et HT-2 que *F. poae*, mais comparable à ce que produit *F. sporotrichioides*. Les souches de cette espèce ont été isolées à partir de grains récoltés en Autriche, République Tchèque, Danemark, Angleterre, Norvège, Pays-Bas et Allemagne. D'après ces recherches, le premier rapport mentionnant une souche de *F. langsethiae* date de l'année 1990.

En 2009, des études réalisées sur l'occurrence des toxines de *Fusarium* dans les aliments dans l'Union Européenne, ont montré que 20% des échantillons sont contaminés par la toxine T-2 et 14% avec la toxine HT-2 (Lattanzio et al., 2009).

Dans la même année, pour aider à établir une réglementation, l'Institut Français des Boissons, de la Brasserie et de la Malterie (IFBM) a publié des études sur les toxines T-2 et HT-2 et sur les problèmes de contamination à cause de *Fusarium langsethiae* sur l'orge. Ils ont remarqué le déplacement d'autres espèces de *Fusarium* sp. au champ par *F. langsethiae* pendant les 5 dernières années. Ils ont évalué la présence de cette moisissure dans les orges commerciales destinées à la production de la bière et ils ont confirmé la menace de futures contaminations. Par conséquent, ils ont initié le projet ANR-BARSAFE pour comprendre et résoudre les problèmes causés par la récente apparition de cette moisissure dans l'orge de brasserie (Fournier, 2009; Toussaint et al., 2009).

Fournier and Boivin (2007) ont suivi les populations de *Fusarium* sur les orges de brasserie françaises sur la période de récolte 2003-2006. Ils ont trouvé que la présence des toxines T-2/HT-2 en 2003 était de 3% et que cette proportion a augmenté jusqu'à 16% en 2004 et à 50% en 2005, tandis que les souches productrices de trichothécènes B ont régressé pendant cette même période. Ils ont constaté une augmentation de la présence de *F. langsethiae* au cours des dernières années dans les échantillons d'orge de brasserie à la récolte. En 2006, 2 souches sur 5 isolées d'orge française appartenaient à la population *F. langsethiae*/*F. poae*. Ils ont trouvé que la contamination en trichothécènes A était principalement due à la présence de *F. langsethiae*. Plusieurs souches ont été isolées lors des récoltes 2005 et 2006 avec des capacités extrêmement élevées de production des toxines T-2 et HT-2.

La présence de *F. langsethiae* dans les céréales (orge, blé, maïs) en Europe a été aussi confirmée par d'autres auteurs (Lattanzio et al., 2009; Torp and Nirenberg, 2004). Et ils ont exprimé leur inquiétude sur la présence potentielle des ces toxines dans les aliments à base de céréales. En effet les méthodes de transformation des céréales en aliments ou boissons peuvent augmenter les niveaux des mycotoxines présentes. En plus l'élimination de ces toxines est compliquée parce que les trichothécènes sont des molécules très thermostables. De manière générale les procédés comme le fraisage, la cuisson au four et le brassage ne diminuent pas de manière significative (dans les cas observés) les concentrations en trichothécènes (Hazel and Patel, 2004).

Binder et al. (2007) ont analysé plusieurs aliments à base de céréales de différentes régions d'Europe destinés aux animaux et ils ont détecté la présence de mycotoxines (Tableau 15). Il est possible d'observer que dans le cas de la toxine T-2, les concentrations les plus élevées proviennent des échantillons du Nord de l'Europe, où les conditions climatiques sont plus favorables pour sa production.

Tableau 15. Concentrations en mycotoxines ($\mu\text{g}/\text{kg}$) détectées dans des échantillons d'aliments pour animaux à partir de différentes régions d'Europe (Binder et al., 2007).

Toxine	Nord d'Europe	Centre d'Europe
Deoxynivalenol	5510	8020
Toxine T-2	1776	829
Zéaralenone	970	1392
Fumonisines	630	580
Afatoxine B1	60	311
Ochratoxine A	10	530

1.4 Problèmes liés à la contamination fongique en brasserie.

L'orge est la céréale la plus utilisée pour la production de la bière. L'orge de brasserie doit donner un bon rendement d'extraction pour les moûts de brasserie, de grandes concentrations d'enzymes actives (α -amylase, β -amylase, protéases et β -glucanases), être libre de contaminations fongique et bactérienne et avoir un taux de germination supérieur à 95%. Un taux inférieur cause des problèmes pendant la production de la bière. La réduction du taux de germination peut être attribuée à l'invasion de mycélium dans le grain et/ou la présence de mycotoxines qui peut inhiber la germination.

L'orge peut être contaminée par des micro-organismes fongiques (*Fusarium*, *Aspergillus*, par exemple) pendant la croissance de la plante au champ, lors du transport ou du stockage. Par conséquent, la contamination fongique a pour conséquence la réduction du rendement, de la taille des grains et de la quantité de nutriments disponibles, ainsi qu'une perte de couleur et des changements dans l'odeur et le goût.

L'élaboration de la bière comprend plusieurs étapes, le maltage, le brassage, la fermentation et le conditionnement (Figure 13). Le maltage est l'étape critique où les problèmes de contamination et de production de toxines (T-2 et HT-2) à partir de *Fusarium* sont observés. Cette étape se déroule en trois étapes principales : le trempage, la germination et le touraillage.

- Lors du trempage, l'humidité de l'orge est augmentée jusqu'à 45% grâce aux immersions. Cette étape dure entre 36-52 heures à 15-20° C. Plusieurs étapes d'immersion dans de l'eau aérée sont suivies par des étapes de repos en présence d'air.
- La germination est la période où l'orge est transformée en malt, obtenu grâce à la régulation de la température et l'humidité. Le malt est la source des enzymes amylases qui dégradent l'amidon du grain. La germination des grains a lieu à 15-20° C pendant 6-8 jours.
- Après la germination, l'orge germée (ou malt vert) est ensuite séchée jusqu'à 4-5% pendant l'étape de touraillage. Les températures de touraillage et l'humidité sont contrôlées pour éviter l'inactivation des enzymes souhaitées. Les températures restent au dessous de 90° C. Durant cette étape, plusieurs réactions chimiques se développent dans l'orge qui affectent la qualité finale de la bière comme le goût, la couleur, l'odeur et la texture.

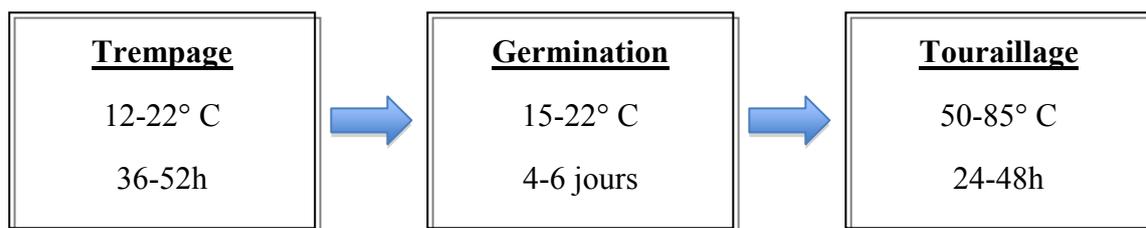


Figure 13. Etapes de maltage.

Dans le brassage, les grains sont broyés pour obtenir de la farine et une extraction avec de l'eau chaude est faite. Dans cette étape la température est augmentée jusqu'à 70° C, les enzymes protéolytiques de l'orge sont alors plus actives et rendent des bonnes concentrations d'acides aminés, peptides et protéines dans l'extrait de malt. Ces composants azotés solubles participent au métabolisme des levures pendant la fermentation, à la couleur et au goût de la bière. Après cette étape, la partie liquide (ou moût) est séparée des grains épuisés/utilisés. Le moût est cuit (64-72° C) pour éliminer les micro-organismes, après il est refroidi et aéré avant l'inoculation de la levure. Lors de cuisson, les micro-organismes fongiques contaminants sont éliminés mais les mycotoxines thermostables comme la T-2 et HT-2 résistent (Wolf-Hall, 2007).

La production des toxines commence après la croissance de *Fusarium* pendant le trempage et la germination où les conditions d'humidité et de température (15-20° C) sont optimales pour les moisissures, et potentiellement pendant le touraillage avec l'augmentation de la température.

Grâce au trempage, les concentrations des toxines solubles dans l'eau sont diminuées et restent dans les eaux de trempage. Par contre, lors de la germination la croissance de *Fusarium* et la production des toxines comme la T-2/HT-2 peut augmenter en comparaison aux concentrations initiales de l'orge infectée au début de la germination. De plus, l'augmentation de la température pendant les premières étapes du touraillage peut stimuler encore l'augmentation de la production des mycotoxines de certaines espèces de *Fusarium*.

Les conditions de maltage (humidité et température) peuvent activer les spores de champignons du type *Fusarium* qui sont présentes dans l'orge contaminée et favoriser la croissance fongique ainsi que la production des toxines. Les spores qui poussent avant ou après le maltage et qui arrivent à produire de mycotoxines peuvent provoquer :

- l'inhibition de la germination de grains d'orge
- l'augmentation de l'activité α -amylase
- l'hydrolyse des protéines d'orge
- le jaillissement ou gushing (sortie de mousse incontrôlée)
- le changement de couleur
- la présence de goûts désagréables dans la bière

Grâce à leur stabilité thermique, les trichothécènes peuvent rester pendant tout le procédé de maltage, jusqu'au produit fini, la bière. La croissance de moisissures du type *Fusarium* et la présence des toxines T-2/HT-2, pendant le maltage et les autres étapes sont affectées par plusieurs facteurs comme les caractéristiques des grains d'orge (humidité et disponibilité des nutriments), le type de souche présent dans l'orge, la viabilité du champignon (étape de latence, exponentielle, ou stationnaire), la concentration initiale de moisissure dans l'orge, la localisation du mycélium ou des spores dans ou sur le grain, l'effet d'interaction entre les espèces de la population microbienne, et les paramètres du procédé (la température, l'aération, l'addition des autres composants...).

Les changements de couleur peuvent être attribués à la production des pigments par les champignons ou l'augmentation de la concentration des composants solubles à base

d'azote dans le moût grâce à l'activité protéolytique des moisissures sur les protéines de l'orge.

Le jaillissement ou gushing est défini comme une sortie de mousse excessive de manière spontanée et non contrôlée au moment de l'ouverture d'une bouteille ou canette de bière (Amaha and Kitabatake, 1981). La formation et la stabilisation de grandes quantités de microbulles dans la bière sont attribuées à la croissance des moisissures dans le grain comme *Fusarium* et d'autres micro-organismes comme *Aspergillus* et *Penicillium* mais les espèces de *Fusarium* sont les plus problématiques. En effet, les moisissures excrètent des protéases qui peuvent extra-digérer les protéines dans le malt et le moût en affectant ainsi la texture et la mousse.

La fermentation par les levures peut aussi être affectée par la présence de métabolites fongiques. Le pH de la fermentation et de la bière sont augmentés à cause de la présence de molécules d'azote (Wolf-Hall, 2007). Lafont et al. (1981) ont trouvé que la fermentation par *S. cerevisiae* est réduite de 58 à 80% à cause de la présence de la toxine T-2 à une concentration de 10-50 µg/g. Koshinsky et al. (1992) ont suggéré que la toxine T-2 inhibe les fonctions mitochondriales, à cause de cette inhibition l'utilisation d'oxygène est réduite par les levures et la phase de latence est allongée.

1.5 Méthodes pour contrôler les contaminations fongiques et toxiques.

La manière la plus efficace de contrôler les problèmes liés à l'utilisation de grains avec FHB et la présence des toxines trichothécènes, est d'éviter le développement de moisissures et la production de toxines dans le champ et pendant le stockage (Desjardins et al., 1993). Wolf-Hall (2007) propose d'éviter l'utilisation des grains contaminés ; par contre, ce n'est pas complètement réalisable à cause des pertes économiques pour les producteurs. Les stratégies de prévention avant la contamination sont donc plus pertinentes que les traitements correctifs pour réduire les risques sur la santé humaine (Placinta et al., 1999).

Plusieurs stratégies de prévention et contrôle sont proposées par divers auteurs dans le but de diminuer les effets négatifs de la présence fongique et des mycotoxines associées.

Les méthodes qui utilisent des produits chimiques peuvent obtenir des résultats intéressants. Par contre des effets secondaires notables comme la présence de résidus non-

désirés ou des effets négatifs sur la qualité de grains limitent leur application. L'hypochlorite de sodium (Ramakrishna et al., 1991), le carbonate de sodium (1M en immersion pendant 30 min) (Trenholm et al., 1992), le bisulfite de sodium, le gaz chlorés et l'ammoniac (Young et al., 1986; Young et al., 1987) sont quelques produits testés ayant pour effet la réduction de la concentration de toxines et de moisissures présentes dans les céréales (orge ou blé) traitées.

L'utilisation de fongicides peut être efficace dans la prévention de l'infection au champ. Par contre, il faut les appliquer de manière régulière et leur usage fréquent peut devenir cher pour les producteurs (McMullen, 1997).

Des traitements physiques comme l'irradiation (Kottapalli and Wolf-Hall, 2008; Kottapalli et al., 2006), la pasteurisation (Berjak et al., 1992) et l'immersion dans de l'eau chaude 45-50°C (Kottapalli et al., 2003) arrivent aussi à réduire les infections fongiques des grains avant leur transformation. Par contre, le développement de moisissures est observé dans les étapes suivantes, par exemple dans la production de la bière après le maltage dans la fermentation.

De manière générale, les méthodes chimiques ne sont pas utilisées parce que leur application peut augmenter le prix final du produit et en plus, les risques liés à la santé humaine et animale à cause de la présence de résidus. Les méthodes physiques basiques (criblage et lavage) sont utilisées par exemple pour séparer les grains d'orge de petite taille affectés par la maladie FHB mais par contre, même si elles arrivent à diminuer la contamination fongique au début des premières étapes, les micro-organismes peuvent se développer et produire des mycotoxines une fois que les conditions sont favorables. D'autres méthodes ont montré des résultats : l'ozonation qui est encore une technologie ni pratique ni économique pour les petits producteurs.

L'option du contrôle biologique est une technique qui utilise des micro-organismes déjà présents dans les grains en profitant de leur différence de vitesse de croissance. Boivin and Malanda (1999) ont sélectionné une souche de *Geotrichum candidum* à partir d'orge et ils ont proposé son utilisation comme une méthode de contrôle contre *F. langsethiae*. Les grains d'orges inoculés avec *G. candidum* ont été maltés et la présence de cette levure a montré une amélioration dans la filtration et la qualité des effluents (diminution de la demande chimique d'oxygène COD) pendant la production de la bière.

Kocic-Tanackov et al. (2005) ont analysé les eaux de trempage et ont mis en évidence que la présence de *G. candidum* pendant 7 jours pendant les tests de micro-maltage, a inhibé la croissance des genres *Fusarium* avant touraillage.

1.6 *Geotrichum candidum* : option de bio-contrôle.

G. candidum est une levure qui est le sujet de plusieurs études biochimiques et physiologiques grâce à son importance biotechnologique et à sa présence dans divers environnements. C'est un des micro-organismes les plus importants dans l'industrie du fromage et du lait. Longtemps, le développement de cette levure a été indésirable parce qu'elle peut provoquer un défaut d'aspect de la croûte des fromages. Cependant, son rôle dans l'amélioration des qualités organoleptiques a été démontré plus tard : sa capacité à produire des méthyl cétones qui donnent des notes fruitées ou florales, la production d'esters avec une odeur de melon, et la production de molécules sulfurées sont des agents clés dans la production de fromage (Molimard and Spinnler, 1995).

1.6.1 Taxonomie, morphologie et diversité.

G. candidum a changé de classification de moisissure à levure et également de nom dans le passé. Il a été isolé à partir du lait en 1850 et classé comme *Oidium lactis*. En 1880, une nouvelle reclassification lui a donné le nom d'*Oospora lactis* et l'a placé dans le genre *Geotrichum*. Sa dernière classification est montrée dans le Tableau 16.

Tableau 16. Classification scientifique de *Geotrichum candidum* (<http://www.mycobank.org/>).

Royaume	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Saccharomycetes
Sub-classe	Saccharomycetidae
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Endomycetaceae
Genre	<i>Geotrichum</i>
Espèce	<i>G. candidum</i>

Il s'agit d'une levure filamenteuse très répandue, et qu'il est possible de trouver dans plusieurs environnements comme la terre, l'herbe, les plantes, les fruits, les produits alimentaires, les insectes, l'homme et d'autres mammifères. *G. candidum* est présent naturellement dans la microflore du lait cru et par conséquent dans les fromages élaborés à partir du lait cru.

G. candidum a une morphologie à la frontière entre levures typiques et moisissures. Il peut se développer à des températures minimales d'environ 4° C (0-12°C) et maximales de 35-37°C. D'un côté, il est possible de trouver des espèces qui poussent en colonies de levure typiques avec une haute production d'arthrospores et une coloration crème. Ces espèces ont une activité protéolytique réduite et une faible croissance. Leur température optimale de croissance est entre 22 et 25° C et elles acidifient le milieu. L'autre type pousse en colonies blanches qui recouvrent les surfaces en faisant des hyphes végétatifs et peu d'arthrospores. A la différence des premières, ces espèces ont une grande activité protéolytique et une vitesse de croissance supérieure. Leur température optimale de croissance est entre 25-30° C et elles tendent à alcaliniser le pH. Très sensibles au sel, leur croissance est inhibée complètement par une concentration de 5 à 6%, mais certaines souches peuvent être affectées par des concentrations en sel de 1 à 2%.

1.6.2 Sources de carbone et d'azote.

G. candidum peut utiliser une grande variété de sources de carbone. Certaines espèces arrivent à utiliser les substances présentes dans l'environnement laitier comme le D-galactose, le D-glucose, le L-sorbose, le D-xylose, le fructose, le mannose et l'acétate. Quelques autres peuvent consommer uniquement le lactate, le saccharose, le L-fucose, le D-arabitol, la D-ribose, le ribitol, le D-mannitol, le D-arabitol, le D-gluconate, le succinate, le citrate et le 2- et 5-ketogluconate. Cette levure utilise aussi les sources d'azote, ou les sources complexes comme l'extrait de levure. Plihon et al. (1998) ont trouvé que *G. candidum* en culture liquide utilise quelques acides aminés comme source d'azote uniquement (acide glutamique, acide aspartique, valine, leucine, proline, arginine, alanine, lysine, serine et glycine) et certains comme source de carbone et d'énergie (acide glutamique, acide aspartique, proline, arginine, alanine et serine). Dans la production de fromage, *G. candidum* dégrade le lactose en galactose et glucose, et après consomme le lactate ; par conséquent le pH du fromage est basifié et le développement des autres champignons comme *P. camemberti* est facilité.

Adour et al. (2002) ont étudié l'utilisation des sources de carbone et d'azote par *G. candidum* en milieu liquide en utilisant les peptones comme unique source de carbone et d'azote. Ils ont trouvé que la phase de latence est plus courte pour *G. candidum* que pour *P. camembertii* et que la consommation de peptones commence toujours en même temps que la croissance. Une alcalinisation du milieu de culture a été observée comme conséquence du métabolisme des sources de carbone. L'augmentation de pH est observée en même temps que le développement des micro-organismes. Si de l'acide lactique est ajouté, *G. candidum* préfère encore les peptones comme source de carbone. Quand les peptones sont l'unique source d'azote, la production d'ammonium commence en même temps que la croissance et la consommation des peptones, grâce à la désamination des acides aminés. En général, *G. candidum* métabolise plus d'acides aminés que *P. camembertii*.

1.6.3 Activité enzymatique.

G. candidum est capable de produire différentes enzymes responsables de la dégradation des protéines et lipides, cette dernière activité étant responsable de la formation de composés aromatiques. Il peut produire deux types de lipases dont une hydrolyse les esters des acides gras non saturés. Les produits d'hydrolyse de cette lipase sont les précurseurs d'une grande variété des produits volatils comme les alcools, les acides gras, les méthylcétones et les esters. Plusieurs espèces de *G. candidum* peuvent être différenciées par leur capacité de production de ces composés volatils.

G. candidum a la capacité de transformer des acides aminés soufrés en des composés soufrés comme le methanethiol qui donnant des arômes et goûts typiques de certains produits laitiers. Le précurseur le plus important est la méthionine et *G. candidum* peut la transformer en methanethiol et diméthyle sulphide, et en moindre quantité en diméthyle disulphide, diméthyle trisulphide, et S-méthyl thioesters.

G. candidum présente une activité protéinase qui est associée à la croissance. Cette activité est plus marquée vers la fin de la phase de croissance et est plus active pendant la phase stationnaire. Il est possible d'estimer que l'activité protéinase joue un rôle important pendant la transition métabolique et morphologique entre le développement de mycélium dans la phase exponentielle et la formation d'arthrospores dans la phase stationnaire (Boutrou and Gueguen, 2005).

1.6.4 Quelques applications de *G. candidum* et de ses enzymes.

La peroxydase Dec1 produite par *G. candidum* a une action de décoloration sur plus de 21 teintures synthétiques. Plusieurs tests pour optimiser cette activité en utilisant des mélasses ont été faits (Kim and Shoda, 1999; Lee et al., 2000).

L'utilisation de *G. candidum* est testée pour décolorer et réduire la concentration des composants organiques dans les eaux résiduelles d'usine d'olives (Assas et al., 2000). Dans le même contexte, Assas et al. (2002) ont trouvé que *G. candidum* est capable de décolorer dans un procédé continu à peu près toute la couleur des eaux résiduelles d'usine d'olive fraîche (OMW : olive mill wastewaters) grâce à la production de sa peroxydase. Le développement et l'extension du mycélium pendant 3 jours améliorent la décoloration. Pour cela, *G. candidum* a besoin de sucres dans les effluents. Si ces effluents sont stockés préalablement au traitement, la teneur en sucre diminue. La consommation des acides organiques par *G. candidum* qui a alors lieu, provoque l'augmentation de pH qui devient défavorable pour l'activité des enzymes décolorantes. *G. candidum* est moins sensible au stress par cisaillement et oxygène en culture continue et a la capacité de production d'arthroconidia en même temps que le mycélium.

Une application en biocatalyse a été évaluée par Nakamura et al. (1999) en immobilisant *G. candidum* pour réaliser des réactions d'oxydation/réduction stéréo sélectives. La levure a réussi à catalyser la réduction de cétones ainsi que l'oxydation d'alcools. Cette application est très importante parce que l'utilisation des coenzymes est alors réduite. La biocatalyse pour la synthèse d'alcools chiraux a été aussi testée par Bhattacharyya et al. (2008). Ils ont évalué la production de l'enzyme carbonyle réductase par *G. candidum* en bioréacteur. Cette enzyme est utilisée pour la réduction d'un intermédiaire de la synthèse des statines qui sont utilisés dans le traitement d'hyperlipidémie.

Fredenhagen et al. (2006) ont déterminé la structure de 13 neofrapeptines produites par *G. candidum* avec une activité insecticide. Les efrageptines ont une forte activité insecticide contre les insectes comme les mites car ils inhibent l'ATPase mitochondriale.

1.6.5 Interaction de *G. candidum* avec d'autres micro-organismes.

1.6.5.1 Interaction de *G. candidum* avec les micro-organismes d'environnement laitier.

La relation entre *G. candidum* et *P. camembertii* dans la maturation de fromage est controversée. Molimard and Spinnler (1995) rapportent que *P. camembertii* est faiblement inhibé par la présence de *G. candidum*. Au contraire, Guéguen (1984) a trouvé que le développement de *G. candidum* est aussi inhibé faiblement.

La présence de *G. candidum* dans le fromage affecte la croissance et la sporulation de *P. roquefortii*, *P. caseifulvum* et *P. commune* (van den Tempel and Nielsen, 2000). Nielsen et al. (1998) ont trouvé que la croissance de *G. candidum* dans le fromage ou le lait est rapide avec une germination précoce des conidies qui peut être interprétée comme une compétition vis à vis des nutriments et de l'espace et qui lui permet d'exclure d'autres moisissures.

1.6.5.2 Effet des métabolites de *G. candidum* contre d'autres micro-organismes.

Des données sur des métabolites non protéiques de poids moléculaire bas produits par *G. candidum* ayant une activité inhibitrice sur la germination des spores fongiques ont été publiées par Robinson et al. (1989). Ils ont trouvé que si une suspension d'arthrospores de *G. candidum* très concentrée ne germe pas, c'est à cause de la présence de triméthylamine. Tariq and Campbell (1991) ont testé l'influence de métabolites volatils produits par *G. candidum* contre des moisissures. Ils ont trouvé que ces métabolites inhibent la germination de *Botrytis allii*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium italicum*, *Microsporium canis*, et *Fusarium oxysporum*. Un ou plusieurs métabolites volatils de *G. candidum* sont capables d'inhiber la germination et l'extension des hyphes. Le degré d'inhibition dépend des espèces. L'analyse d'air dans l'environnement autour de *G. candidum* et des autres micro-organismes a montré la présence d'oxygène, de dioxyde de carbone, d'éthanol, d'acétaldéhyde et de triméthylamine.

D'après Guéguen et al. (1974), *G. candidum* a la capacité d'inhiber la croissance de bactéries Gram(-), Gram(+) et de quelques levures (*D. hansenii*, *Y. lipolytica* et *Pichia jadinii*). Cette activité inhibitrice a été confirmée après par Dieuleveux et al. (1998a). Ils ont trouvé que *G. candidum* produit et excrète l'acide D-3-phenyllactic et l'acide D-3-indollactic qui inhibent la croissance de *Listeria monocytogenes*. Ils ont purifié ces produits inhibiteurs qui sont stables dans une large gamme de pH et à 120°C pendant 20 minutes. Ils ont évalué le mode d'action de l'acide D-3-phenyllactic et ils ont trouvé que les cellules de *L.*

monocytogenes qui ont poussé dans un milieu avec une concentration de 1 mg/mL, ont une taille plus grande que les témoins avec une paroi cellulaire modifiée. A une concentration de 7 mg/mL le développement était plus filamenteux avec des parois altérées qui permettent la libération du contenu cellulaire. L'action inhibitrice de l'acide D-3-phenylactic est montrée dans la bibliographie contre plusieurs espèces des champignons comme *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* et *Penicillium citrinum* (Lavermicocca et al., 2003; Valerio et al., 2004).

Boivin and Malanda (1999) ont sélectionné une souche de cette espèce pour inhiber la croissance de champignons indésirables et producteurs de mycotoxines pendant les procédés de production de bière. *G. candidum* est ajouté (10^7 - 10^8 UFC cellules lyophilisées/kg d'orge) aux eaux de trempage et la croissance de *F. langsethiae* est inhibée en même temps que la qualité organoleptique du malt est améliorée.

1.6.6 *Geotrichum candidum* – IFBM levure de malterie REF : X16010211.

G. candidum X16010211 est une levure de malterie lyophilisée destinée au traitement de l'orge lors du maltage pour prévenir la production de mycotoxines par des moisissures toxigènes du genre *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc. Cette levure a l'avantage d'améliorer la qualité du malt, qui a un effet positif sur le contrôle du procédé de maltage.

Boivin and Malanda (1999) dans le brevet US-005955070A ont décrit le processus de sélection de *G. candidum*. Ils ont isolé et sélectionné des souches naturelles prélevées sur le malt selon les critères suivants :

- une activité lipasique inférieure à 2.5×10^{-7} nKat/cellules car cette enzyme peut conduire à des problèmes de goûts d'oxydé dans la bière
- une action d'inhibition de la flore indésirable qui se développe pendant le maltage
- pas d'activité mutagène ni toxigène
- une stabilité de la solution de spores supérieure à 6 mois
- une production abondante de spores de 10^7 à 10^8 /mL
- une amélioration de la vitesse de filtration

Des souches obtenues par ce procédé ont été déposées en 1994 à la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes auprès de L'Institut Pasteur et ont été enregistrées sous le No. I-1475 et le No. I-1474.

1.7 Etudes des interactions entre micro-organismes.

Dans la plupart des systèmes naturels, les micro-organismes partagent le même environnement. Les bioprocédés qui utilisent des matières brutes (non stériles) comme les grains d'orge pour l'élaboration de la bière sont affectés par ces interactions. Les interactions entre micro-organismes peuvent s'établir entre des populations différentes ou entre souches d'une même espèce. Les interactions entre deux micro-organismes sont classées par rapport à la présence ou l'absence de contact physique entre eux. L'interaction directe engage un contact physique entre les deux micro-organismes et comprend le neutralisme, l'inhibition, la prédation, le parasitisme et la symbiose. Les interactions indirectes nécessitent la présence d'un ou plusieurs métabolites extracellulaires qui affectent soit les deux micro-organismes : le mutualisme et la compétition ; soit un seul micro-organisme : le commensalisme, et l'amensalisme (Prescott et al., 2002; Renouf, 2006).

1.7.1 Interactions directes.

Le Neutralisme

Dans ce type de relation les deux micro-organismes sont en contact mais aucun changement n'a lieu. Le neutralisme est uniquement possible si les espèces ont des besoins nutritionnels complètement différents ou si les substrats ne sont jamais limités. Cette interaction est très rare. Il est difficile de prouver qu'il n'y a pas de compétition entre les deux micro-organismes ou qu'un des deux ne tire un bénéfice.

L'inhibition

Dans ce cas une population de micro-organismes est inhibée par une autre à cause du contact direct entre les cellules des deux populations lors de leur culture mixte. Cette inhibition ne résulte ni d'une limitation en nutriments ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs mais plutôt d'un contact direct entre les cellules de la population inhibitrice qui doit présenter une concentration élevée de cellules viables.

La prédation

Dans la prédation une des espèces vit totalement aux dépens de l'autre. La victime a sur elle ou devient le substrat utilisé comme aliment de l'autre et, par conséquent la victime meurt.

Le parasitisme

Cette relation est similaire à la prédation mais par contre la victime ne meurt pas nécessairement. Un microorganisme possède une partie de ses tissus qui est consommée par l'autre espèce pour son développement.

La symbiose

Dans cette interaction physique les populations obtiennent un bénéfice réciproque. Cette interaction est la plus connue dans l'environnement comme les relations où un microorganisme habite dans un autre.

1.7.2 Interactions indirectes.

Le mutualisme

Dans cette interaction indirecte, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre. Les micro-organismes ont besoin d'un produit excrété par l'autre pour leur développement.

La compétition

Dans la compétition, les deux populations ont besoin du même substrat et consomment toutes les deux un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance, ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance et celle dont la vitesse de croissance est la plus affectée sera la plus désavantagée. Dans quelque cas, l'arrêt de croissance peut être un avantage lorsque l'espèce concernée reste viable dans l'attente de nouvelles conditions favorables après la mort de son compétiteur. La compétition entre membre de la même espèce est connue comme compétition intra-spécifique et entre différentes espèces comme compétition interspécifique.

Le commensalisme

Un micro-organisme produit un composé qui a un effet positif sur la croissance de l'autre ou si il consomme une substance inhibitrice de la croissance de l'autre.

L'amensalisme

Ce type de relation implique que l'un des micro-organismes produit une substance qui a un effet négatif sur la croissance de l'autre. Le cas typique d'amensalisme c'est chez les levures avec la toxine « killer » produite par certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* et qui entraîne la mort des souches sensibles.

1.7.3 Stratégies expérimentales pour évaluer les interactions.

Les méthodes d'analyses des interactions limitent leur compréhension. Le problème principal c'est la difficulté de reproduire au laboratoire les conditions environnementales d'interaction le plus fidèlement possible à la réalité. Les interactions étudiées au laboratoire sont dépendantes des types des souches, de la composition des milieux de culture, des conditions de culture (milieu liquide ou gélosé, température, pH, agitation, aération, etc.) et des procédés de culture (cultures séquentielles, co-culture, etc.).

1.7.3.1 En milieu solide.

Dans l'étude des interactions des micro-organismes, l'utilisation des milieux gélosés est une des méthodes les plus connues et les plus anciennes. Différentes adaptations inspirées de la technique des antibiogrammes de Lemaesquier (1987) permettent de mettre en évidence certains phénomènes. L'application d'un micro-organisme en tapis sur la surface ou dans la gélose puis l'inoculation de l'autre souche, ou même la technique de disques de diffusion permettent d'estimer les interactions par l'observation de la zone de contact (présence ou non d'un halo) entre les souches. Si la zone de contact est plus transparente que le fond, il s'agit d'une inhibition. Par contre si cette zone est plus trouble, c'est une stimulation et s'il n'y a pas de différence avec le reste de la boîte il n'y a pas d'interaction.

Ces analyses ne peuvent être envisagées que pour une description du phénomène et la détermination exacte de la nature de l'interaction est pratiquement impossible. De plus, la quantité des paramètres opératoires, la restriction de diffusion à cause de la gélose, et la

méthodologie de quantification de l'interaction rendent la méthode difficile à standardiser. Une alternative est l'utilisation des milieux liquides avec une composition chimique contrôlée simulant les conditions naturelles et qui en plus permet d'étudier les critères cinétiques.

1.7.3.2 En milieu liquide.

Les interactions en milieu liquide sont le plus proches de la réalité, cependant la limitation peut être la capacité à différencier les micro-organismes pour les analyser. Pour résoudre cette problématique il est possible de séparer temporellement ou physiquement les micro-organismes en question. Une des méthodes pour étudier les interactions indirectes est la réalisation de cultures séquentielles. Elles ont pour but de ne faire intervenir qu'un micro-organisme en même temps. Il s'agit d'évaluer l'impact sur le développement cinétique (croissance, consommation, production) d'un micro-organisme inoculé dans un milieu pré-fermenté par un autre.

Pour étudier les interactions directes, les cultures mixtes ou co-cultures sont aussi utilisées. L'idéal est de mettre simultanément les différents micro-organismes en culture dans un milieu liquide correspondant à l'environnement naturel de l'interaction étudiée pour identifier et caractériser leur comportement. La co-culture peut arriver à avoir des conditions proches de la réalité, mais les méthodes d'identification et de quantification des espèces sont compliquées ou lourdes et font appel aux outils de la biologie moléculaire comme la PCR ou l'hybridation *in situ*.

L'utilisation d'un bioréacteur à membranes (BRM) est une alternative pour évaluer les interactions entre micro-organismes en co-culture liquide avec la possibilité que ces micro-organismes restent séparés l'un de l'autre. Cet outil fonctionne sur le principe suivant : deux micro-organismes différents sont confinés dans deux compartiments séparés par une membrane à fibres creuses mais évoluent dans le même milieu de culture grâce à une circulation alternative de ce milieu d'un compartiment à l'autre qui l'homogénéise. De cette manière, les micro-organismes restent isolés l'un de l'autre pour se développer, mais les interactions indirectes dues aux métabolites extracellulaires ont lieu comme si les souches étaient dans le même réservoir. Par conséquent les prélèvements des souches sont possibles de façon individuelle et ils peuvent être analysés de manière simple comme en culture pure.

1.8 Description du problème.

L'identification et l'établissement de la nouvelle espèce mycotoxinogène *F. langsethiae* dans les céréales européennes et surtout dans l'orge destinée à la malterie, est un problème qui concerne les secteurs scientifiques et industriels. *F. langsethiae* est considérée comme un des micro-organismes hautement producteurs de trichothécènes : la T-2 et HT-2. La toxine T-2 est considérée la plus toxique des trichothécènes et est responsable de toxicoses chez les animaux. La toxine T-2 possède une haute résistance thermique que lui donne la possibilité d'être retrouvée dans les produits à base de céréales si celles-ci sont contaminées. La législation Européenne n'a pas encore établi une limite sur les concentrations maximales acceptables de cette toxine dans les aliments. Grâce à la détection de plus en plus fréquente de *F. langsethiae* et des ses toxines dans l'orge de malterie et le souci de réduire de possibles futurs problèmes de la santé, l'Agence National de la Recherche à soutenu le projet BARSAFE. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes d'infection de *F. langsethiae*, les conditions climatiques qui facilitent leur développement et surtout trouver une méthode pour contrôler la production des toxines T-2 et HT-2 lors du maltage. La levure filamenteuse *G. candidum* a été sélectionnée à partir de grains d'orge pour son activité antagoniste contre *F. langsethiae*. Son application dans l'orge avant le trempage peut diminuer le développement de *F. langsethiae* ainsi qu'améliorer les qualités organoleptiques du malt. Par contre, le mode d'action de *G. candidum* sur *F. langsethiae* n'est pas encore élucidé. Pour cette raison, le but de cette thèse est de comprendre comment la présence de *G. candidum* contrôle le développement de *F. langsethiae* et la présence de mycotoxines.

1.9 Objectif.

L'objectif de cette étude scientifique est de mieux comprendre l'interaction entre *F. langsethiae* et *G. candidum* pour déterminer la présence d'une activité de contrôle de la production de la toxine T-2 : adsorption, dégradation ou inhibition de la production

Démarche mise en oeuvre :

- Développer un milieu de culture d'étude compatible pour les deux micro-organismes. Dans ce milieu les deux micro-organismes doivent se développer de manière similaire. *F. langsethiae* doit être capable de produire la toxine T-2.

- Sélectionner et mettre en place une méthodologie de détection/quantification de la toxine T-2 en HPLC, et si possible avec détection par fluorescence.
- Evaluer les effets des interactions indirectes entre *G. candidum* et *F. langsethiae* : 1) déterminer la croissance de *F. langsethiae* et la production de la toxine T-2 dans le milieu pré-fermenté par *G. candidum* ; 2) déterminer la croissance de *G. candidum* et la possible dégradation ou inhibition de la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* dans un milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* ; 3) étudier l'interaction entre les milieux pré-fermentés par *F. langsethiae* et par *G. candidum* pour évaluer l'effet sur la concentration de la toxine T-2.
- Evaluer les effets d'interaction directe entre *G. candidum* et *F. langsethiae* : effet sur la croissance de *F. langsethiae* et sa production de la toxine T-2, en utilisant le bioréacteur à membrane ou une culture mixte (co-culture).
- Mise en oeuvre d'une méthodologie pour faciliter la différenciation de *F. langsethiae* et *G. candidum* en co-culture : fluorescent hybridation *in situ* et/ou ADN quantification.
- Caractériser partiellement l'agent actif présent dans le milieu pré-fermenté par *G. candidum* : tests thermiques et enzymatiques.

2. Matériels et Méthodes

2.1 Les micro-organismes.

Dans ce travail, nous avons utilisé deux souches :

- *Geotrichum candidum* REF X16010211 (Figure 14a et b), levure filamenteuse de malterie, lyophilisée, produite par Cargill France SAS sous licence de l'Institut Français des Boissons de la Brasserie et de la Malterie (I. F. B. M. – Nancy, France).
- 2 souches de *Fusarium langsethiae* 033 et 035 (Figure 15), champignon producteur de trichothécènes qui a été isolé à partir de la campagne de récolte de l'orge 2008 par l'IFBM.

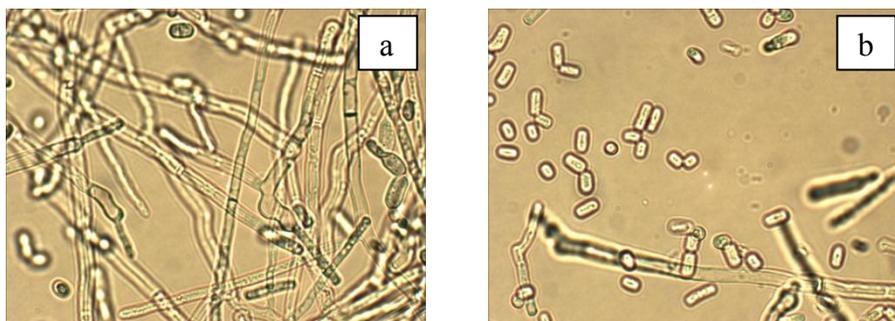


Figure 14. *Geotrichum candidum* (a) forme filamenteuse (b) cellules libres.



Figure 15. *Fusarium langsethiae* 035.

2.2 Les milieux de culture.

Différents milieux de culture liquides ont été testés de façon à obtenir une production de biomasse similaire entre *F. langsethiae* et *G. candidum*, ainsi qu'une importante concentration des toxines T-2/HT-2 par *F. langsethiae* 035. Les milieux testés sont de 2 types : à partir d'orge et semi-synthétique. Le schéma général de la fabrication des milieux à base d'orge est montré dans la Figure 16. Les milieux semi-synthétiques (compositions et concentrations) sont décrits dans le Tableau 17. L'extrait de levure et l'extrait de malt sont fournis par FISHER Scientific Bioblock REF : 1801N et 2801Y respectivement, l'alpha-D(+)-glucose 99+% anhydre est fourni par ACROS Organics Code : 170080025, la Bacto™ Tryptone (pancreatic digest of casein) est fournie par BECTON, DICKINSON and COMPANY REF : 211705. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120° C pendant 15 minutes.

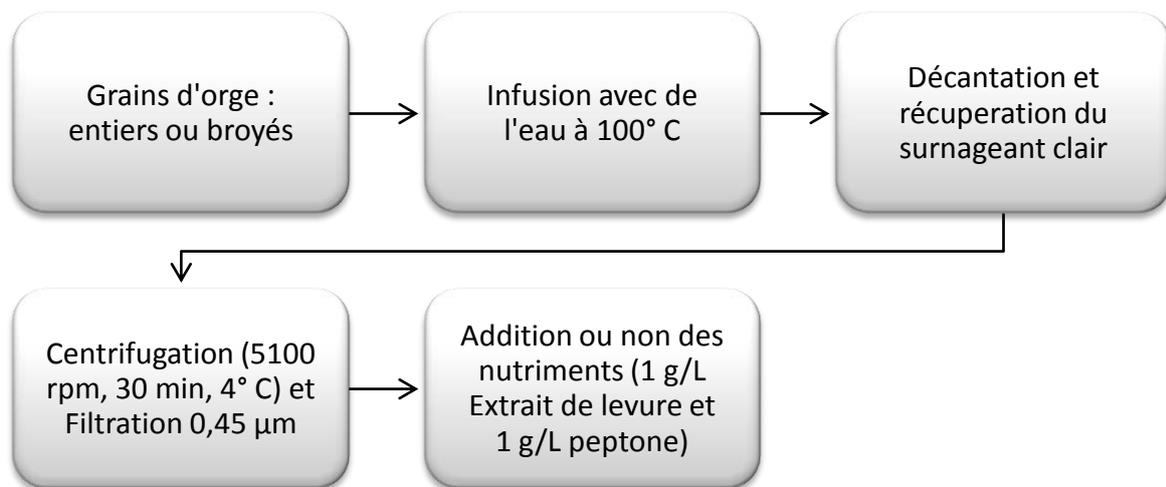


Figure 16. Schéma général de la préparation des milieux à base d'orge.

Tableau 17. Composition et concentration des milieux semi-synthétiques testés.

<i>Milieu</i>	<i>Concentrations</i>
YEPD	10g/L glucose, 10g/L peptone, 5g/L extrait de levure
Extrait de malt (MEM)	5, 10, 15, 20 et 50g/L extrait de malt
MEM + Extrait de levure : MEMx	50g/L extrait de malt + 1g/L extrait de levure
MEMx + Peptone : MEMxp	50g/L extrait de malt + 1g/L extrait de levure + 1g/L peptone
Ym	5g/L glucose, 1,5g/L extrait de levure, 1,5g/L extrait de malt et 2,5g/L peptone

2.2.1 Milieu de conservation.

Les souches *F. langsethiae* 033 et 35 (Annexe 1) et *G. candidum* (Annexe 2) sont conservées à 4° C sur boîtes de Pétri sur un milieu gélosé Potato Dextrose Agar (PDA, Fluka, 39 g/L). Les souches sont repiquées tous les 3 mois pour *Fusarium langsethiae* 035 et tous les 1-2 mois pour *G. candidum*.

2.2.2 Milieux de fermentation.

Le milieu Ym est le milieu dans lequel les fermentations ont été faites. Le pH est ajusté à 7,0 avant et après inoculation de chaque souche à l'aide de solutions NaOH 5M ou HCl 1N stériles.

2.2.3 Milieux pré-fermentés.

Les milieux pré-fermentés sont obtenus à partir des cultures soit de *F. langsethiae* soit de *G. candidum* après 3 jours de culture à 22° C et 200 rpm. Ensuite, les cellules sont éliminées par filtration sous vide en utilisant une membrane Sartorius 0,45µm à base de nitrate de cellulose. Avant leur utilisation, le milieu pré-fermenté par *Geotrichum* (MFG) et le milieu pré-fermenté par *Fusarium* (MFF) sont complétés avec les nutriments en poudre du milieu Ym avant d'être re-filtré sur une membrane stérile 0,2µm Sartorius à base de Polyvinylidene Fluoride (PVDF) sous la hotte (Figure 17).

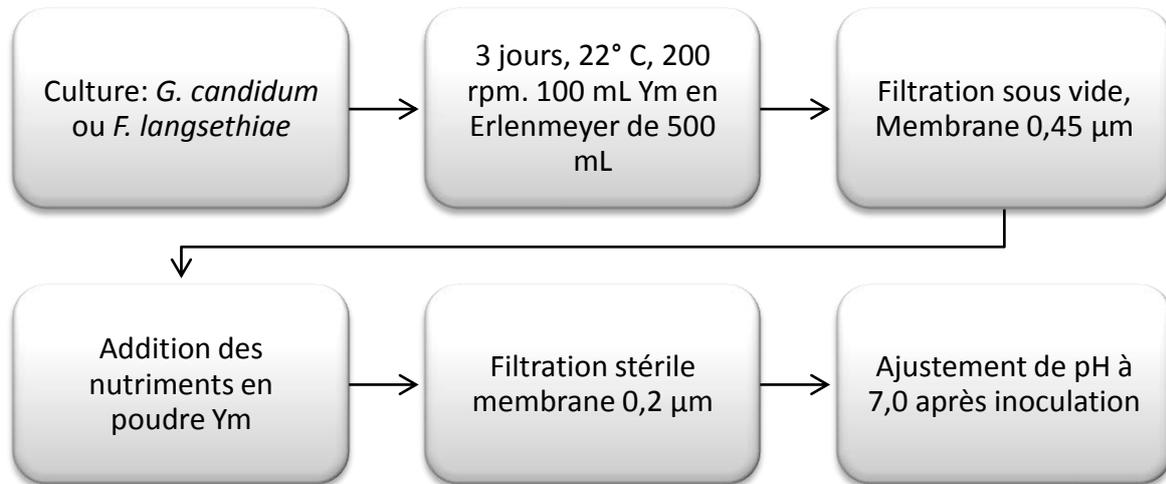


Figure 17. Schéma général de la préparation des milieux pré-fermentés.

2.3 Les cultures.

2.3.1 Pré-cultures.

Avant chaque expérience il est nécessaire de faire une pré-culture pour activer le métabolisme des souches et réduire la phase de latence. Les conditions de pré-culture sont les mêmes pour les deux souches : fioles d'Erlenmeyer de 500 mL avec 100 mL de milieu Ym pour *F. langsethiae* et 100 mL de milieu Potato Dextrose Broth (Difco™ Potato Dextrose Broth (PDB), BECTON, DICKINSON and COMPANY, REF : 254920) à une concentration de 24 g/L pour *G. candidum*, incubées à 200 rpm et à 22° C. Les fioles sontensemencées avec des spores de *F. langsethiae* 035 (9×10^6 spores/ml) et des arthrospores de *G. candidum* qui ont été récupérées à partir de boîtes de Pétri à l'aide d'un triangle ensemeur et dans 10mL de milieu. Les pré-cultures durent 3 jours pour *F. langsethiae* et 14-16 heures pour *G. candidum*.

2.3.2 Cultures Pures.

Les cultures pures sont réalisées avec *F. langsethiae* et *G. candidum* en utilisant des fioles d'Erlenmeyer de 500ml avec 100ml de milieu de culture Ym avec une agitation de 200 rpm à 22°C pendant 4 jours. Le pH du milieu est ajusté stérilement après inoculation à 7,0 unités. L'inoculation est faite en ajoutant un volume de 3 ou 10% (3 ou 10mL) à partir de chaque pré-culture.

2.3.3 Bioréacteur à membranes (BRM).

Cet outil a été développé et réalisé au LGC. Le principe d'opération du bioréacteur à membranes (BRM) est le suivant : deux micro-organismes différents sont confinés dans des compartiments séparés par une membrane à fibres creuses mais évoluent dans le même milieu de culture grâce à une circulation alternative de ce milieu d'un compartiment à l'autre (Figure 18).

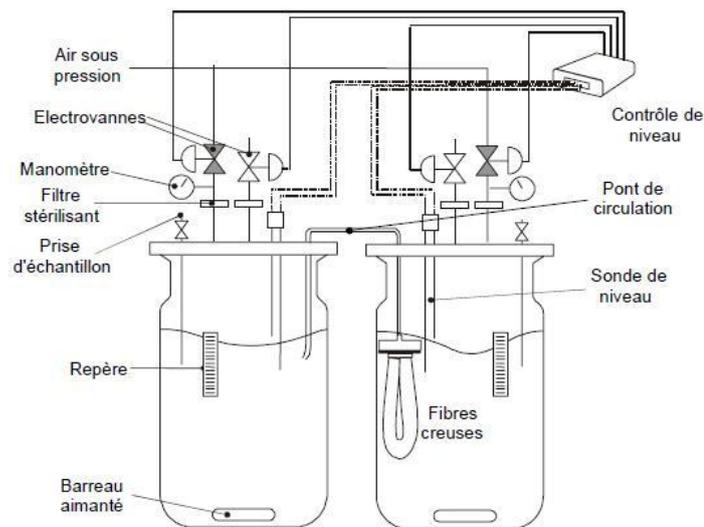


Figure 18. Représentation d'un bioréacteur à membrane (BRM).

L'intérêt de ce dispositif est principalement d'évaluer l'interaction entre *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* sans contact direct et de cette manière de faciliter la détermination de la biomasse de chaque souche. La circulation du milieu au travers d'un module de filtration de membrane à fibres creuses est assurée par surpression d'un gaz (0,7 bar) et elle est contrôlée par des sondes à niveau. Les spécifications de ce module sont décrites dans le Tableau 18.

Tableau 18. Caractéristiques du module de filtration du BRM.

<i>Caractéristiques</i>	<i>Mesure</i>
Diamètre nominal des pores	0,1 μm
Diamètre interne des fibres	0,25 mm
Diamètre externe des fibres	0,43 mm
Nombre de fibres	1314
Longueur utile des fibres	0,09 m
Surface interne	0,107 m ²
Surface externe	0,156 m ²

L'air comprimé est introduit alternativement dans l'espace tête d'un réservoir en faisant une différence de pression transmembranaire qui conduit à un déplacement du milieu d'un compartiment vers l'autre. L'entrée et la sortie des gaz dans chaque compartiment sont contrôlées par un couple d'électrovannes. Un dispositif permet de basculer la mise sous tension entre les deux couples de vannes en fonction du niveau de liquide dans les deux réservoirs. Le niveau maximum de milieu est fixé pour chacun des réservoirs par deux sondes de niveau en acier inoxydable. Le volume moyen est de 1,5 L dans chaque réservoir. Le gaz est stérilisé à l'entrée par filtration sur des membranes en téflon (0,2 μm pore-size).

Une agitation magnétique à l'aide de barreaux aimantés permet l'homogénéisation du milieu à l'intérieur de chaque réservoir du BRM. Les réservoirs sont connectés par un tuyau métallique et le volume mort de cet espace est inférieur à 5mL. Pour assurer que l'homogénéité du milieu entre les deux compartiments soit suffisamment rapide, le volume d'échange est fixé entre 100 et 200 mL pendant un temps de mélange inférieur à 10 min.

2.3.4 Fermentations séquentielles.

L'objectif des fermentations séquentielles est d'évaluer le développement de *F. langsethiae* dans le milieu de culture pré-fermenté par *G. candidum* et de déterminer les effets sur la croissance et la production des toxines. Par contre, la culture de *G. candidum* dans le milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* permet d'évaluer la capacité de croissance de *G.*

candidum en présence de la toxine T-2 naturellement produite par *F. langsethiae* ainsi que sa capacité à dégrader la toxine.

Les fermentations séquentielles sont développées de deux manières : croissance de *G. candidum* dans le milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* (MFF) et croissance de *F. langsethiae* dans le milieu pré-fermenté par *G. candidum* (MFG). Elles ont lieu dans des fioles d'Erlenmeyer stériles de 500 mL contenant 100mL de milieu MFG ou MFF. L'inoculation de chaque souche est faite à 10% (v/v) à partir de la pré-culture correspondante. Les conditions de cultures sont établies à 22° C et 200 rpm. La préparation des milieux pré-fermentés a été décrite dans la section 2.2.3

2.3.5 Co-culture.

L'intérêt de mettre en co-culture *F. langsethiae* et *G. candidum* est de mesurer les effets d'inhibition de *G. candidum* sur *F. langsethiae* en contact direct, ainsi que les effets de la variation du ratio d'inoculum de ces deux souches. A partir des pré-cultures, les souches sont inoculées en fioles d'Erlenmeyer de 500mL contenant 100mL de milieu Ym à différentes concentrations : 3% et 10% volumique pour chacune des deux souches. Les conditions de cultures sont de 22° C, à 200rpm, le pH est ajusté stérilement à 7,0 après inoculation. Des cultures pures utilisées comme témoin sont réalisées en même temps avec les mêmes pourcentages d'inoculation. Les cinétiques des cultures sont suivies pendant 4 jours.

2.4 Caractérisation préliminaire du surnageant de la culture de *G. candidum* (MFG).

2.4.1 Traitements thermiques du milieu MFG.

Le milieu pré-fermenté par *G. candidum* (MFG) contenant l'agent actif (métabolite supposé inhibiteur de la production de la toxine T-2 ou dégradant la toxine) est soumis à des traitements thermiques après avoir éliminé les cellules par filtration sous vide avec une membrane de nitrate de cellulose Sartorius (0,45µm). Les traitements thermiques sont réalisés de deux manières : le premier pendant 30 min dans un bain-Marie thermostaté à 100°C et le deuxième par autoclavage (120°C/20 min).

Ensuite, on additionne les nutriments de milieu Ym en poudre (5 g/L de glucose, 1,5 g/L d'extrait de levure, 1,5 g/L d'extrait de malt et 2,5 g/L de peptones) au milieu MFG, le pH

est ajusté à 7,0 et une filtration en condition stérile est réalisée à travers des filtres stériles Sartorius (0,2 μ m – PVDF). Finalement le milieu est récupéré dans des fioles d'Erlenmeyer stériles avant inoculation (10% \approx 0,5 g/L) de *F. langsethiae* 035. Une cinétique de croissance et de production de la toxine T-2 est réalisée pendant 3 jours à 22° C à 200 rpm. Les milieux traités seront appelés Tt1 pour le milieu MFG traité à 100 °C/30 min et Tt2 pour le milieu MFG traité à 120° C/20 min.

2.4.2 Traitements enzymatiques du milieu MFG.

Le milieu MFG est obtenu après 3 jours de croissance de *G. candidum* dans le milieu Ym à 22° C et 200 rpm. Les cellules sont éliminées par filtration sous vide à travers une membrane de nitrate de cellulose (0,45 μ m). Le MFG libre de cellules est ensuite utilisé pour les traitements enzymatiques. Pour évaluer la sensibilité du MFG à l'activité protéasique, il est traité avec les enzymes suivantes : la protéase type XIV de *Streptomyces griseus* (\geq 3,5 unités/mg solide), la pepsine de muqueuse gastrique porcine (\geq 2.500 unités/mg protéine), l' α -chymotrypsine type II de pancréas bovin (\geq 40 unités/mg protéine) et la trypsine type IX-S de pancréas porcine (\geq 13.000-20.000 BAEE U/mg protéine) achetés chez Sigma Aldrich. Toutes les enzymes sont dissoutes dans une solution de tampon phosphate 0,05M à pH 3,0 pour la pepsine et 7,0 pour les autres. Le pH du MFG libre de cellules est aussi ajusté au pH optimal d'activité de chaque enzyme avant chaque traitement en utilisant une solution de NaOH 5M ou d'acide orthophosphorique à 85%. Après, les enzymes sont additionnées à une concentration finale de 1 mg/mL dans le MFG. L'incubation est faite à 37° C au bain-Marie pendant 60 min. Après l'incubation, les milieux sont complétés avec les nutriments du milieu Ym en poudre et le pH est ajusté à 7,0 unités. Après les milieux sont filtrés stérilement à travers des filtres Sartorius (0,2 μ m – PVDF) et récupérés en Erlenmeyers stériles de 500mL. *F. langsethiae* est ensemencé (10% \approx 0,5 g/L) et ultérieurement, le pH est ajusté encore à 7,0 unités. Une cinétique de croissance et de production de la toxine T-2 est réalisée pendant 4 jours à 22° C et 200 rpm. Les milieux seront appelés E1 pour le milieu MFG traité avec l'enzyme Protéase XIV, E2 pour le milieu MFG traité avec l'enzyme α -chymotrypsine type II et E3 pour le milieu MFG traité avec l'enzyme pepsine.

2.5 Méthodes analytiques.

2.5.1 Quantification de biomasse : méthode gravimétrique.

La mesure du poids sec a pour but d'estimer la biomasse cellulaire contenue dans un volume de culture connu. Cette méthode est basée sur la différence des poids secs d'une membrane de nitrate de cellulose (pore size 0,45µm, Sartorius Stedim Biotech) avant et après filtration et séchage de 5-10mL d'un échantillon microbien (*F. langsethiae* seul, *G. candidum* seul ou la combinaison de deux en co-culture) en fonction du temps de prélèvement. Les membranes sont mises à sécher dans une étuve pendant 24h à 100°C, puis pesées après refroidissement dans un dessiccateur. La biomasse sèche est exprimée en grammes par litre (g/L).

2.5.2 Dosage du glucose par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).

Pour la détermination de la concentration en glucose, 800µL de milieu de culture libre de cellules est déféqué en ajoutant 100µL de Ba(OH)₂ en saturation et 100µL Zn(SO₄)₂ 5% (w/w). Après 5 minutes, l'échantillon est centrifugé à 13 000 rpm, pendant 10 min à 4°C. Il est filtré par la suite avec un filtre seringue de 0.45µm PVDF (Whatman). La détection est faite par HPLC équipée d'une pompe M45 Waters, d'un détecteur de type refractomètre Waters 420 et d'une colonne C18 spéciale pour la séparation des sucres. La température du détecteur refractomètre est établie à 30°C et la phase mobile est une solution d'acétonitrile et d'eau MilliQ (70/30, v/v) sous un flux isocratique de 1,2 mL/min.

2.5.3 Dosage des toxines par HPLC couplé à un détecteur de fluorescence FLD.

La détermination de la toxine T-2 est faite par chromatographie liquide à haute performance. Pour quantifier la toxine en cultures liquides, les méthodologies proposées par Lippolis et al. (2008); Pascale et al. (2003); Trebstein et al. (2009); Trebstein et al. (2008); Visconti et al. (2005) ont été adaptées. La toxine T-2 standard, le 4- diméthylaminopyridine (DMAP) et le toluène (Chromasolv® Plus grade HPLC ≥99,9%) sont achetés chez Sigma Aldrich (Lyon, France). Le 1-antroïlnitrile (1-AN) est obtenu chez SOBIODA LABORATOIRES. La toxine est dissoute dans l'acétonitrile pur (grade HPLC) pour avoir des solutions mères à une concentration de 1000 µg/mL de T-2 stockées à -20° C. Les solutions de travail sont préparées par dilution avec de l'acétonitrile pur (grade HPLC) et stockées à

4°C. La préparation des solutions pour la dérivation est faite d'après Trebstein et al. (2008). Le protocole est décrit dans la Figure 19. Les analyses en HPLC sont effectuées à l'aide d'un système Kontron équipé d'une pompe binaire Kontron 525, un injecteur automatique d'échantillons Kontron 465, un dégazeur Knauer, un four à colonne thermostaté Kontron 582, un système de détection de fluorescence Spectra system FL 3000 et une logiciel ChromGate version 3.3.1 (Knauer, Berlin, Germany). La séparation de la toxine T-2 est faite avec une colonne 5µm Luna Phenyl-Hexyl (150mm x 4,6mm ; Phenomenex, Germany) avec une pré-colonne de 4mm x 3mm du même fournisseur. La colonne est thermostatée à 40° C et le flux de phase mobile est de 1 mL/min. Les conditions opératoires sont montrées dans le Tableau 19. Les longueurs d'onde d'excitation et émission du détecteur de fluorescence sont établies à 380 et 470 nm respectivement. Tous les échantillons ont été filtrés avec des filtres seringue Whatman du 0.2µm de polyfluortetraethylene (PTFE) avant analyse.

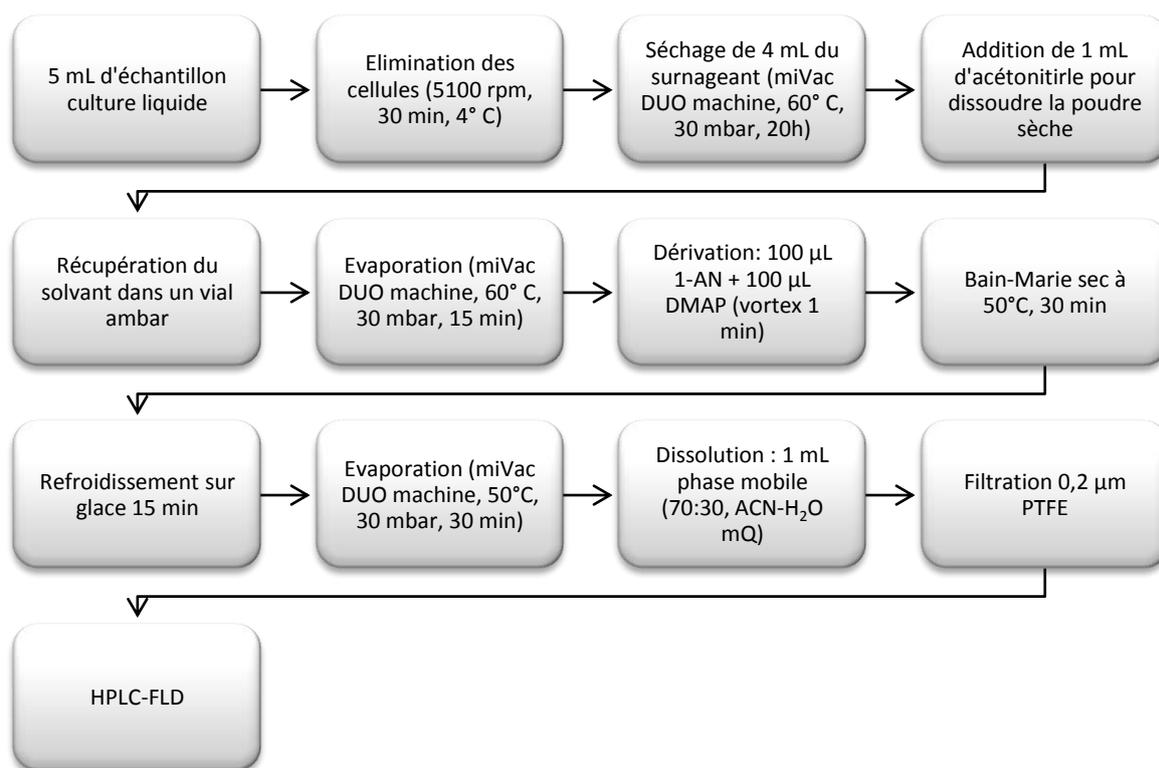


Figure 19. Schéma de la dérivation des toxines T-2 et HT-2 (1-AN : 1-Antrolylnitrile ; DMAP : 4- diméthylaminopyridine).

Tableau 19. Conditions opératoires de l'analyse de la toxine T-2 en HPLC-FLD.

Temps (min)	H ₂ O mQ (%)	Acétonitrile (%)	Temps total (min)
10	30	70	10
10	15	85	20
10	15	85	30
2	0	100	32
5	0	100	37
5	30	70	42
5	30	70	47

2.5.4 Double-labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescent *in situ* hybridization (DOPE-FISH).

La technique « Double-labeling of oligonucleotide probes for fluorescent *in situ* hybridization » a été utilisée pour la détection et la différenciation des micro-organismes en culture mixte (co-culture). Cette technique a été choisie car le double marquage 5'- et 3'- des oligonucléotides améliore l'intensité du signal et l'accessibilité *in situ* des régions 16S et 23S de l'ADN en comparaison au signal obtenu en utilisant des sondes avec un seul marquage (Stoecker et al., 2010).

Des sondes spécifiques pour *F. langsethiae* et *G. candidum* sont utilisées pour cela. La méthodologie est divisée en plusieurs étapes : la préparation des sondes, la fixation des micro-organismes sur des lames de verre, la digestion des parois fongiques et l'hybridation avec des sondes oligonucleotiques marquées, la post-hybridation, et le rinçage.

Préparation des sondes

Les sondes testées sont les sondes pB-01541 avec une spécificité pour *Geotrichum* sp. et pB-00429 avec une spécificité pour les Eucaryotes (Fournisseur GeneCust - Custom Services for Research, Luxembourg) avec respectivement une fluorescence verte (DyLight 488 pour *Geotrichum*) et rouge (DyLight 549 pour Eucaryote). De ce fait, *Geotrichum* devrait fluorescer en jaune (vert+rouge) et *F. langsethiae* en rouge dans les longueurs d'ondes

spécifiques. Le Tableau 20 montre les caractéristiques de chacune des sondes. Pour préparer un stock de sondes, 10µL de la sonde à une concentration de 0,6 µL sont additionnés à 6 µL d'une solution de bicarbonate de sodium (25 mg/mL) plus 4 µL de la solution DyLight qui correspond. Les solutions des colorants fluorescents DyLight 488 et DyLight 549 ont été préparées en additionnant 100 µL de Diméthyle sulfoxyde (DMSO) dans chaque tube DyLight-Dye (fournisseur Thermo Fisher, France), puis stockées à -20° C. La réaction entre la sonde et le colorant est effectuée pendant 2 heures à l'obscurité et à température ambiante. Les sondes actives sont ensuite stockées à -20° C avec une concentration finale de 300 ng/µL.

Tableau 20. Caractéristiques des sondes utilisées dans la DOPE-FISH
(www.microbial-ecology.net).

Spécificité	<i>Geotrichum sp.</i>	Eucaryote – <i>F. langsethiae</i>
Nom de la sonde	Geo	UNIV 1389b
Numéro d'adhésion	pB-01541	pB-00429
Séquence	5'-TTA CGG GGC TGT CAC CCT-3'	5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAA-3'
Molécule ciblée	26S ARNr	18S ARNr
Contenu G+C	61,1%	55,6%
Poids moléculaire	5463 g/mol	5583 g/mol
Formamide	20%	0%

Fixation des micro-organismes

1 mL de milieu de culture avec cellules est centrifugé (4100 rpm, 10 min, 4° C) pour éliminer le milieu de culture. Après, le culot est lavé 3 fois avec 1 mL de tampon A (0,05M NaH₂PO₄ et 0,15M NaCl à pH 7,2) puis passage au vortex pendant 30 secondes et ensuite le tampon A est éliminé par centrifugation. Une fois que le culot est lavé, 1 mL de tampon B est additionné (tampon A + 3% de paraformaldéhyde) puis passage au vortex pendant 30 secondes. La réaction de fixation des cellules est réalisée pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. Ensuite, le tampon B est éliminé par centrifugation (4100 rpm, 10 min et 4° C) et le

rinçage avec le tampon A est répété 3 fois encore. Le culot est dissout dans 1 mL de tampon A et 10 µL de cette suspension sont placés sur des lames en verre préalablement nettoyées à l'alcool 70% (Figure 20). Puis les lames sont chauffées à 50° C sur une plaque chauffante électrique pendant 5 min.

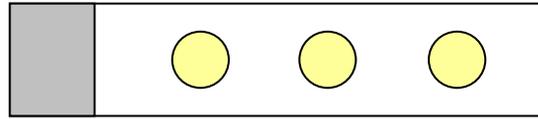


Figure 20. Méthodologie DOPE-FISH pour *F. langsethiae* et *G. candidum*.

Digestion des parois microbiennes

Dans chaque cercle des micro-organismes sont fixés sur des lames, on ajoute 20 µL de la solution enzymatique de digestion de paroi. La solution enzymatique est préparée à partir de l'enzyme L1412 – Lysing Enzyme from *Trichoderma harzianum* dans la solution tampon FISH-NaCl (20 mM TrisHCl, 0,1% SDS, 5mM EDTA et 0,9M NaCl à pH 7,2) avec une concentration de 15 µg/µL. La réaction de digestion est faite à 37°C pendant 2 heures. Ensuite, la solution de digestion doit être rincée 3 fois en ajoutant 20 µL de la solution tampon FISH-NaCl. Les micro-organismes sont ensuite déshydratés grâce à l'addition de 3 fois 20 µL d'éthanol selon le gradient : 50, 70, 99,9%. On évapore à 50° C à l'étuve pendant 30 min.

*Hybridation et Post-hybridation**

Une dilution de la solution de sondes stockées est réalisée pour avoir une concentration finale à 15 ng/µL en considérant les sondes à utiliser, la solution tampon FISH-NaCl et 20% (v/v) de formamide. La présence de formamide ajuste l'astringence et augmente l'affinité de l'hybridation grâce à la dénaturation de la structure des ribosomes (Yilmaz *et al* 2006). On pose 20 µL de la solution d'hybridation dans chaque cercle contenant les micro-organismes pour faire la réaction d'hybridation à 50° C pendant 2-3 heures. Une étape de post-hybridation suit en ajoutant 20 µL de la solution tampon FISH (20 mM TrisHCl, 0,1% SDS, 5mM EDTA à pH 7,2) dans chaque cercle et on chauffe à 51° C pendant 30 min. Les cercles sont rincés avec 50 µL d'eau distillée et séchés à 51° C 3 fois de suite. Après un passage à l'obscurité d'au moins 1 journée à T°C ambiante, une observation au microscope est réalisée à aux longueurs d'ondes adéquates. (* Répéter l'hybridation si non marquage).

2.6 Quantification d'ADN.

2.6.1 Extraction de l'ADN génomique.

Elle est réalisée à l'aide du Fast DNA Kit (Q-BIOgene) conformément au manuel d'instructions. Il permet une extraction rapide de l'ADN génomique provenant de divers échantillons : plantes, tissus animaux, bactéries, levures, algues et champignons. Ce kit nécessite l'utilisation du FastPrep Instrument (MP Biomedicals), dans lequel les échantillons subissent une série de mouvements horizontaux et verticaux, ce qui résulte en leur homogénéisation rapide et efficace grâce notamment à une bille de céramique ainsi qu'une matrice permettant la lyse des cellules. Cette homogénéisation est réalisée en présence d'une solution de lyse, puis une centrifugation permet d'éliminer les débris cellulaires. L'ADN est ensuite purifié et élué dans de l'eau ultra pure.

2.6.2 Dosage des acides nucléiques.

Il est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre. Dans une cuve en quartz, on dépose 20 μ L d'ADN, puis on ajoute 980 μ L d'eau milliQ. L'absorbance à 260 nm est mesurée (longueur l'onde d'absorption des acides nucléiques) ainsi qu'à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines). Pour l'ADN, une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration de 50 μ g/mL.

La concentration en ADN de l'échantillon est donnée par la formule suivante :

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260} \times 50 \times \text{facteur de dilution} = \text{concentration d'ADN en } \mu\text{g/mL}$$

Pour les ARN, une unité de DO à 260 nm correspond à une concentration de 40 μ g/mL.

La concentration en ARN de l'échantillon est donnée par la formule suivante :

2.6.3 Quantification de l'ADN de *F. langsethiae* / *G. candidum*.

Un volume des échantillons d'ADN génomique est prélevé et dilué dans un nouveau tube Eppendorf stérile avec la Nuclease free water (QIAGEN), de manière à obtenir une concentration de 20 μ g/mL dans un volume de 50 μ L. Ces tubes sont ensuite envoyés à l'IFBM pour la réalisation de la PCR quantitative. Un réplicat de chaque culture pure (*F. langsethiae* C et *G.candidum* A) a été envoyé, et la co-culture a été envoyée en triplicat.

2.7 Calculs des paramètres stœchiométriques et cinétiques.

La vitesse moyenne de production de la toxine T-2 est définie comme (r_P) :

$$r_P \left(\frac{g}{mL/h} \right) = \frac{dP}{dt} = \frac{P_f - P_0}{t_f - t_0}$$

La vitesse moyenne de croissance de *Fusarium langsethiae* est définie comme (r_{xF}) :

$$r_{xF} \left(\frac{g}{L/h} \right) = \frac{dX_F}{dt} = \frac{X_{fF} - X_{0F}}{t_f - t_0}$$

La vitesse moyenne de croissance de *G. candidum* est définie comme (r_{xG}) :

$$r_{xG} \left(\frac{g}{L/h} \right) = \frac{dX_G}{dt} = \frac{X_{fG} - X_{0G}}{t_f - t_0}$$

La vitesse spécifique moyenne de croissance est définie comme (μ_m) :

$$\mu_m \left(h^{-1} \right) = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

$$\ln X_2 - \ln X_1 = \mu_m X \left(t_2 - t_1 \right)$$

3. Sélection du milieu de culture.

Dans le but d'utiliser le BRM pour évaluer l'interaction entre *F. langsethiae* et *G. candidum*, la sélection d'un milieu de culture dans lequel ces deux micro-organismes se développent de manière similaire est importante. De plus dans ce milieu, *F. langsethiae* doit produire les toxines T-2 et HT-2. Ces micro-organismes intervenant dans le procédé de brasserie, nous avons tenté de mettre au point un milieu à base de grains d'orge, puis des milieux semi-synthétiques ont été testés.

3.1 Création du milieu de culture à base de grains d'orge entiers (MGO).

Le but de la création d'un milieu de culture à base d'orge est de reproduire les conditions de culture dans les quelles *F. langsethiae* et *G. candidum* se développent pendant l'étape de maltage. Les paramètres testés pour la création de ce milieu sont l'infusion de grains d'orge entiers, l'infusion de grains d'orge broyés, le temps d'infusion et la concentration des grains.

3.1.1 Infusion de grains d'orge entiers.

Le milieu d'infusion de grains d'orge (MGO) est préparé en faisant tremper 10 g de grains d'orge dans 100 mL d'eau distillée portée à 100° C, sans maintenir le chauffage ensuite. L'infusion est suivie pendant 300 min en mesurant la température et l'absorbance à 420 nm (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Pendant l'infusion, la couleur du milieu devient jaune (Figure 21). D'après la loi de Beer-Lambert qui établit une proportionnalité entre la concentration d'un composé en solution et sa couleur, nous supposons que la coloration jaune du milieu est en relation avec la concentration des nutriments provenant de l'orge. Dans le visible, la couleur de la solution dépend des longueurs d'ondes absorbées. Par exemple, une solution qui absorbe les radiations jaune-verte aura une coloration pourpre correspondant à la couleur complémentaire du jaune-vert (Figure 22). Dans ce cas, notre solution jaune absorberait dans le violet entre 400 et 435 nm. Une longueur d'onde de 420 nm a donc été choisie pour déterminer la concentration du milieu d'infusion de grains d'orge.

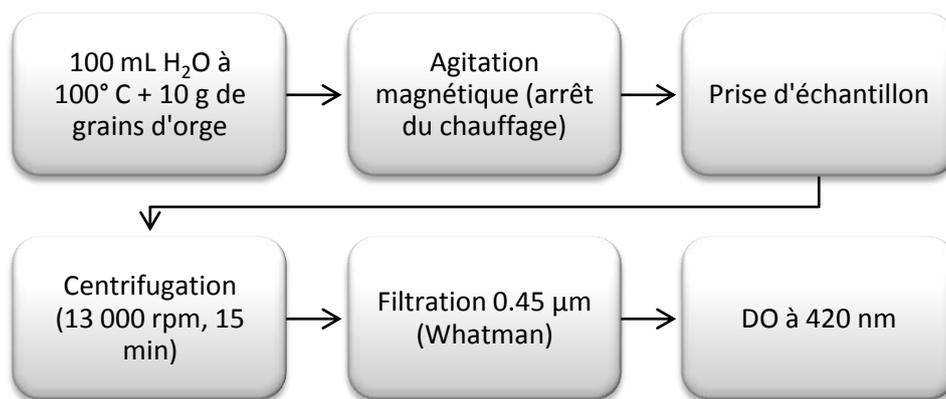


Figure21. Préparation du milieu d'infusion de grains d'orge (MGO) à 100 g/L.



Figure 21. Milieu d'infusion de grains d'orge (MGO).

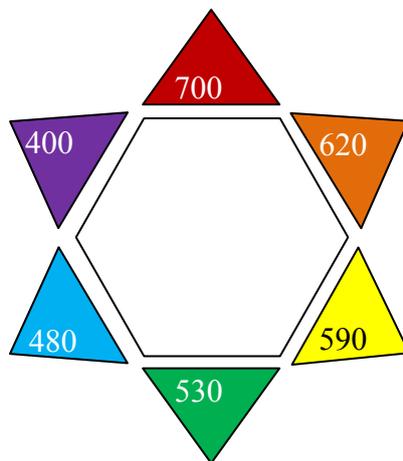


Figure 22. Spectre de la lumière blanche.

Les résultats de l'infusion de grains d'orge pour préparer le milieu MGO ont montré une augmentation de l'absorbance en fonction du temps (Figure 23). L'absorbance maximale

est obtenue pour 50 à 60 min d'infusion et se maintient au delà. Ce temps est donc suffisant pour la préparation du milieu à base de grains d'orge infusés.

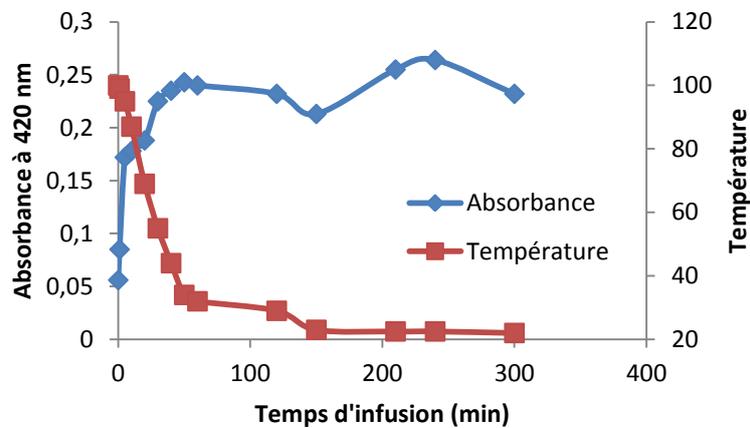


Figure 23. Suivis de l'absorbance et de la température pendant l'infusion de grains d'orge pour la préparation du milieu MGO.

3.1.2 Infusion de grains d'orge broyés.

Un paramètre testé pour la préparation d'un milieu à base d'orge a été l'infusion de grains broyés (MOB). Le temps de broyage est critique dans cette préparation. La taille des grains doit être réduite sans arriver à produire une farine fine pour éviter d'extraire ou faire cuire l'amidon présent dans les grains pendant l'infusion. Pour ce test, une quantité de 20g de grains d'orge a été broyée pendant différents temps avec un temps de broyage maximal d'une minute. La Figure 24 montre les résultats obtenus après les temps testés. Dans cette figure, il est possible d'observer qu'après 1 min de broyage les grains sont complètement broyés et une poudre farineuse est obtenue. Ainsi des temps de broyage plus courts de 30 à 5 secondes ont été testés. Jusqu'à 10s les grains sont broyés moins fins en comparaison aux autres temps testés.

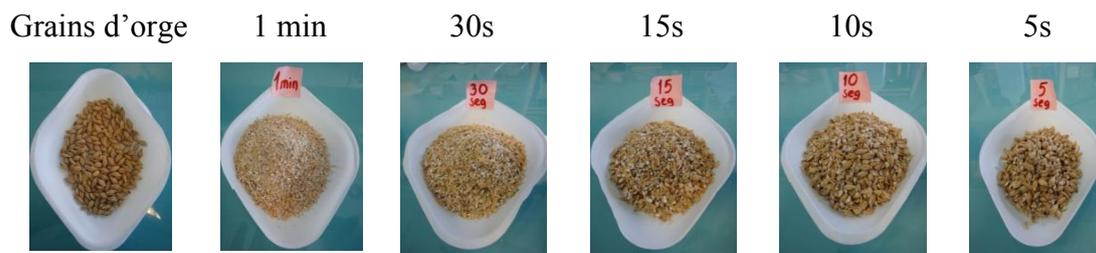


Figure 24. Grains d'orge après différents temps de broyage.

Pour la préparation du milieu à partir d'orge broyée, les mêmes conditions d'infusion (Figure 21) ont été utilisées. De la même manière que l'infusion de grains, l'absorbance a augmenté pendant le temps d'infusion. Par contre, le milieu récupéré avait un aspect épais. Après la centrifugation seule la phase plus claire a été récupérée. La Figure 25 montre les phases après centrifugation : la phase claire utilisée pour le test d'absorption, la phase épaisse et amidonnée, et la phase solide où se trouvent les débris des grains d'orge.

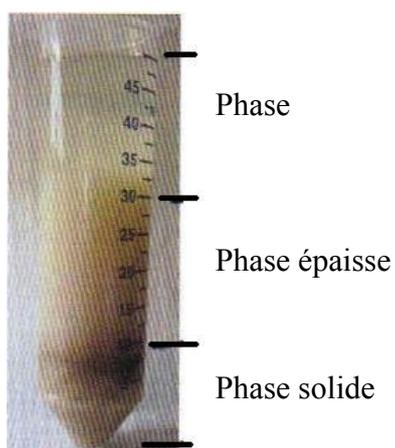


Figure 25. Phase amidonnée trouvée pendant l'infusion de grains d'orge broyés.

Les résultats de l'absorbance du milieu MOB pendant l'infusion ont montré qu'elle augmente en fonction du temps d'infusion (Figure 26). Les valeurs sont plus élevées que pour l'infusion de grains non broyés. La réduction de la taille des grains a affecté directement l'absorbance et par conséquent la concentration des nutriments dans le milieu. Le germe ou embryon, la partie la plus importante du grain d'orge est constituée d'eau (10-15%), d'amidon (60-65%), de matières azotées (10-11%), de cellulose (2-3%) et de matières grasses (5%). Comme les grains ont été cassés, l'infusion a permis l'extraction d'amidon et d'autres

composants dans le milieu et une séparation de phases a été nécessaire. Donc, pour la préparation du milieu MOB il est nécessaire d'infuser une quantité de grains broyés plus élevée que pour le milieu MGO à cause de la perte de la phase épaisse.

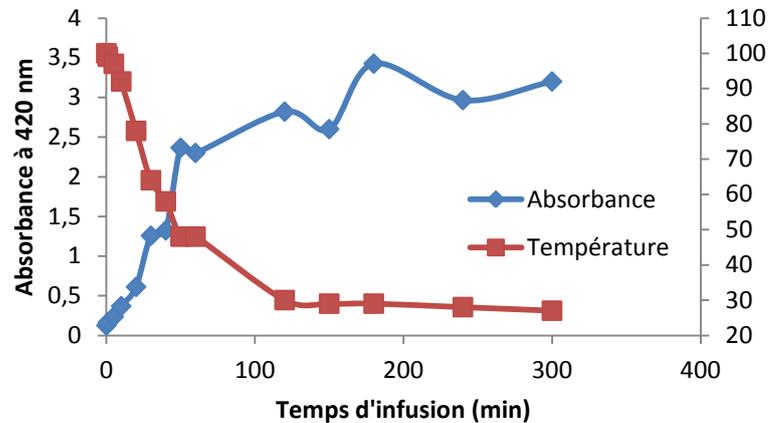


Figure 26. Suivis de l'absorbance et de la température pendant l'infusion de grains d'orge broyés pour la préparation du milieu MOB.

3.1.3 Infusion de grains d'orge (MGO) ratio 1:1.

Dans le but de préparer un milieu MGO plus concentré (puis dilutions dans les tests), le rapport grains-H₂O a été augmenté à 1:1, soit 100g de grains d'orge sont infusés dans 100mL d'eau à 100° C. Dans ce test, le temps d'infusion est réduit à 180 min à cause du gonflement des grains qui absorbent toute l'eau au-delà. Dans la Figure 27 il est possible d'observer le changement de la coloration du milieu en fonction du temps d'infusion. Cette concentration s'observe aussi dans les résultats d'absorbance du milieu (Figure 28).



Figure 27. Coloration de milieu MGO relation 1:1 (grains d'orge: H₂O) en fonction du temps d'infusion (minutes).

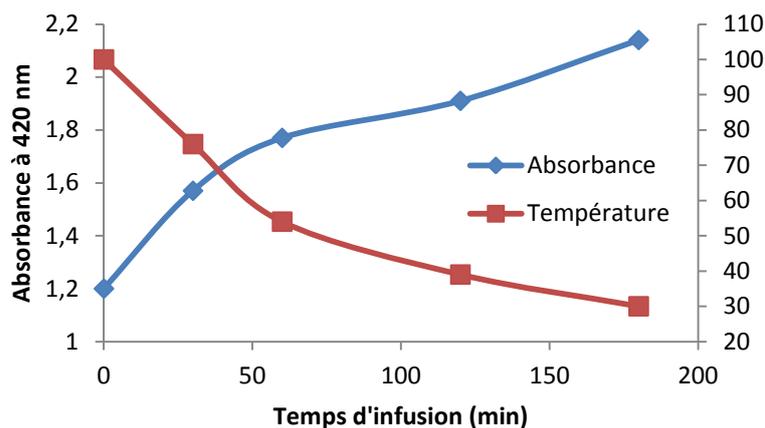


Figure 28. Suivis de l'absorbance et de la température pendant l'infusion de grains d'orge pour la préparation du milieu MGO relation 1:1.

Dans cette méthodologie d'infusion, après 180 min, on a observé une réduction de la quantité de l'eau disponible pour l'infusion et la création du milieu à cause de gonflage des grains d'orge. Même si dans cette technique le milieu est plus concentré, le volume récupéré à la fin de l'infusion n'est pas suffisant pour en faire un milieu de culture. Une possible utilisation est de faire une dilution pour augmenter la quantité de milieu infusé.

3.1.4 Conclusion de la méthodologie d'infusion.

D'après ces résultats, le temps d'infusion choisi est de 45 min en utilisant des grains d'orge entiers. L'utilisation du milieu d'infusion de grains d'orges broyés est limitée à cause de la présence d'une phase épaisse amidonnée qui devient solide après refroidissement (Figure 29).



Figure 29. MOB après refroidissement, solidification du milieu.

3.2 Résultats de croissance de *F. langsethiae* et *G. candidum* sur différents milieux.

Pour étudier l'interaction entre ces deux micro-organismes, un des paramètres à considérer pour la sélection du milieu de culture est que la croissance de *F. langsethiae* et *G. candidum* soit similaire. C'est-à-dire que la concentration en biomasse obtenue lors de la culture de ces deux microorganismes ne soit pas très différente pour les 2 micro-organismes.

3.2.1 Milieu à base de grains d'orge infusés (MGO).

Le milieu à base de grains d'orges infusés (MGO) est testé sous 3 formes : sans complément, additionné d'extrait de levure et avec de l'extrait de levure et des peptones. La concentration du milieu MGO est de 50 g de grains d'orge pour 1L d'eau. Le MGOx est additionné de 1 g/L d'extrait de levure et le MGOxp contient 1 g/L d'extrait de levure et 1 g/L de peptone (MGOxp). Les conditions de culture utilisées sont celles décrites dans Matériel et Méthodes (22° C, 200rpm, 10% inoculum) sauf que le temps de culture est de 7 jours. Le Tableau 21 montre les résultats de la biomasse produite par *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* dans les 3 milieux. Dans ce tableau on peut observer que la biomasse des micro-organismes augmente grâce à l'addition des compléments. La croissance de *F. langsethiae* 033 passe de 0,31 g/L dans le milieu MGO à 0,69g g/L avec la présence d'extrait de levure et peptones. De la même manière, la croissance de *G. candidum* est favorisée avec l'adition des nutriments passant de 0,10 à 0,70 g/L.

Tableau 21. Effet de l'adition des nutriments dans le milieu MGO sur la croissance de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* (7 jours de culture, 22° C, 200 rpm, 10% inoculum).

Milieu (50g/L)	<i>F. langsethiae</i> 033 Biomasse produite (g/L)	<i>G. candidum</i> Biomasse produite (g/L)
MGO	0,31	0,10
MGOx	0,40	0,53
MGOxp	0,69	0,70

Cependant la croissance des deux micro-organismes reste faible. Nous avons donc pour la suite testé des milieux plus concentrés. Le milieu MGO est préparé à une concentration de 200g/L puis des dilutions sont réalisées au ½ et au ¼ pour avoir des concentrations équivalentes à 100 et 50 g/L. Le milieu MGO (à toutes les concentrations) est de plus additionné de 1 g/L d'extrait de levure. D'après les résultats présentés dans le Tableau

21, la croissance de *G. candidum* est un peu supérieure à la croissance de *F. langsethiae* 033. Pour cette raison, le ratio d'inoculation a été diminué de 10% à 1% pour *G. candidum*. Le Tableau 22 montre une augmentation de la biomasse produite par *F. langsethiae* 033 passant de 0,41 à 0,90 g/L en incrémentant la concentration de MGOx de 50 à 200 g/L. Par contre, cette effet n'est pas si marqué pour la culture de *G. candidum* où la biomasse passe de 0,31 à 0,50 g/L en augmentant la concentration du milieu MGO de 25 à 200 g/L. Dans tous les cas, la croissance reste faible même pour le milieu le plus concentré.

Tableau 22. Effet de la concentration du milieu MGOx sur la croissance de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum*. (7 jours de culture, 22° C, 200 rpm, 10% inoculation *F. langsethiae* 033 et 1% inoculation *G. candidum*).

Concentration de MGOx (g/L)	<i>F. langsethiae</i> 033 (g/L)	<i>G. candidum</i> (g/L)
50	0,41	0,31
100	0,23	0,36
200	0,90	0,50

3.2.2 Milieu d'extrait de malt (MEM).

Pendant la fabrication de la bière, l'orge est transformée en malt pendant le maltage. Un milieu à base d'extrait de malt (MEM) a été choisi pour évaluer la croissance de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum*. Plusieurs concentrations entre 5 et 20 g/L d'extrait de malt ont été évaluées. Le Tableau 23 présente les résultats obtenus après 7 jours de culture de ces micro-organismes (22° C, 200rpm, 10% inoculum). On observe que pour les deux micro-organismes la biomasse produite augmente avec la concentration de MEM. Par contre, *F. langsethiae* 033 produit 4 à 7 fois plus de biomasse que *G. candidum*. Cette différence est plus marquée à la concentration de 5 g/L (0,28 g/L pour *G. candidum* et 2,12 g/L pour *F. langsethiae* 033) que entre 10 et 20 g/L (entre 4 et 5 fois plus).

Tableau 23. Effets de la concentration du milieu MEM sur la croissance de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* (7 jours, 22° C, 200 rpm).

Concentration (g/L)	<i>F. langsethiae</i> 033 (g/L)	<i>G. candidum</i> (g/L)
5	2,12	0,28
10	3,39	0,78
15	5,50	1,20
20	8,00	1,58

3.2.3 Milieu Yeast Extract-Peptide-Dextrose (YEPD).

Le milieu YEPD (5 g/L d'extrait de levure, 10 g/L peptone, 10 g/L glucose) est un milieu qui favorise le développement de levures, *G. candidum* dans ce cas. Les conditions de culture dans les quelles ce milieu a été testé sont les mêmes que pour les autres milieux (22° C, 200 rpm, 7 jours de culture et 10% inoculation). Dans ce milieu les deux micro-organismes se sont très bien développés, 5,26 g/L de biomasse pour *G. candidum* et 8,28 g/L pour *F. langsethiae* 033 (Tableau 24).

Tableau 24. Croissance de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* dans le milieu YEPD.

Milieu	<i>F. langsethiae</i> 033 Biomasse (g/L)	<i>G. candidum</i> Biomasse (g/L)
YEPD	8,28	5,26

Cependant en considérant l'utilisation du BRM, une concentration élevée en biomasse risque de colmater la membrane du BRM pendant la culture. De plus une croissance très forte des deux micro-organismes n'est pas représentatif de ce qui se passe en conditions réelles.

3.2.4 Milieu Ym.

Finalement en prenant en compte l'effet positif de l'extrait de levure et de l'extrait de malt, et avec un objectif de croissance similaire mais pas trop élevée des deux micro-organismes nous avons formulé le milieu Ym à base de glucose (5 g/L), d'extrait de levure (1,5 g/L), d'extrait de malt (1,5 g/L) et de peptones (2,5 g/L).

Après une pré-culture de 3 jours (22° C, 200 rpm) dans le milieu YEPD, *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* sont cultivés dans le milieu Ym avec un ratio d'inoculation de 10% et 1% respectivement. Les résultats de croissance (Tableau 25) montrent leur développement dans ce nouveau milieu de culture.

Tableau 25. Croissance de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm).

Temps (jours)	<i>F. langsethiae</i> 033 (g/L)	<i>G. candidum</i> (g/L)
0	0,54	0,07
3	5,02	3,96
5	4,57	4,02
7	4,66	3,72

On observe que les concentrations de la biomasse de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* dans le milieu Ym sont très proches. Après 3 jours de culture les concentrations sont de 5,02 g/L pour *F. langsethiae* et de 3,96 g/L pour *G. candidum*. Pendant la culture de 5 et 7 jours, les concentrations sont similaires et ne sont pas très élevées comme la valeur de 8,2 g/L obtenue dans le milieu YEPD pour *F. langsethiae* 033. Ces résultats sont favorables pour l'utilisation de ce milieu dans l'évaluation de l'interaction de ces deux micro-organismes.

3.3 Résultats de la production des toxines T-2 et HT-2 par *F. langsethiae* 033 sur les différents milieux de culture.

Pour la sélection d'un milieu de culture pour *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* il ne suffit pas que la différence de croissance entre eux soit faible, c'est aussi important que le milieu choisi permette à *F. langsethiae* 033 de produire les toxines T-2 et HT-2. Les milieux choisis pour déterminer la capacité de *F. langsethiae* 033 à produire les toxines T-2 et HT-2 sont le milieu d'extrait de malt (MEM : 20, 10 et 5 g/L), le milieu à base de grains d'orge infusés additionné de 1g/L d'extrait de levure (MGOx : 200 et 25 g/L), le milieu YEPD et le milieu Ym. Après une culture de 7 jours de *F. langsethiae* 033, le surnageant a été envoyé à QUALTECH pour faire la quantification des toxines. Les résultats du Tableau 26 montrent les concentrations obtenues dans tous les milieux testés. Il est possible d'observer que la concentration du milieu à base d'extrait de malt (MEM) a un effet sur la concentration de la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 033. A 20 g/L de MEM, les concentrations des toxines T-2 (54,80 µg/L) et HT-2 (13,70 µg/L) sont supérieures aux concentrations détectées à 5 g/L de MEM (18,0 et 1,4 µg/L respectivement). Dans ce milieu, les concentrations de toxines sont acceptables, par contre le milieu MEM favorise plus la croissance de *F. langsethiae* 033 que celle de *G. candidum*. Dans le milieu à base d'orge et complété en extrait de levure, MGOx, la différence de croissance entre les micro-organismes n'est pas si marquée que dans le milieu MEM. Mais, la production des toxines est très faible : entre 1,80 et 2,10 µg/L pour la toxine T-2 et entre 2,20 et 1,30 µg/L pour la toxine HT-2 aux concentrations de 200 et 25g/L de MGOx respectivement. Le milieu YEPD dans lequel la croissance pour les deux micro-organismes est forte, la production des toxines T-2 et HT-2 est faible de 5,90 et 8,00 µg/L respectivement. Dans le milieu Ym, les concentrations des toxines T-2 et HT-2 sont les plus élevées : 943,60 µg/L pour la T-2 et de 353,70 µg/L pour la HT-2. De plus, la différence de

biomasse entre *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* n'est pas si marquée que dans le milieu MEM.

Tableau 26. Effet des différents milieux sur la concentration des toxines T-2 et HT-2 produites par *F. langsethiae* 033 (7 jours, 22° C, 200 rpm).

Milieu	Biomasse (g/L)		Production de toxines par <i>F. langsethiae</i> 033	
	<i>F. langsethiae</i> 033	<i>G. candidum</i>	T-2 (µg/L)	HT-2 (µg/L)
MEM (20g/L)	8,00	1,58	54,80	13,70
MEM (10g/L)	3,39	0,78	15,70	1,80
MEM (5g/L)	2,12	0,28	18,00	1,40
MGOx (200g/L)	0,76	0,69	1,80	2,20
MGOx (25g/L)	1,19	0,98	2,10	1,30
YEPD	8,28	5,99	5,90	8,00
Ym	4,12	3,64	943,60	353,70

3.4 Conclusion.

Pour la suite du travail, nous utiliserons le milieu Ym sur lequel les croissances de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* sont similaires et la production des toxines T-2 et HT-2 par *F. langsethiae* 033 est importante.

4. Méthode de détermination de la toxine T-2 en HPLC-FLD.

4.1 Sélection de la méthodologie.

Actuellement dans la bibliographie, il y a plusieurs méthodologies rapportées pour la détection des toxines T-2 et HT-2. Le laboratoire possède un équipement HPLC avec un détecteur de fluorescence et pour cette raison, la méthodologie développée dans ce travail pour la quantification de la toxine T-2 est celle qui utilise l'HPLC-FLD.

Dans la littérature, le dosage des toxines T-2 et HT-2 se fait souvent à partir de matrices solides où les toxines se trouvent sur les grains de céréales. Une extraction de ces toxines est alors nécessaire pour éliminer les composants non-désirés. Les méthodes rapportées qui utilisent la fluorescence comme détection des toxines T-2 et HT-2 (Tableau 27) diffèrent dans la quantité de grains analysés, le type de solvant utilisé pour faire l'extraction, le volume utilisé pour faire la réaction de dérivation et le volume de reconstitution avant injection.

Tableau 27. Méthodes de quantification des toxines T-2/HT-2 par HPLC-FLD.

	<i>Visconti et al 2005</i>	<i>Trebstein et al 2008</i>	<i>Trebstein et al 2009</i>	
Matrice	50g grains	25g grains	25g grains	15g grains
Solvant d'extraction	MétOH	MétOH	MétOH/ACN	ACN
Volume pour la dérivation	50µL 1-AN	100µL 1-AN	100µL 1-AN	50µL 1-AN
	50µL DMAP	100µL DMAP	100µL DMAP	50µL DMAP
Volume de reconstitution	1000µL	1000µL	1000µL	750µL
	ACN : H ₂ O (70:30)			
Volume d'injection	20µL	100µL	100µL	50µL

1-AN: 1-anthrolylnitrile; DMAP: 4-diméthylaminopyridine

4.2 Quantification des toxines sans extraction.

L'étape d'extraction est fréquemment faite pour récupérer les toxines qui se trouvent dans une matrice solide et pour les concentrer avant le dosage. D'après les rapports scientifiques qui utilisent l'HPLC-FLD pour quantifier les toxines T-2 et HT-2, l'extraction avec des solvants permet aussi d'extraire d'autres composants comme des protéines qui peuvent interférer dans la détermination en HPLC. Pour cette raison, une étape de purification en utilisant une colonne d'immuno-affinité est requise.

Dans notre travail, la matrice où se trouvent les toxines est le milieu de culture liquide Ym. Deux tests de quantification des toxines T-2/HT-2 avec et sans extraction ont été effectués. Pour l'extraction liquide des toxines, la sélection du solvant est réalisée en fonction de la solubilité de la toxine T-2 et de la miscibilité entre le solvant et le milieu de culture. La toxine T-2 est soluble dans les solvants polaires comme l'acétate d'éthyle, le chloroforme, l'acétone, etc. De ces solvants, l'acétate d'éthyle et le chloroforme sont non miscibles avec l'eau. Pour tester la validité de l'extraction, l'acétate d'éthyle a été choisi.

Après une culture de *F. langsethiae* 033 pendant 3 jours à 22°C et 200 rpm, le milieu de culture libre de cellules (centrifugation 5 100 rpm, 30 min et 4°C) est traité de deux manières : 10 mL de surnageant sont extraits avec 10 mL d'acétate d'éthyle, puis séchés (bain-Marie à sec à 50°C/air comprimé), dérivé et quantifié par HPLC-FLD. Un échantillon de 10 mL sans extraction est aussi séché, dérivé et passé à l'HPLC-FLD pour quantification.

Les résultats (Tableau 28) montrent que la concentration de la toxine T-2 déterminée par HPLC-FLD sans étape d'extraction est de 0,80 µg/mL, supérieure à la concentration quantifiée avec extraction (0,32 µg/mL). Cette réduction de concentration peut être compensée si l'étape d'extraction est répétée. En bilan, la quantification par HPLC-FLD de la toxine T-2 est optimisée sans extraction. Cette étape d'extraction est donc jugée inutile pour notre travail.

Tableau 28. Effet de l'extraction avant la quantification des toxines T-2/HT-2 en HPLC-FLD.

	AVEC EXTRACTION	SANS EXTRACTION
T-2 (µg/mL)	0,32	0,80

4.3 Conclusion.

Pour la quantification de la toxine T-2 présente dans le milieu de culture Ym après la croissance de *F. langsethiae* en utilisant l'HPLC-FLD, l'étape d'extraction avant la quantification cause une perte de la toxine T-2. Dans l'annexe 4 les problèmes de dissolution de la toxine T-2 dans le milieu de culture Ym sont détaillées et qui permettent de comprendre la difficulté de la validation de la méthodologie. La détermination de la concentration de la toxine T-2 produite pendant les cultures de *F. langsethiae* sera alors faite sans extraction.

5. Cultures pures.

5.1 Cultures pures de *F. langsethiae*.

Deux isolats de *F. langsethiae*, 033 et 035, ont été utilisés pour le déroulement des études d'interaction avec *G. candidum*. En effet, des pertes de production de la toxine T-2 par l'isolat 033, conservés en cryotube à -20°C, sont apparues au cours du temps (Annexe 1 et 3). Ainsi certaines expérimentations ont été effectuées avec l'isolat *F. langsethiae* 035.

5.1.1 *F. langsethiae* 033.

La croissance de *F. langsethiae* 033 pendant la culture en milieu liquide Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation) est surtout sous forme de filaments avec la présence de spores (Figure 15) et à cause de l'agitation orbitale *F. langsethiae* forme des pelotes. *F. langsethiae* 033 atteint une concentration en biomasse de $3,8 \pm 0,7$ g/L après 48 heures de culture (Figure 30) jusqu'à 120h. Le suivi de la consommation du glucose montre que plus de 90% du glucose est consommé pendant les 24 premières heures. En considérant la concentration de la biomasse à 4,0 g/L après 120h de culture et la concentration initiale du glucose à 4,6 g/L, on observe que la croissance de *F. langsethiae* se fait au moins partiellement sur un substrat carboné différent du glucose. Le suivi du pH montre que il y a une acidification de pH 7,0 à pH $5,8 \pm 0,5$ les premières 24 heures et après un basification du milieu jusqu'à pH $8,1 \pm 0,1$ après 120h de culture.

F. langsethiae 033

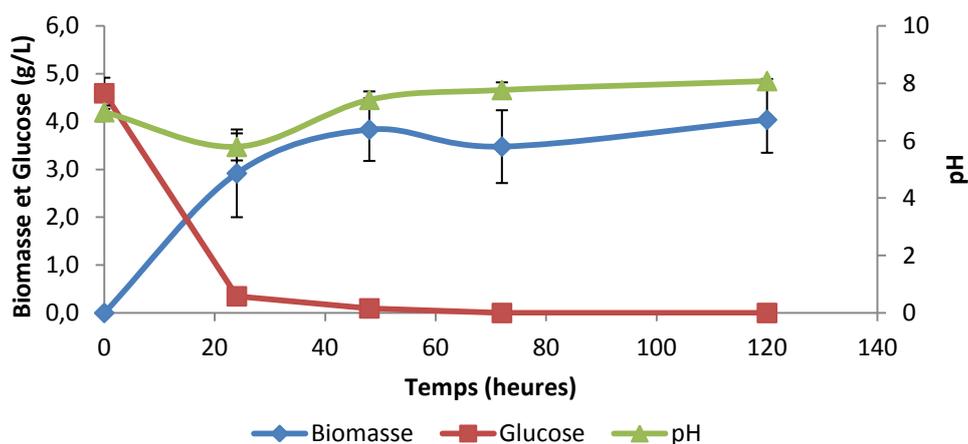


Figure 30. Croissance de *F. langsethiae* 033 en culture pure, suivi du pH et de la consommation du glucose dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).

5.1.2 *F. langsethiae* 035.

Pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 dans le milieu de culture Ym, le milieu de culture a pris une couleur violette claire après 24 heures et violette foncée après 48 heures (Figure 31), au contraire de l'isolat 033 pour laquelle le milieu a gardé sa couleur initiale jaune.



Figure 31. Coloration de milieu Ym pendant la croissance de *F. langsethiae* 035.

La croissance de *F. langsethiae* 035 dans le milieu de culture Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation) montre le même comportement cinétique (Figure 32) que l'isolat 033. *F. langsethiae* 035 présente une concentration maximale de biomasse de $3,5 \pm 0,2$ g/L après 48 heures d'inoculation et jusqu'à 96 heures. De la même manière, le suivi des valeurs de pH

pendant la croissance montre que le milieu est acidifié pendant les 24 premières heures à pH 6,0 puis une basification du milieu est observée jusqu'à pH 8,3 de 72 à 96 heures.

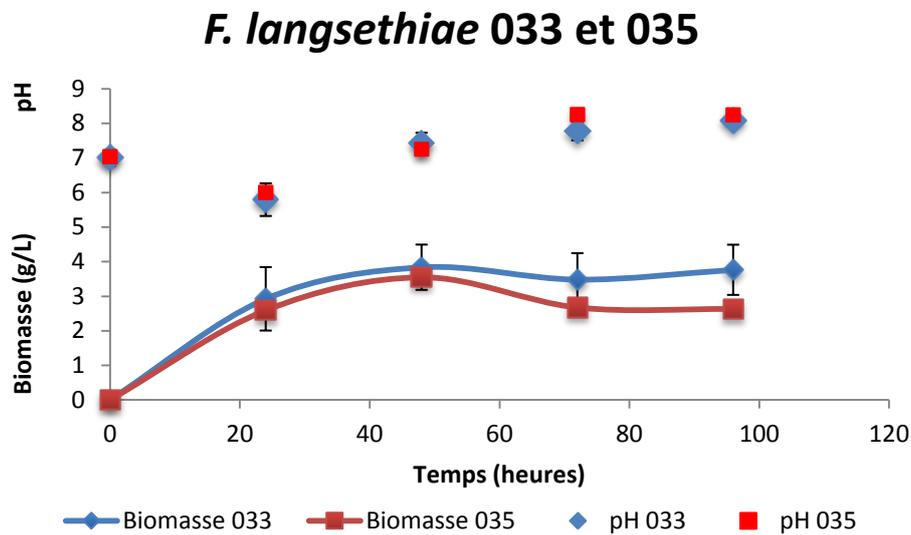


Figure 32. Comparaison de la croissance et pH de *F. langsethiae* 035 et 033 en culture pure dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).

5.2 Culture pure de *G. candidum*.

La croissance de la levure de malterie *G. candidum* dans le milieu de culture Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation) atteint une concentration maximale de biomasse de $2,4 \pm 0,5$ g/L après 24 heures de culture (Figure 33). La concentration de la biomasse quantifiée pendant la phase stationnaire est très stable. La consommation de glucose pendant la croissance de *G. candidum* montre qu'après 48 heures la concentration résiduelle de glucose est de $2,4 \pm 0,1$ g/L. Le suivi des valeurs de pH pendant le développement de *G. candidum* montre que le milieu est acidifié les 48 premières heures et après le pH du milieu augmente jusqu'à pH $7,2 \pm 0,4$ après 96 heures de culture.

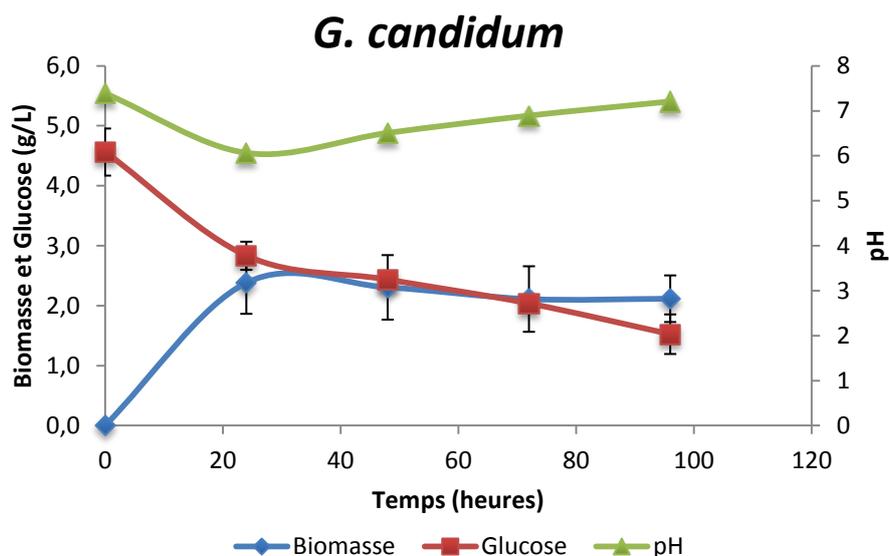


Figure 33. Croissance de *G. candidum* en culture pure, suivis de pH et de la consommation de glucose dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).

5.3 Comparaison des cultures pures de *F. langsethiae* et *G. candidum*.

Le milieu de culture Ym permet la croissance de *F. langsethiae* et *G. candidum* de manière équivalente. Le développement de *F. langsethiae* 033 et 035 pendant la croissance dans le milieu de culture liquide Ym se fait sous forme de filaments et grâce à l'agitation orbitale, la biomasse a formé de petites pelotes de différentes tailles. La croissance sous forme de pelotes peut expliquer la déviation standard un peu élevée sur les résultats de biomasse en grammes par litre. Après 48h de culture, la consommation du glucose est presque totale (Figure 30). Par contre, la croissance de *F. langsethiae* a duré jusqu'à 96h et 120h pour les isolats 035 et 033 respectivement (Figure 32). Ces résultats suggèrent que *F. langsethiae* utilise d'autres sources de carbone et d'énergie comme les composants présents dans la tryptone du milieu Ym. La croissance de *G. candidum* pendant la culture pure se fait aussi sous forme de filaments, par contre la formation de pelotes n'a pas été observée. *G. candidum* forme des cellules libres après que la phase stationnaire commence. Contrairement à *F. langsethiae*, une concentration résiduelle de glucose de $1,5 \pm 0,3$ g/L a été quantifiée après 96h de *G. candidum* en culture pure (Figure 33). Adour et al. (2002) ont étudié le catabolisme et la consommation d'acides aminés par *G. candidum* et *Penicillium camembertii* dans deux milieux de culture : le premier à base uniquement de peptones et le deuxième avec de l'acide lactique. Ils ont trouvé que *G. candidum* métabolise plus facilement les peptones

que *P. camembertii*, 79,9% et 64,4% respectivement. Cette préférence peut être expliquée parce que *G. candidum* est capable d'utiliser les acides aminés comme source de carbone et aussi d'énergie. De plus, ils ont trouvé que les peptones sont consommées de manière préférentielle par *G. candidum* même s'il y a d'autres sources d'énergie dans le milieu : 64,8% de peptones ont été consommées par *G. candidum* quand le milieu contenait de l'acide lactique et *P. camembertii* a consommé 44,9% des peptones. Des données sur la consommation de nutriments par *F. langsethiae* ne sont pas disponibles. Par contre, le comportement de *G. candidum* observé par Adour et al. (2002) est similaire au comportement observé dans notre travail.

Dans les cultures pures de ces deux micro-organismes, il y a une acidification du milieu de culture suivi d'une basification jusqu'à un pH de 8,0 pour *F. langsethiae* et proche de la neutralité pour *G. candidum*. Pendant la desamination des acides aminés, l'ammonium résiduel a un effet sur la basification du milieu. Adour et al. (2002) ont observé une augmentation du pH du milieu pendant la croissance de *G. candidum* et de *P. camembertii*, grâce à la consommation de la source de carbone (peptones). Cette augmentation du pH est simultanée à la croissance. Ils ont rapporté que le pH final de la culture de *G. candidum* s'est stabilisé à un pH de $7,1 \pm 0,1$ et de $8,4 \pm 0,1$ pour la croissance de *P. camembertii*. Dans notre travail, des valeurs similaires ont été obtenues, un pH de $7,2 \pm 0,3$ pour la culture de *G. candidum* (Figure 33) et un pH de $8,1 \pm 0,1$ pour *F. langsethiae* 033 et 035 (Figure 32). Ces résultats indiquent que *F. langsethiae* consomme le glucose au début de la croissance et d'autres sources (peptones) qu'il utilise comme sources d'énergie et carbone.

6. Interaction indirecte entre *F. langsethiae* et *G. candidum*.

Les cultures séquentielles sont utilisées dans le but d'évaluer l'interaction indirecte entre *F. langsethiae* et *G. candidum*. Tout d'abord, la croissance de *F. langsethiae* et la production la toxine T-2 sont évaluées dans un milieu pré-fermenté par *G. candidum* (MFG). Ensuite, la croissance de *G. candidum* est évaluée dans un milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* (MFF). Finalement les milieux pré-fermentés par ces 2 micro-organismes, MFG et MFF, sont mis en contact pour déterminer les effets de l'un sur l'autre.

6.1 Culture séquentielle : croissance de *F. langsethiae* 033 et 035 dans le milieu MFG.

6.1.1 Sélection du temps de culture (3, 5, 7 et 10 jours à 22°C) de *G. candidum* pour l'obtention du MFG : Effet sur la croissance de *F. langsethiae* 033 et 035 et la production de la toxine T-2.

Nous avons évalué l'effet du temps de culture de *G. candidum* dans le milieu MFG sur la croissance de *F. langsethiae* et sa capacité à produire la toxine T-2. Les temps de culture de *G. candidum* testés sont de 3, 5, 7 et 10 jours à 22° C. Nous obtenons ainsi respectivement les milieux pré-fermentés MFG-3j, MFG-5j, MFG-7j et MFG-10j. Ensuite, ces milieux pré-fermentés sont récupérés et complétés avec les nutriments du milieu Ym en poudre. *F. langsethiae* 033 est ensuite ensemencé dans ces différents milieux et sa croissance et la production de la toxine T-2 sont suivies dans ces milieux en utilisant comme témoin le milieu Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation) ensemencé par *F. langsethiae*.

6.1.1.1 Effet sur la concentration de la biomasse de *F. langsethiae* 033.

Dans ce test, l'ensemencement des cultures n'a pas été fait en même temps, c'est pour cette raison que la culture de *F. langsethiae* 033 pour chaque milieu MFG a une culture témoin Ym différente. Dans l'analyse des résultats, la croissance de *F. langsethiae* 033 dans le milieu témoin Ym est considérée comme la moyenne de tous les témoins. La Figure 34

montre la croissance de *F. langsethiae* 033 dans les milieux de culture témoin Ym, MFG-3j, MFG-5j, MFG-7j et MFG-10j. La croissance de *F. langsethiae* dans les milieux MFG-5j et MFG-7j est beaucoup plus élevée que dans le milieu témoin Ym.

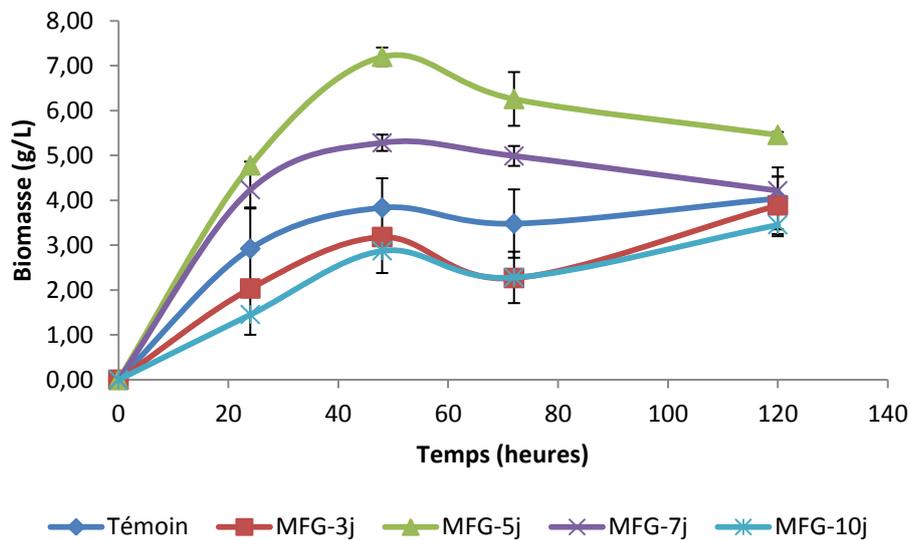


Figure 34. Croissance de *F. langsethiae* 033 sur le milieu de culture MFG à différents temps de pré-fermentation (3, 5, 7 et 10 jours) de *G. candidum*. La croissance témoin de *F. langsethiae* est obtenue sur Ym.

Le suivi du glucose pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 sur ces différents milieux montre que les concentrations initiales dans les milieux pré-fermentés par *G. candidum* sont différentes (Tableau 29). Les concentrations initiales de glucose dans les milieux MFG-3j et MFG-5j sont de $6,2 \pm 0,4$ et $6,6 \pm 0,1$ g/L respectivement et dans les milieux MFG-7j et MFG-10j de $3,9 \pm 0,2$ et $3,6 \pm 0,2$ g/L respectivement. La forte concentration initiale en glucose du milieu MFG-5j peut expliquer la concentration de biomasse maximale de $7,2 \pm 0,2$ g/L trouvée après 48 heures de culture de *F. langsethiae* 033. Par contre, la croissance de *F. langsethiae* 033 dans le milieu MFG-3j avec une concentration initiale de glucose de $6,2 \pm 0,34$ g/L a donné une concentration de biomasse après 48h de $3,180 \pm 0,087$ g/L équivalente à celle obtenue dans le témoin de $3,8 \pm 0,7$ g/L. En plus, la biomasse quantifiée de *F. langsethiae* 033 après 48h dans le milieu MFG-7j de $5,3 \pm 0,2$ g/L n'a pas de relation avec la concentration initiale de glucose de $3,9 \pm 0,2$ g/L.

Tableau 29. Concentrations de glucose (g/L) pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 dans les milieux MFG-3j, MFG-5j, MFG-7j et MFG-10j (22° C, 200 rpm, 10% inoculation). Le milieu Témoin est le milieu Ym.

Concentration de glucose (g/L) pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033					
Temps (heures)	Témoin	MFG-3j	MFG-5j	MFG-7j	MFG-10j
0	4,6 ± 0,3	6,2 ± 0,4	6,6 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,6 ± 0,2
24	0,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,4
48	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
72	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
120	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Tableau 30. Valeurs de pH pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 dans les milieux pré-fermentés MFG-3j, MFG-5j, MFG-7j et MFG-10j (22°, 200 rpm, 10% inoculation). Le milieu Témoin est le milieu Ym.

Valeurs de pH pendant la croissance de <i>F. langsethiae</i> 033					
	Témoin	MFG-3j	MFG-5j	MFG-7j	MFG-10j
0	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,3	7,3 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,0 ± 0,1
24	5,8 ± 0,5	6,1 ± 0,3	6,3 ± 0,0	6,5 ± 0,0	6,3 ± 0,3
48	7,4 ± 0,3	7,2 ± 0,1	7,6 ± 0,0	7,7 ± 0,1	7,1 ± 0,2
72	7,8 ± 0,3	7,5 ± 0,3	8,1 ± 0,1	8,1 ± 0,0	7,7 ± 0,1
120	8,1 ± 0,1	8,3 ± 0,1	8,4 ± 0,0	8,2 ± 0,1	8,3 ± 0,1

Après 48h d'incubation, *F. langsethiae* 033 a pratiquement consommé la totalité du glucose présent dans le milieu MFG complémenté avec les nutriments en poudre du milieu Ym. Dans le milieu témoin Ym, après 48h *F. langsethiae* 033 a consommé plus de 97% du glucose et dans les milieux MFG-3j plus de 93% et la totalité pour les autres MFG-5j, MFG-7j et MFG-10j. Selon Adour et al. (2002), le pH du milieu augmente grâce à la libération d'ammonium pendant la desamination des acides aminées. Pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 dans les différents milieux de culture pré-fermentés par *G. candidum*, le suivi

du pH a été fait et dans tous les cas, le même phénomène s'est présenté : une acidification du milieu après 24 heures de culture suivie par une basification avec des valeurs de pH de 8,0 (Tableau 30). Cela confirme que *F. langsethiae* utilise le glucose sur les premières heures de culture et donc acidifie le milieu et ensuite il utilise d'autres nutriments comme source de carbone et d'énergie, ce qui conduit à une basification du milieu.

En considérant uniquement la concentration de glucose comme source de carbone, c'est possible d'estimer le rendement $Y_{x/s}$ de *F. langsethiae* 033 après 48h de culture dans les différents milieux testés. Dans le milieu témoin Ym le rendement est de $0,83 \pm 0,4$ g/g et de $0,55 \pm 0,3$ g/g pour le MFG-3j, de $1,09 \pm 0,2$ g/g pour le MFG-5j, de $1,36 \pm 0,2$ g/g pour le MFG-7j et de $0,81 \pm 0,3$ pour le milieu MFG-10j. Ces résultats nous permettent de tirer deux informations : que le milieu de culture pré-fermenté par *G. candidum*, MFG n'a pas montré une activité inhibitrice sur la croissance de *F. langsethiae* 033 et que *F. langsethiae* 033/035 utilise des autres sources de carbone et d'énergie pour se développer jusqu'à 120 heures de culture.

Pour évaluer l'effet du milieu MFG sur la concentration de la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 033/035, un temps de culture de 3 jours de *G. candidum* a été choisi.

6.1.1.2 Effet sur la concentration de la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 033.

Dans le but d'évaluer si *G. candidum* a un effet sur la concentration de la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 033, la quantification de la toxine T-2 a été faite pendant la culture de *F. langsethiae* 033 dans le milieu MFG (3 jours de culture de *G. candidum*) et a été comparée avec la concentration de toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 033 dans le milieu témoin Ym (22° C, 200 rpm, 10% inoculation)

La croissance de *F. langsethiae* 033 n'a pas été affectée par le milieu MFG, comme observée précédemment. La croissance de *F. langsethiae* 033 est même un peu supérieure dans le milieu pré-fermenté par rapport à celle obtenue dans le milieu témoin Ym (Figure 35). La concentration de la biomasse de *F. langsethiae* 033 après 24h dans le milieu témoin Ym est de $3,5 \pm 1,2$ g/L contre $4,5 \pm 0,4$ g/L dans le milieu MFG. Cela peut être dû à la présence de nutriments non consommés par *G. candidum* pendant sa croissance pour l'obtention du milieu MFG.

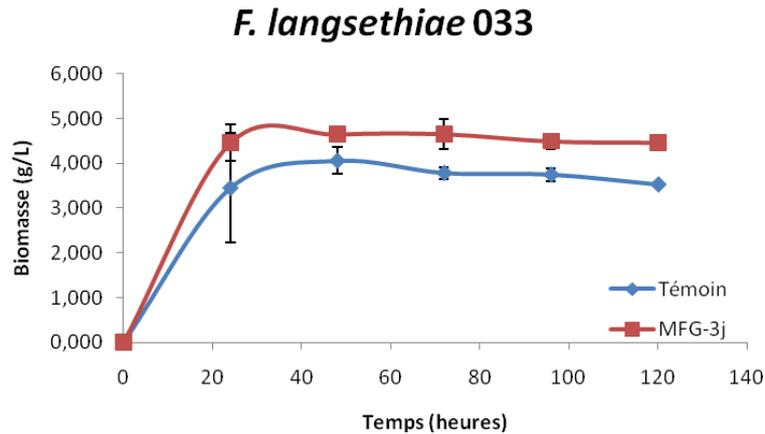


Figure 35. Croissance de *F. langsethiae* 033 dans le milieu MFG-3j et Ym (témoin).

Par contre, la concentration de la toxine T-2 est affectée pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 dans le milieu MFG-3j (

Figure 36). En effet, la concentration maximale de la toxine T-2 dans le milieu MFG-3j est de $0,04 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ après 48h et de $0,06 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ après 72h. Dans le milieu Ym, une concentration de la toxine de $0,8 \pm 0,5$ à $1,0 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ est observée entre 48 et 96 heures de culture. Ainsi, pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 dans le milieu MFG-3j, la concentration de la toxine T-2 est réduite de 93% par rapport à la concentration de la toxine T-2 dans le milieu témoin Ym aux mêmes temps d'incubation.

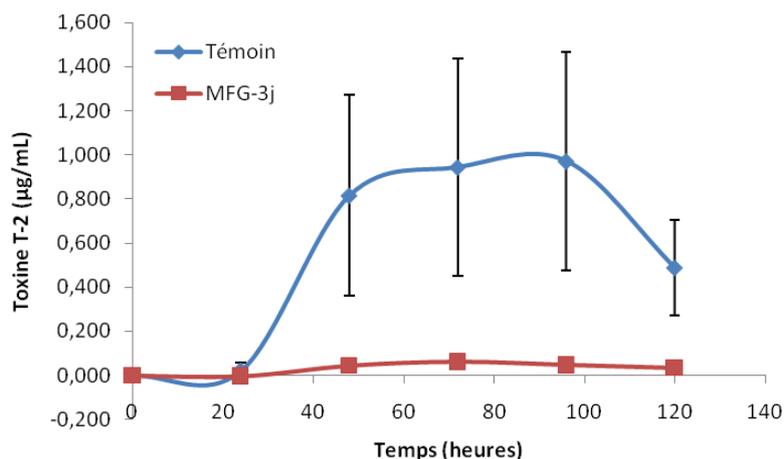


Figure 36. Effet du milieu MFG-3j sur la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 (Témoin : milieu Ym).

Ces résultats nous permettent de proposer deux hypothèses : soit la toxine T-2 n'est pas produite pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 dans le milieu pré-fermenté par *G. candidum* MFG-3j, soit la toxine T-2 est dégradée au fur et à mesure de sa production par la présence d'un métabolite excrété par *G. candidum* et présent dans le milieu MFG-3j.

6.1.1.3 Effet sur la concentration de la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 035.

La croissance de *F. langsethiae* 035 et la production de la toxine T-2 ont aussi été évaluées dans le milieu MFG-3j (22° C, 200 rpm, 10% inoculum).

La Figure 37 montre la croissance de *F. langsethiae* 035 dans les milieux témoin Ym et MFG-3j. Il est possible d'observer que la croissance dans le milieu Ym est favorisée sur les 48 premières heures par rapport au milieu pré-fermenté par *G. candidum*. La concentration maximale de la biomasse de $3,6 \pm 0,1$ g/L est obtenue après 48 heures dans le milieu témoin Ym contre 25% de moins dans le milieu MFG-3j, soit $2,7 \pm 0,3$ g/L. La vitesse moyenne de croissance est aussi affectée. Dans le milieu Ym à 24h, elle est le double ($0,10 \pm 0,01$ g/L-h) de celle obtenue dans le milieu MFG-3j à 48h ($0,05 \pm 0,01$ g/L-h).

De la même manière que l'isolat 033, la concentration de la toxine T-2 a été affectée par la composition du milieu pré-fermenté de *G. candidum* (Figure 38). La concentration de la toxine T-2 dans le milieu témoin Ym est de $4,01 \pm 0,82$ µg/mL à 24h, $5,62 \pm 0,58$ µg/mL à 48h et $4,81 \pm 0,90$ µg/mL à 72h de culture de *F. langsethiae* 035. Par contre, dans le milieu MFG-3j les concentrations de la toxine T-2 sont entre $0,16 \pm 0,14$ µg/mL à 24h et $0,14 \pm 0,11$ µg/mL à 96h. La composition du milieu pré-fermenté par *G. candidum* a eu pour effet la réduction de la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 de 97%.

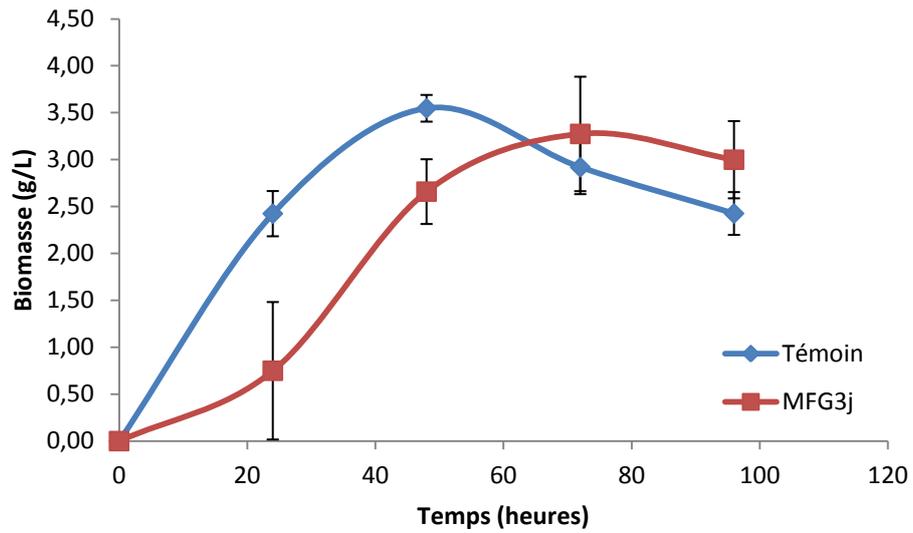


Figure 37. Croissance de *F. langsethiae* 035 dans le milieu Témoin Ym et MFG-3j (22°C, 200 rpm, 10% inoculation).

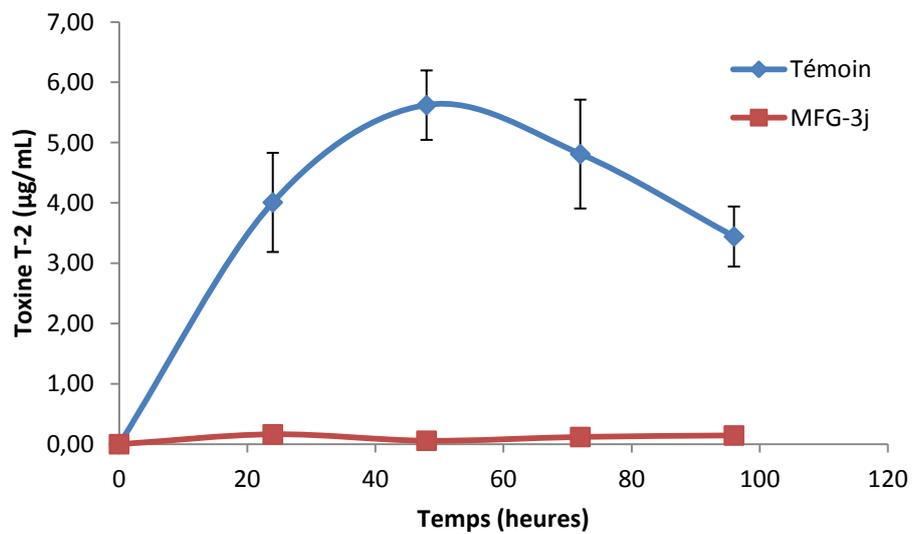


Figure 38. Effet du milieu MFG-3j sur la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 (Témoin : milieu Ym).

6.1.2 Effet de la température (30°C) et du temps de culture (1 et 3 jours) de *G. candidum* sur la qualité du milieu MFG.

Les effets de la température d'incubation de *G. candidum* (30°C à la place de 22°C) et du temps de culture (1 ou 3 jours) ont été testés pour la préparation du milieu MFG. Après 1 et 3 jours de culture sur Ym à 30°C et 200 rpm, la croissance de *G. candidum* est plus faible que celle obtenue à 22°C. Ainsi, la concentration de la biomasse après 1 jour est de $1,12 \pm 0,08$ g/L et après 3 jours elle est de $1,11 \pm 0,07$ g/L. Ces concentrations sont 50% inférieures à celles obtenues à 22°C après 1 et 3 jours de culture soit $2,38 \pm 0,52$ et $2,11 \pm 0,55$ g/L respectivement (Figure 33).

Malgré la faible croissance de *G. candidum*, les milieux pré-fermentés à 30°C après 1 et 3 jours (MFG-1j30°C et MFG-3j30°C) ont été ensemencés avec *F. langsethiae* afin d'évaluer leur effet sur la croissance de *F. langsethiae* 033 et la production de la toxine T-2. La Figure 39 montre que la croissance de *F. langsethiae* 033 n'a pas été affectée par la composition des milieux MFG-1j30°C et MFG-3j30°C. De la même manière que les milieux pré-fermentés à 22°C, la croissance de *F. langsethiae* 033 est supérieure par rapport celle dans le milieu témoin Ym.

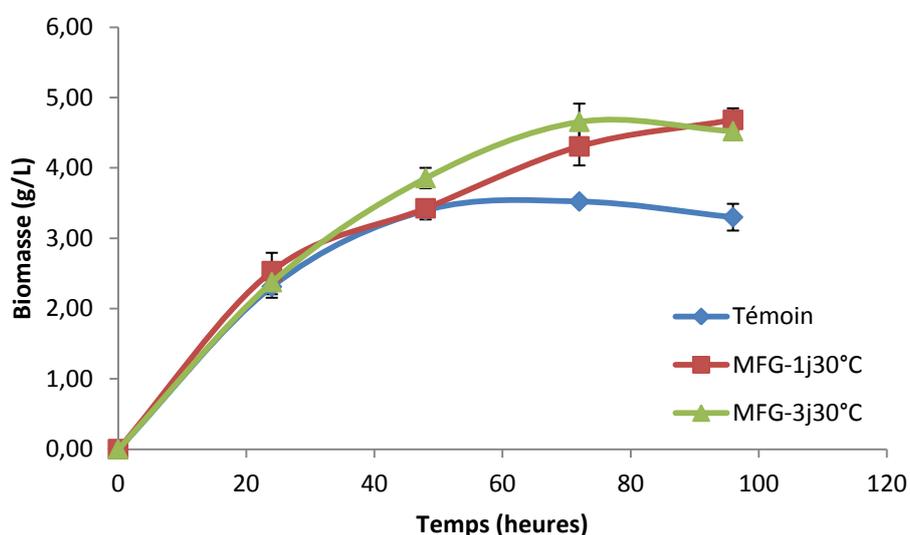


Figure 39. Croissance de *F. langsethiae* 033 dans les milieux Témoin Ym (22°C, 200 rpm, 10% inoculation), MFG-1j30°C et MFG-3j30°C

Dans la Figure 40 on observe que la concentration de la toxine T-2 détectée dans le milieu MFG-1j30°C et MFG-3j30°C est inférieure à la concentration obtenue dans le milieu témoin Ym. Pour cette expérience, la concentration de la toxine T-2 dans le milieu témoin est très faible (entre 0,02 et 0,04 ± 0,01 µg/mL). Ceci est du à la perte de la capacité de production de l'isolat *F. langsethiae* 033 à la suite de son stockage à -20 °C en cryotube (Annexe 1). Malgré ces très faibles concentrations en toxine T-2, il est possible d'observer que la concentration de la toxine T-2 dans le milieu pré-fermenté est 90% inférieure à celle dans le témoin. La concentration maximale de la toxine T-2 dans le milieu MFG-1j30°C est de 0,004 ± 0,01 µg/mL après 96h et de 0,003 ± 0,002 µg/mL dans le MFG-3j30°C.

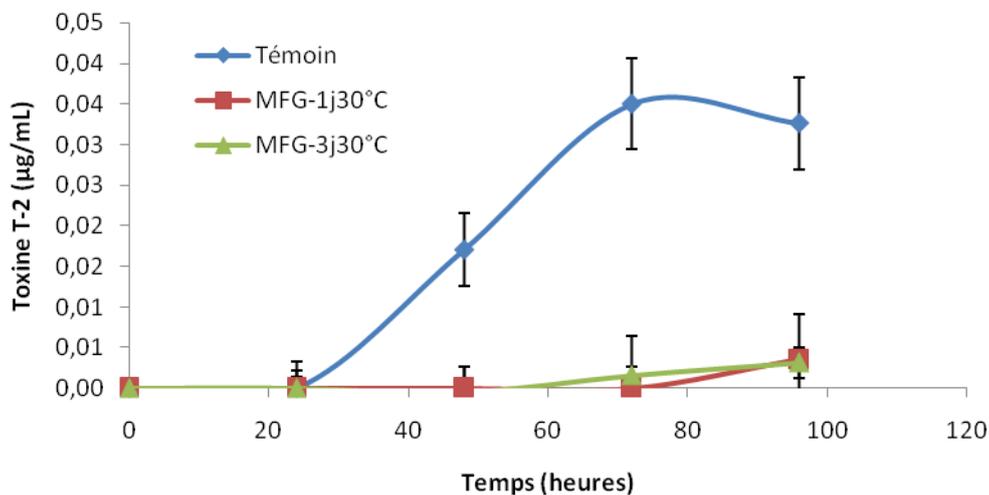


Figure 40. Effet du milieu MFG-1j30°C et MFG-3j30°C sur la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 033.

Le changement de la température de 22°C à 30°C pour la croissance de *G. candidum* pour l'obtention du milieu MFG avait pour objectif de voir si le changement de température d'incubation permettrait une meilleure production de l'agent actif. Le milieu MFG ainsi obtenu n'a pas montré de différence sur la réduction de la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 033. *G. candidum* se développe même mieux à 22°C qu'à 30°C. Ainsi, il apparaît que l'augmentation de la température n'a eu aucun effet pour augmenter l'activité ou la possible concentration de l'agent. Pour cette raison, la température de culture de *G. candidum* pour l'obtention du milieu MFG reste pour la suite de 22°C.

6.2 Culture séquentielle : croissance de *G. candidum* dans le MFF.

Pour compléter l'étude de l'interaction indirecte, *G. candidum* a été ensemencé dans un milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* (MFF) qui contient de la toxine T-2. Le but de ce test est d'évaluer la capacité de *G. candidum* à se développer en présence de la toxine T-2 et de savoir si *G. candidum* peut dégrader la toxine T-2 déjà présente dans un milieu.

La Figure 41 montre la croissance de *G. candidum* dans le milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* 035 et le milieu témoin Ym. La biomasse de *G. candidum* est légèrement supérieure dans le milieu MFF par rapport au milieu témoin Ym quel que soit le temps d'incubation. Cependant la différence n'est pas significative. Dans les deux milieux, la concentration maximale de biomasse est obtenue après 24 heures de culture avec $2,4 \pm 0,5$ g/L dans le milieu Ym et $3,1 \pm 0,7$ g/L dans le milieu MFF.

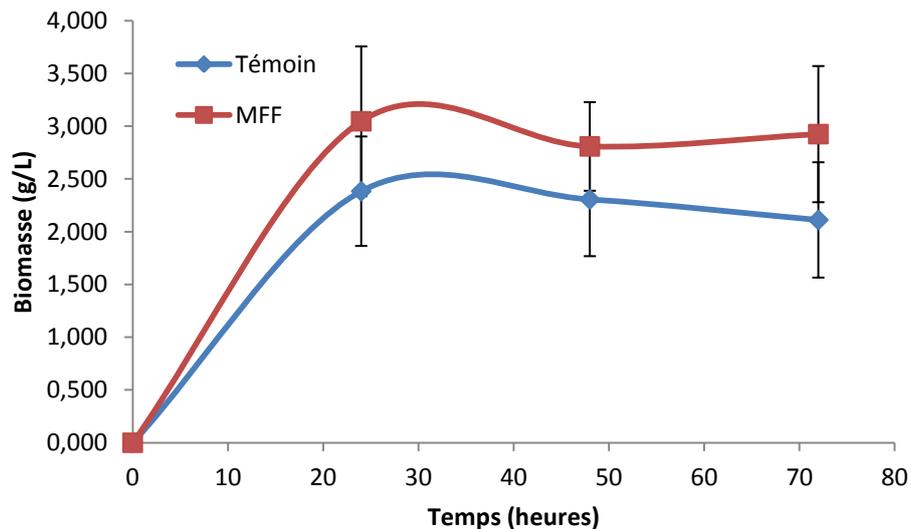


Figure 41. Croissance de *G. candidum* dans les milieux Ym et MFF à 22° C, 200 rpm et 10% inoculation (Le milieu MFF est obtenu après 3 jours de culture dans le milieu Ym, 22° C, 200 rpm et 10% inoculation).

Dans cet essai nous avons observé que la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 035 et initialement présente dans le milieu MFF à une concentration d'environ 1 µg/mL reste constante pendant la croissance de *G. candidum* (Figure 42). La concentration de la toxine T-2 est en effet de $1,05 \pm 0,2$ au temps zéro et de $1,21 \pm 0,2$ µg/mL après 72 heures de culture.

G. candidum peut ainsi se développer dans le milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* 035 en présence de la toxine T-2 et ne dégrade pas la toxine déjà présente dans le milieu. Un milieu MFF sans êtreensemencé avec *G. candidum* sert de témoin et permet de dire que la toxine T-2 n'est pas dégradée naturellement dans le temps dans le milieu MFF.

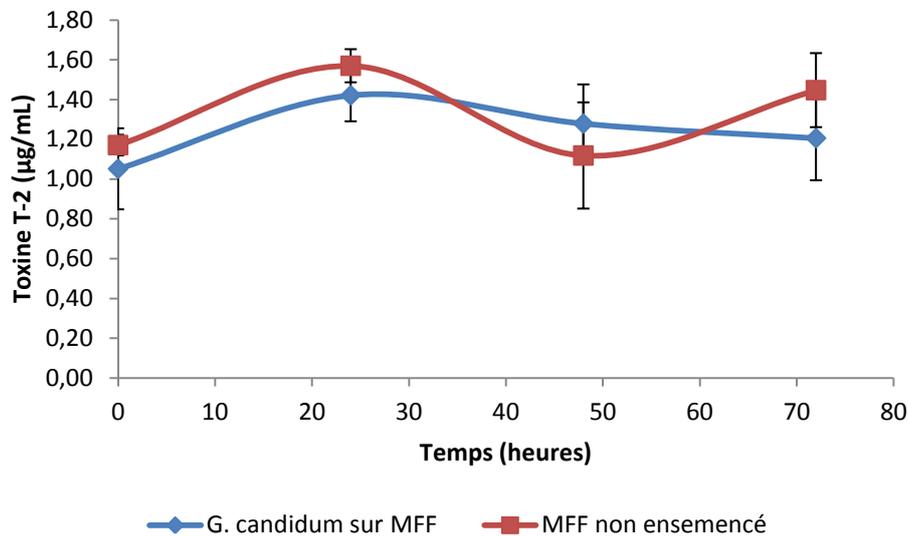


Figure 42. Suivi de la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *G. candidum* dans le milieu MFF (MFF+ Géo, 22° C, 200 rpm, 10% inoculation). Le milieu MFF est un milieu pré-fermenté par *F.langsethiae* nonensemencé par *G. candidum* servant de témoin (22°C, 200rpm).

Ces résultats nous permettent de suggérer que la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 035 dans le milieu MFF n'est pas dégradée par *G. candidum* pendant sa croissance. .

6.3 Interaction de MFG et MFF.

Finalement, nous avons évalué l'interaction entre le milieu pré-fermenté par *G. candidum* (MFG) et le milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* 035 (MFF).

Un volume de 50 mL de chacun des 2 milieux pré-fermentés libres de cellules, sont mis en contact dans des Erlenmeyers de 500 mL de manière stérile pendant 72 heures à 22° C et 200 rpm. Le suivi de la concentration de la toxine T-2 est fait chaque 24 heures. La

concentration de la toxine T-2 quantifiée au temps zéro est de $0,33 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ et après 72 heures de $0,51 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ (Tableau 31).

Tableau 31. Effet du mélange des milieux MFG et MFF sur la concentration de la toxine T-2, en fonction du temps de contact (22°C, 200 rpm).

MFG + MFF	
Temps (heures)	T-2 quantifié ($\mu\text{g/mL}$)
0	$0,33 \pm 0,11$
24	$0,51 \pm 0,17$
48	$0,56 \pm 0,11$
72	$0,51 \pm 0,02$

La concentration de la toxine T-2 présente dans le milieu MFF n'a pas changé avec le contact avec le milieu MFG, on peut dire donc que la concentration en T-2 est stable.

6.4 Conclusion de l'interaction indirecte.

Pendant la croissance de *F. langsethiae* dans le milieu pré-fermenté par *G. candidum*, la concentration de la toxine T-2 est réduite de plus de 95%. Le développement de *F. langsethiae* n'a pas été affecté par la composition du milieu MFG. En plus, *F. langsethiae* s'est mieux développé dans le milieu MFG que dans le milieu témoin Ym. Ce type de culture séquentielle nous permet de confirmer que la production de la toxine T-2 lors de la croissance de *F. langsethiae* est inhibée par un agent produit dans le milieu de culture lors de la croissance préalable de *G. candidum*.

Dans le milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* etensemencé avec *G. candidum*, la croissance de *G. candidum* n'a pas été affectée par la présence de la toxine T-2 dans le milieu MFF. La concentration initiale (environ $1 \mu\text{g/mL}$) de la toxine T-2 n'empêche pas la croissance de la levure. De plus, la concentration en toxine T-2 n'a pas diminué pendant toute la culture. Les résultats obtenus suggèrent que la toxine T-2 n'est pas dégradée par *G. candidum*.

Lors de l'interaction entre les milieux MFF et MFG, il n'y a aucun effet sur la concentration de la toxine T-2 pendant toute la durée du test.

D'après les résultats d'interaction indirecte, on peut faire l'hypothèse que l'action de *G. candidum* sur la toxine T-2 doit se faire pendant la croissance de *F. langsethiae*.

7. Interaction directe.

Afin de mieux comprendre les effets potentiels de l'un sur l'autre en interaction directe, *F. langsethiae* et *G. candidum* ont été mis en contact direct soit en milieu solide dans des boîtes de Pétri, soit en milieu liquide à l'aide des outils comme le BRM ou la co-culture.

7.1 En boîte de Pétri : milieu Ym.

La croissance de *F. langsethiae* 035 et de *G. candidum* est évaluée en boîte de Pétri dans le but de mettre en évidence le type d'interaction entre ces deux micro-organismes sur un milieu solide Ym. Après une pré-culture, 10 et 20 μ L de chaque culture sont inoculés à 5 cm de distance dans une boîte de Pétri contenant 20 mL de milieu Ym + 20 g/L d'agar bactériologique (FISHER). *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* sont incubés à 22° C pendant 12 jours.

La Figure 43 montre la croissance de *F. langsethiae* 035 et de *G. candidum* après 12 jours à 22° C. Sur la photo, il est possible d'observer que la croissance de *G. candidum* (à gauche de la boîte) n'empêche pas la croissance de *F. langsethiae* 035 (à droite de la boîte) et vice versa. Au point de contact entre les 2 micro-organismes (centre de la boîte), la morphologie de *F. langsethiae* 035 change : il y a sporulation (Figure 44). Dans les boîtes, les deux micro-organismes se sont bien développés, chacun de son côté. Nous n'avons pas observé de zone d'inhibition dans les points d'interactions. Nous pouvons dire que pendant leur développement en boîte de Pétri, il y a qu'une compétition spatiale et éventuellement pour les nutriments.



Figure 43. Interaction directe entre *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* en boîte de Pétri (Milieu Ym, 12 jours, 22° C, 10 μ L d'inoculation).

7.2 Bioréacteur à membrane (BRM).

7.2.1 Tests préliminaires de colmatage en filtration frontale sur les milieux présélectionnés.

Dans le but d'utiliser le BRM, différents tests de filtration frontale sont réalisés pour déterminer quel milieu (avec et sans micro-organismes) colmate le moins possible la membrane. Les tests de colmatage sont réalisés à l'aide d'un équipement de filtration sur pression du type Sartorius (Figure 44). 50 mL de milieu de culture sans et avec *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* sont filtrés sous pression à travers une membrane d'acétate de cellulose (0,47mm de diamètre, surface de filtration de 0,17cm² et taille de pores de 0.2 μ m). Il est ainsi possible de déterminer la résistance spécifique du gâteau.

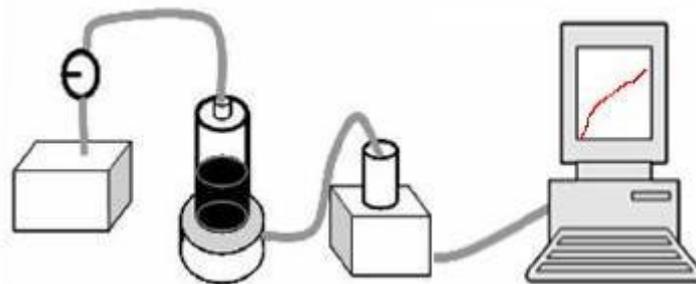


Figure 44. Schéma représentatif de l'équipement de filtration frontale utilisé (Sartorius).

La filtration est une technique utilisée pour séparer les particules solides des produits liquides chargés par passage à travers une membrane. La filtration frontale consiste à faire

passer le fluide à filtrer perpendiculairement à la surface du filtre. Au bout d'un moment l'accumulation des particules à la surface du filtre colmate le filtre. Pour cette raison il est nécessaire de faire quelques estimations pour éviter le plus possible le colmatage.

Les équations utilisées pendant les tests de filtration frontale, EC1 et EC2, nous permettent de connaître la résistance spécifique de gâteau (K_2 et K_3) et du support ($1/q_0$). Où K_2 est affectée directement par le temps de filtration (t) et K_3 par le volume filtré (v).

$$- \quad - \quad (EC. 1)$$

$$- \quad - \quad (EC. 2)$$

En représentant graphiquement t/v en fonction de v , il est possible de déterminer le volume de filtrat et le temps de filtration. Si le débit (q_0) au temps zéro est aussi zéro, alors $1/q_0$ est vers l'infinite (EC.3) et l'équation EC. 2 se réduit à l'équation EC. 4.

$$- \quad - \quad (EC. 3)$$

$$- \quad (EC. 4)$$

Donc, la résistance spécifique du gâteau est proportionnelle au temps et au volume de filtration (EC. 5).

$$- \quad - \quad (EC. 5)$$

Il est possible de connaître K_3 par la détermination de la pente (EC. 6 et Figure 45)

$$- \quad (EC. 6)$$

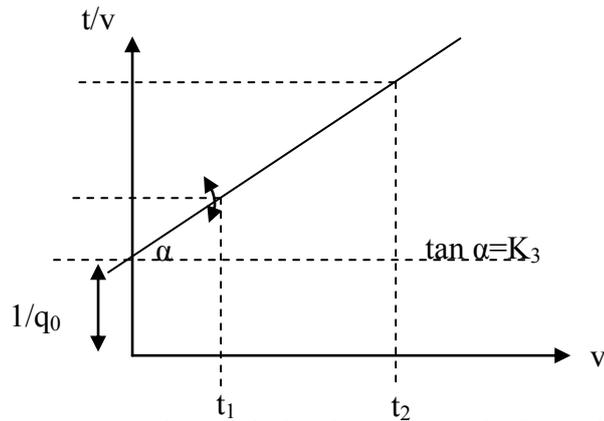


Figure 45. Détermination graphique de la résistance spécifique du gâteau K_3 .

En considérant l'équation EC2, il est possible de déterminer le volume maximal de filtration (EC. 9). Si le temps de filtration tend à l'infini, alors le volume de filtration est lié de manière inverse à la résistance du gâteau.

$$- \quad - \quad (EC. 1)$$

$$- \quad - \quad (EC.7)$$

$$- \quad - \quad (EC. 8)$$

$$- \quad - \quad (EC. 9)$$

Les conditions de culture de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* dans les différents milieux testés sont : 22° C, 200 rpm et 7 jours de culture, inoculation 10%. Le milieu à base d'orge MGO a été préparé avec une concentration de 200 g/L de grains d'orge avec une infusion pendant 45 min et une dilution finale pour avoir une concentration finale de 25 g/L.

Des valeurs de K_3 entre 10^{12} - 10^{14} correspondent à un colmatage de la membrane (valeurs établies pour l'opération du BRM). Ainsi toutes les valeurs de K_3 inférieures sont considérées comme des conditions dans lesquelles le fonctionnement du BRM ne serait pas limité à cause du colmatage de la membrane. Dans le Tableau 32, les résultats de K_3 sont présentés par type de milieu analysé : milieu d'extrait de malt (MEM 5, 10 et 20 g/L), à base

de grains d'orge infusés (MGOx 25 et 200 g/L) additionné de 1 g/L d'extrait de levure et le milieu YEPD. Tous les milieux sans et avec *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* après 7 jours de culture sont filtrés.

Tableau 32. Valeurs de K_3 ($s/m^3/m^3$) déterminées après filtration frontale des milieux de culture.

Milieu	Concentration (g/L)	Milieu seul	Avec <i>G. candidum</i>	Avec <i>F. langsethiae</i> 033
MEM	5	$2,74 \times 10^7$	$1,07 \times 10^9$	$7,09 \times 10^9$
	10	$2,11 \times 10^6$	$7,42 \times 10^9$	$1,72 \times 10^9$
	20	$7,98 \times 10^8$	$1,07 \times 10^{13}$	$9,12 \times 10^9$
MGOx	25	$6,96 \times 10^{11}$	$1,80 \times 10^{12}$	$4,70 \times 10^{11}$
	200	$7,09 \times 10^{12}$	$7,19 \times 10^{12}$	$1,05 \times 10^{13}$
YEPD		nd	$1,21 \times 10^{11}$	$1,10 \times 10^{13}$

nd: non déterminé

Le milieu MEM à 5 g/L présente des valeurs de K_3 entre 10^7 et 10^{10} , valeurs inférieures à 10^{12} . Dans la Figure 46a, la représentation de t/v contre v indique que le milieu ne colmate pas la membrane (ligne bleue), la présence de *G. candidum* (ligne rose) et de *F. langsethiae* 033 (ligne jaune) incrémentent les valeurs de K_3 au cours du temps mais elles restent en dessous des valeurs limites. Le milieu MEM à 10 g/L a aussi donné des valeurs de K_3 inférieures à 10^{12} , et le comportement cinétique de la filtration (Figure 46b) est similaire à celui de la concentration à 5 g/L. La valeur de K_3 du milieu MEM à 20 g/L en présence de *F. langsethiae* 033 est supérieure à la limite, $1,07 \times 10^{13}$. Cette valeur est dans la zone estimée de colmatage. Dans la Figure 46c, il est possible d'observer le changement de comportement des valeurs de filtration.

Les valeurs de K_3 obtenues en filtrant le milieu à base de grains d'orge infusés additionné de 1g/L d'extrait de levure (MGOx) à 25 g/L et le milieu avec *F. langsethiae* 033 se trouvent en dessous de la limite de colmatage, soit $6,96 \times 10^{11}$ et $4,70 \times 10^{11}$ respectivement. Par contre, la valeur de K_3 du milieu MGOx à 25 g/L avec *G. candidum*, est dans la zone de colmatage, $1,80 \times 10^{12}$. La Figure 46d montre le même comportement de filtration sur la Figure 46c qui conduit finalement au colmatage de la membrane. La filtration du milieu MGOx à

200 g/L ensemencé avec *G. candidum* et *F. langsethiae* 033 présente des valeurs de K_3 entre 10^{12} et 10^{13} . Toutes ces valeurs sont considérées comme des valeurs colmatantes. Dans la Figure 46e il est possible d'observer que le temps de filtration de ce milieu est supérieur aux autres. Le milieu seul MGOx (200 g/L) colmate déjà la membrane en filtration frontale sans ajout des micro-organismes. Dans les autres cas, l'addition des micro-organismes conduit au colmatage de la membrane sauf lors qu'il n'y a pas de croissance (Tableau 32). L'utilisation de ce milieu n'est donc pas recommandée en BRM.

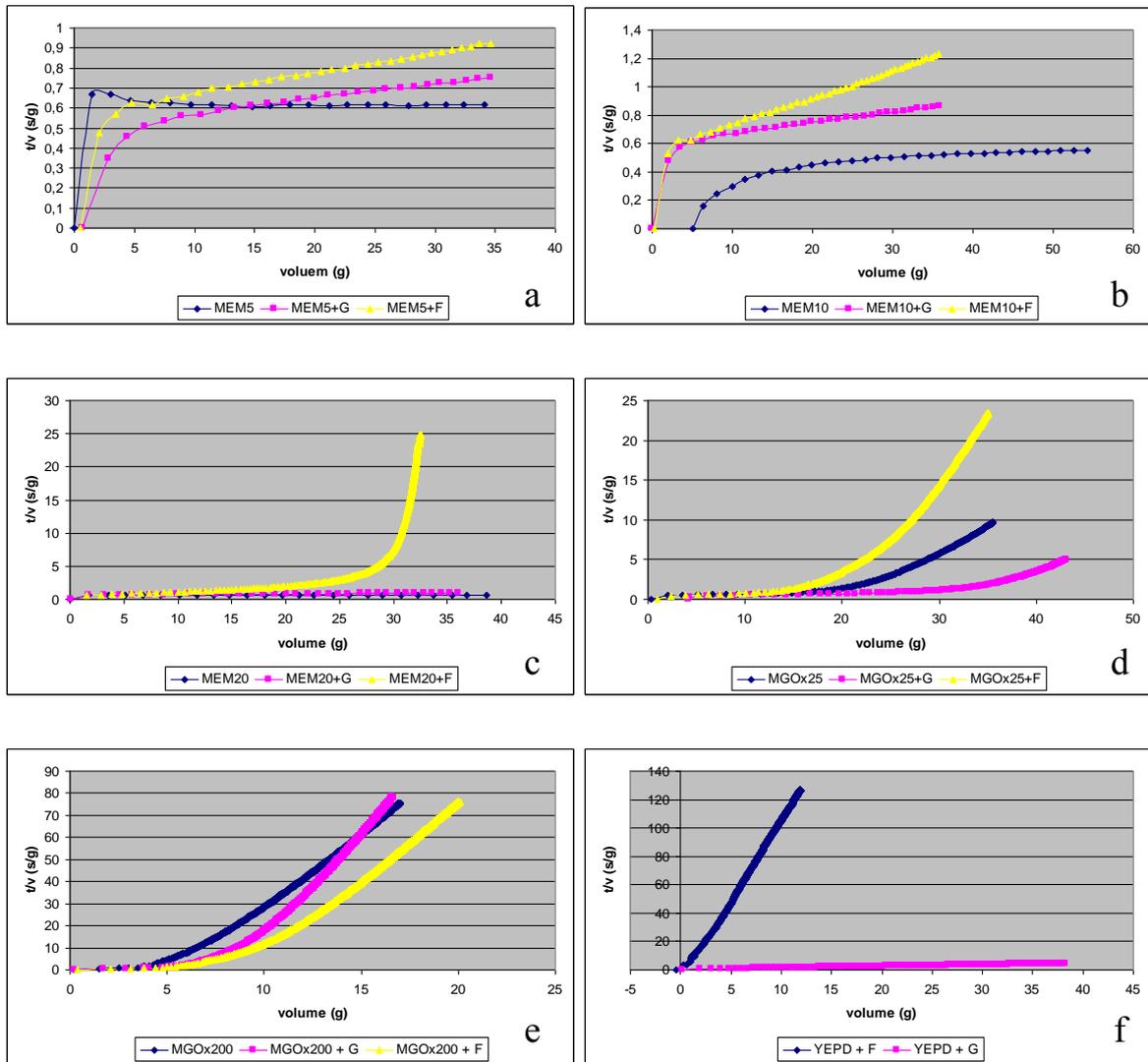


Figure 46. Effet de différents milieux sans et avec *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* sur le temps et le volume de filtration en filtration frontale.

Dans la préparation du milieu MGO, la filtration avant autoclavage et l'inoculation n'ont pas été réalisées, par conséquent la présence de particules libres de grains d'orge a contribué seule au colmatage de la membrane dans ce test.

Les tests réalisés avec le milieu YEPD en présence de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* montrent des valeurs complètement différentes. D'après la valeur de K_3 de 1.10×10^{13} , la présence de *F. langsethiae* 033 colmate plus vite la membrane que la présence de *G. candidum* ($1,21 \times 10^{11}$). Dans la Figure 46f, il est possible d'observer que le temps de filtration du milieu avec *F. langsethiae* 033 est supérieur au temps de filtration en présence de *G. candidum*.

Ce test nous a permis de montrer que tous les milieux sont colmatants après croissance des micro-organismes à l'exception du MEM qui n'avait d'ailleurs pas donné de résultats satisfaisants par rapport à la croissance des 2 micro-organismes. De plus, lors de l'utilisation du BRM, il est possible que se produisent des problèmes de colmatage de la membrane liés à la croissance de nos micro-organismes sous forme de filaments.

7.2.2 Première culture en BRM.

Après les tests de sélection de milieu de culture, le milieu Ym a finalement été choisi pour la croissance satisfaisante de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum*. La première cinétique d'évaluation de l'interaction entre les deux micro-organismes en BRM est faite avec les conditions montrées dans le Tableau 33.

Au bout de 5 jours de culture, le filtre à fibres creuses du fermenteur a été complètement colmaté. La Figure 47 montre la croissance de *F. langsethiae* 033 à l'intérieur de la membrane. Le champignon s'est développé sur les fibres de la membrane. Par conséquent, la pression du BRM est montée de 0,5 jusqu'à 0,8 bars et les échanges entre les réservoirs ont été réduits.

Tableau 33. Conditions de culture de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* en BRM.

Milieu	Ym
Agitation	200 rpm (magnétique)
Température	22°C
Volume	2 L chaque réservoir
Temps	7 jours
Inoculation à partir de cryotube	1×10^6 spores/mL = 0,4 g/L
Volume d'échange entre les 2 compartiments	200 mL

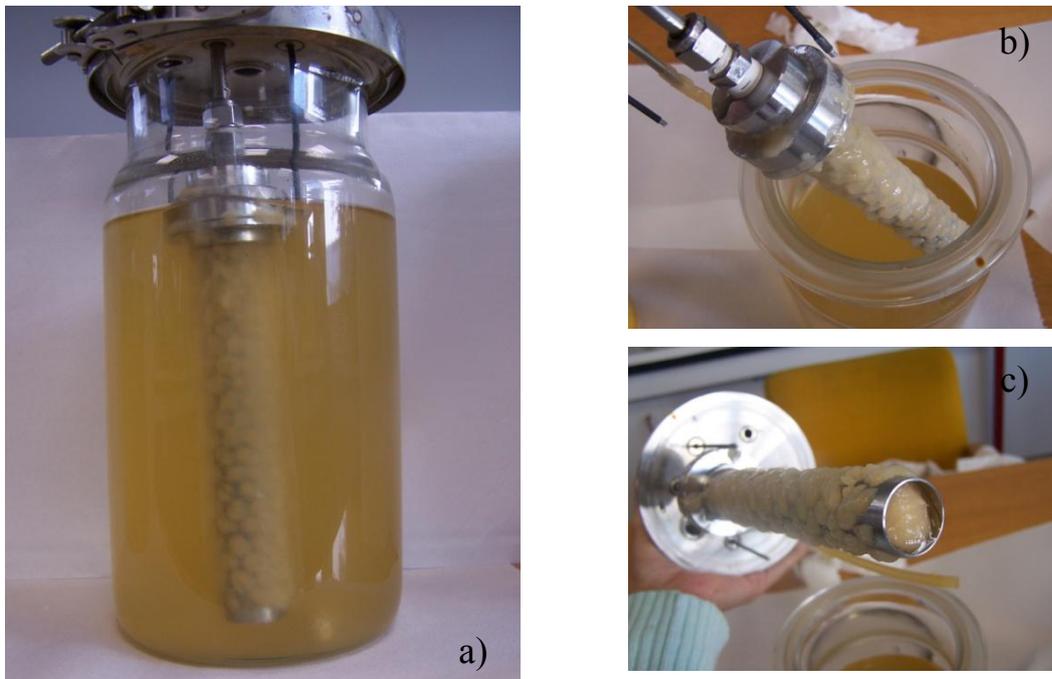


Figure 47. Colmatage de la membrane du BRM à cause de la croissance en filaments de *F. langsethiae* 033 (5 jours, 22° C).

7.2.3 Effet de l'agitation magnétique.

Pendant la culture de *F. langsethiae* 033 en Erlenmeyer et avec une agitation orbitale (200 rpm), la formation de petites pelotes a été observée (Figure 48a). Par contre, pendant la culture en BRM l'agitation est magnétique, et ces pelotes ne se sont jamais formées même si

F. langsethiae 033 a poussé sous forme de filaments. Dans l'hypothèse que la formation des pelotes pendant le développement de *F. langsethiae* 033 en BRM éviterait le colmatage de la membrane, un test en variant le volume de culture en fioles d'Erlenmeyer et sous agitation magnétique a été fait pour évaluer la formation de ces pelotes.

La croissance de *F. langsethiae* 033 est testée en fioles d'Erlenmeyer de 250 mL avec 50 mL et 200 mL de milieu de culture, et en Erlenmeyer de 250 mL avec 50 mL de milieu de culture avec une agitation magnétique de 200 rpm (milieu Ym, 22°C). Après 3 et 5 jours de culture, *F. langsethiae* 033 s'est bien développé. Les Figure 48b, 49c et 49d montrent que l'agitation magnétique ne favorise pas la formation de pelotes mais la croissance en filaments, en comparaison à l'agitation orbitale (Figure 48a).

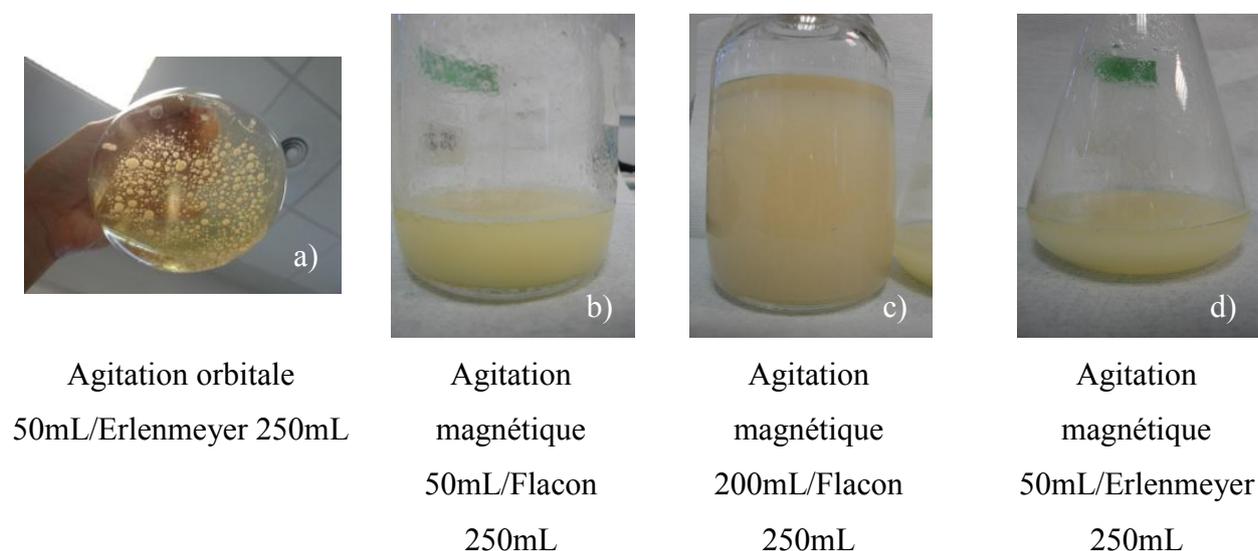


Figure 48. Effet de l'agitation et du volume de culture en fioles d'Erlenmeyer sur la croissance de *F. langsethiae* 033.

Le suivi de la croissance sous agitation magnétique montre que *F. langsethiae* 033 peut se développer aussi bien que sous agitation orbitale. La concentration en biomasse après 3 et 5 jours sous agitation orbitale est de 6,4 et 5,8 g/L respectivement. Sous agitation magnétique, la concentration est de 5,8 à 6,0 g/L à 3 jours et de 6,0 à 5,8 g/L après 5 jours de culture (Tableau 34). Quand le volume du milieu de culture est augmenté de 50 à 200 mL, la concentration de biomasse est réduite jusqu'à 2,2 et 2,8 g/L après 3 et 5 jours respectivement.

Ce résultat indique que la disponibilité d'oxygène a un effet sur la croissance de *F. langsethiae* 033.

Tableau 34. Croissance de *F. langsethiae* 033 sous agitation magnétique et différents volumes de milieu de culture.

Type d'agitation	Biomasse (g/L) à 3 jours	Biomasse (g/L) à 5 jours
Magnétique		
50 mL/Flacon 250 mL	5,8	6,0
200 mL/Flacon 250 mL	2,2	2,8
50 mL/Erlenmeyer 250mL	6,0	5,8
Orbitale		
50 mL/Erlenmeyer 250 mL	6,4	5,8

L'agitation orbitale facilite l'agglomération des filaments sous forme de pelotes qui peuvent réduire le colmatage de la membrane. L'agitation magnétique ne permet pas la formation de pelotes. Cette croissance de *F. langsethiae* sous forme de filaments lors de la culture est un problème pour le suivi des interactions en utilisant le BRM à cause de la colonisation de la membrane par les filaments. Pour cette raison, le bioréacteur à membrane n'a pas pu être utilisé dans l'étude d'interaction directe entre *F. langsethiae* et *G. candidum*.

7.3 Co-culture.

A cause de la croissance de *F. langsethiae* en filaments sur/dans la membrane du BRM et par conséquent le colmatage de la membrane, les analyses d'interaction directe ont été faites en co-culture. *F. langsethiae* et *G. candidum* sont mis en culture dans le même milieu liquide et la croissance des 2 micro-organismes ainsi que la production de la toxine ont été suivies pendant leur développement.

7.3.1 Inoculation à 10%.

L'évaluation de l'interaction entre *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* en co-culture a été faite en inoculant 10% de chacun des micro-organismes dans le même milieu. Le comportement cinétique de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* en co-culture a été comparé avec le comportement cinétique de chacun des micro-organismes en culture pure (milieu Ym, 22° C, 200 rpm).

La Figure 49 montre la croissance (g/L) de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* en culture pure et co-culture. On constate que la croissance de *F. langsethiae* 033 en culture pure est supérieure à celle de *G. candidum* et à celle des deux micro-organismes en co-culture. Les concentrations maximales de biomasse obtenues après 24h de culture sont de $4,5 \pm 0,6$ g/L pour *F. langsethiae* 033 ; de $2,1 \pm 0,1$ g/L pour *G. candidum* et de $2,8 \pm 0,1$ g/L pour les deux micro-organismes en co-culture. De manière visuelle au microscope on voit dans la co-culture le développement de *G. candidum* prendre le dessus sur celui de *F. langsethiae* 033.

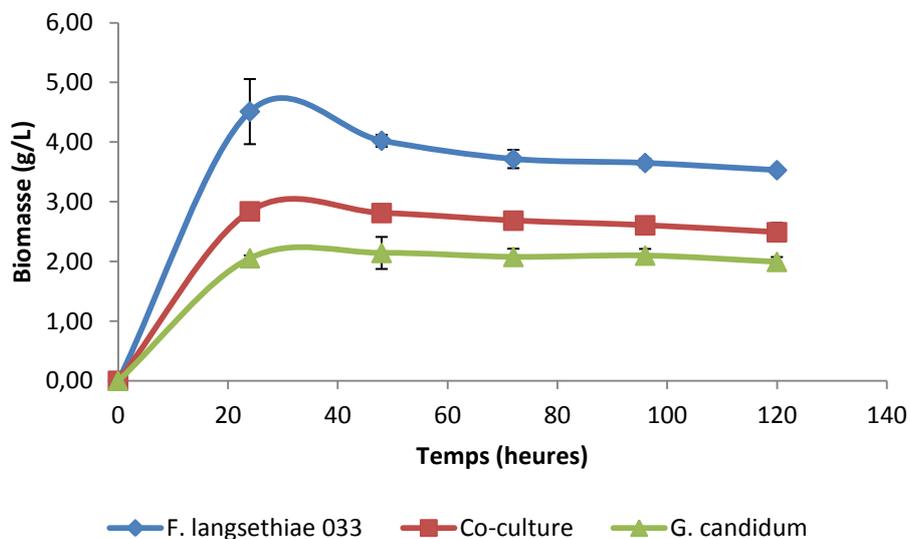


Figure 49. Croissance (g/L) de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* en culture pure et co-culture (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).

La concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 en co-culture avec *G. candidum* est réduite (Figure 50). Pendant le développement de *F. langsethiae* 033 en culture pure, la concentration de la toxine T-2 produite est entre $0,54 \pm 0,08$ µg/mL et

0,63 ± 0,27 µg/mL à partir de 24h de culture. Par contre pendant la co-culture, la concentration maximale de la toxine est 0,04 ± 0,01 µg/mL après 96h. Dans la culture pure, la toxine T-2 est produite entre 24 et 50h puis reste constante jusqu'à 96h.

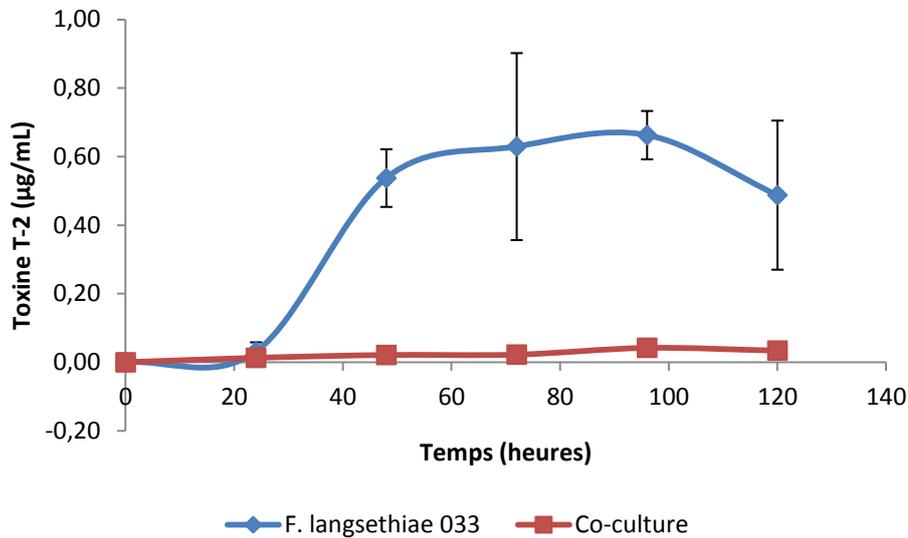


Figure 50. Production de la toxine T-2 par *F. langsethiae* 033 en culture pure et co-culture avec *G. candidum* (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).

Pendant les cultures pures et la co-culture, les valeurs de pH du milieu ont été suivies (Figure 51). En culture pure de *G. candidum* et de *F. langsethiae* 033 l'évolution du pH a déjà été décrite : une acidification jusqu'à un pH de $5,2 \pm 0,03$ après 24h pour *G. candidum* puis une augmentation du pH proche de la neutralité. *F. langsethiae* 033 présente aussi une acidification du milieu dans les premières 24 heures avec un pH de $6,1 \pm 0,2$ suivie d'une basification jusqu'à un pH de $8,8 \pm 0,1$ après 120h. Dans la co-culture, nous observons que l'évolution du pH est similaire au comportement de *F. langsethiae* 033 en culture pure. Il y a d'abord une acidification plus marquée en co-culture que la culture pure de *G. candidum* après 24h jusqu'à un pH de $4,9 \pm 0,1$ suivie de la basification semblable à celle de *F. langsethiae* 033.

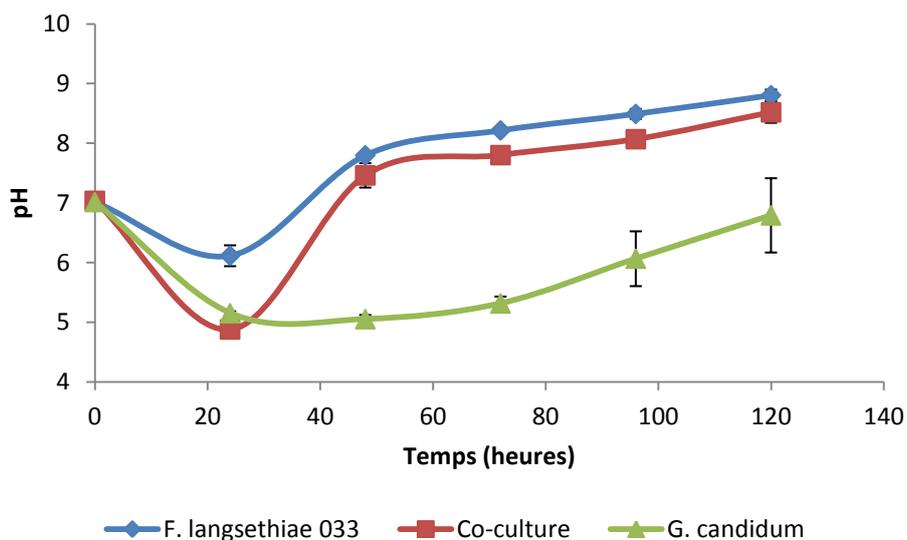


Figure 51. Comportement du pH pendant les cultures pures et la co-culture de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).

Blesa et al. (2010) ont étudié les effets de la concentration du glucose sur la concentration de la toxine T-2 produite par *F. sporotrichioides*. Ils ont trouvé que la production de la mycotoxine a une relation directe avec la concentration du glucose présent dans le milieu. Dans leur rapport ils ont détecté une concentration maximale en toxine de 1,45 mg/Kg produite par *F. sporotrichioides* dans des boîtes de Pétri sur un milieu PDA et une concentration de glucose de 20%. Ils n’ont pas faite le suivi de la consommation du glucose pendant la croissance, mais ils ont quantifié la toxine T-2 après 11 jours de culture de *F. sporotrichioides* à 30° C. *F. langsethiae* 033 produit une concentration maximale de la toxine T-2 de $0,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ($\text{mg/Kg}=\mu\text{g/mL}$) après 3 jours de culture dans le milieu Ym qui contient 5 g/L de glucose. La quantité de mycotoxines produites par les souches varie par rapport à différents facteurs comme l’espèce, les conditions climatiques, etc (Marasas et al., 1987). Dans cette étude, les conditions de culture de *F. langsethiae* 033 diffèrent des conditions de culture de *F. sporotrichioides*, culture liquide et boîtes de Pétri respectivement. Pour cette raison l’effet de la concentration initiale de glucose n’est pas comparable. Nous avons observé que *F. langsethiae* 033 a presque consommé la totalité de la concentration du glucose initial après 48h de culture liquide. C’est possible que *F. langsethiae* 033 utilise une autre source de carbone et d’énergie de la même manière que *P. camembertii*.

En raison des problèmes de perte de production de la toxine T-2 par *F. langsethiae* 033 à cause de son stockage à -20°C en cryotube, des tests d'interaction directe en co-culture ont aussi été faits avec *F. langsethiae* 035. La même méthodologie a été utilisée pour la co-culture avec *G. candidum*. Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec la souche 033. Les concentrations maximales en biomasse quantifiées après 24h sont de $3,5 \pm 0,4$ g/L pour *F. langsethiae* 035 en culture pure, de $2,6 \pm 0,4$ g/L pour les deux micro-organismes en co-culture et de $2,1 \pm 0,2$ g/L pour *G. candidum* en culture pure (Figure 53). Par rapport à la concentration de la toxine T-2 produite pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 en culture pure et co-culture, le même effet de réduction est observé que pour la souche *F. langsethiae* 035 (Figure 53). *F. langsethiae* 035 arrive à produire une concentration maximale de la toxine T-2 de $4,9 \pm 1,8$ $\mu\text{g/mL}$ après 48h d'inoculation en culture pure. Par contre, en présence de *G. candidum*, la concentration maximale détectée est de $0,4 \pm 0,1$ à 48h et de $0,4 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ après 72 h. Cette stabilité dans la concentration de la toxine T-2 produite, indique qu'il n'y a pas de production pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 en présence de *G. candidum*.

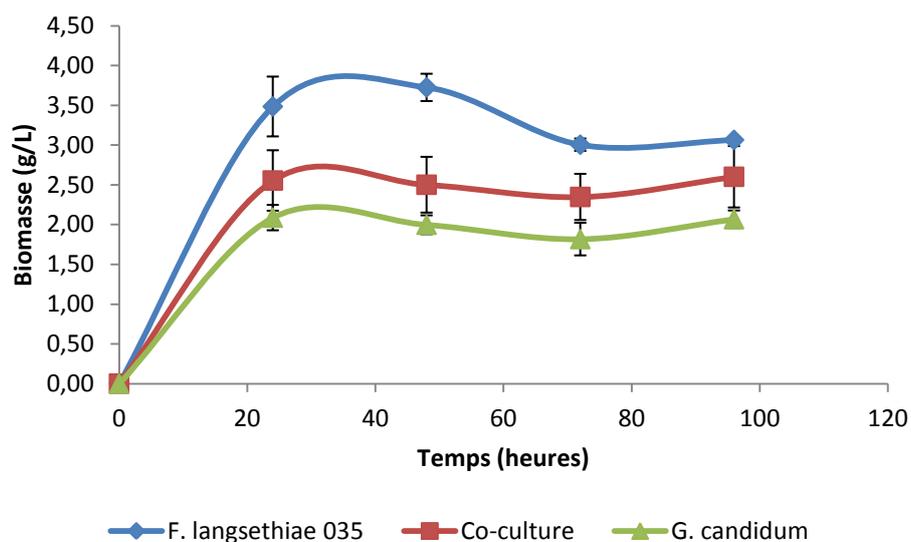


Figure 52. Croissance de *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* en culture pure et co-culture (22°C , 200 rpm, 10% inoculation).

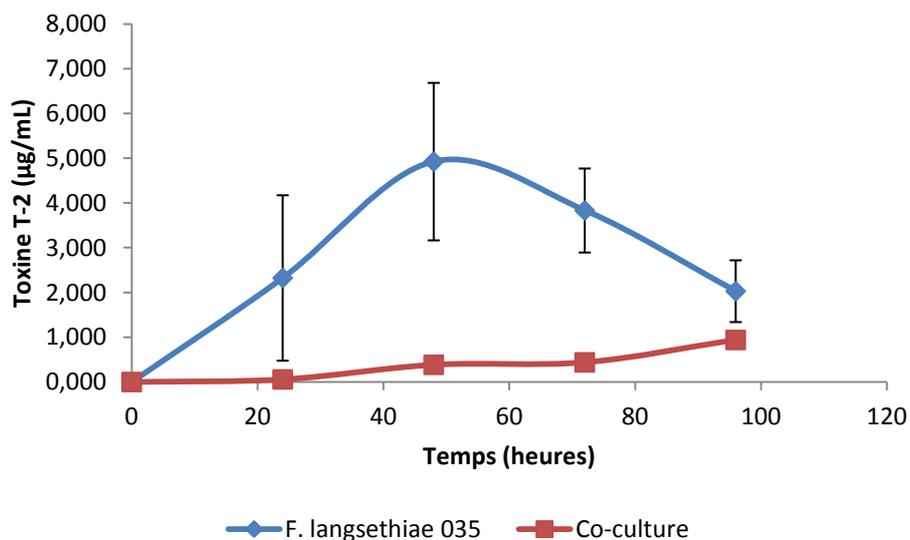


Figure 53. Production de la toxine T-2 par *F. langsethiae* 035 en culture pure et co-culture avec *G. candidum* (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).

Dans cette expérience, le suivi du pH a été aussi fait (Figure 54). *F. langsethiae* 035 en culture pure a acidifié le milieu à $\text{pH } 6,1 \pm 0,2$ après 24h et ensuite une basification jusqu'à $\text{pH } 8,4 \pm 0,1$ a été observée. *G. candidum* a acidifié le milieu après 24h jusqu'à $\text{pH } 6,3 \pm 0,02$ puis le pH est revenu proche de la neutralité à $6,9 \pm 0,1$ au bout de 96h. L'évolution du pH dans la co-culture avec l'isolat 035 est différente par rapport à celle de l'interaction entre *F. langsethiae* 033 et *G. candidum*. En effet le pH du milieu pendant la co-culture de *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* (ligne rouge) évolue de la même façon que le pH de *G. candidum* en culture pure (ligne verte).

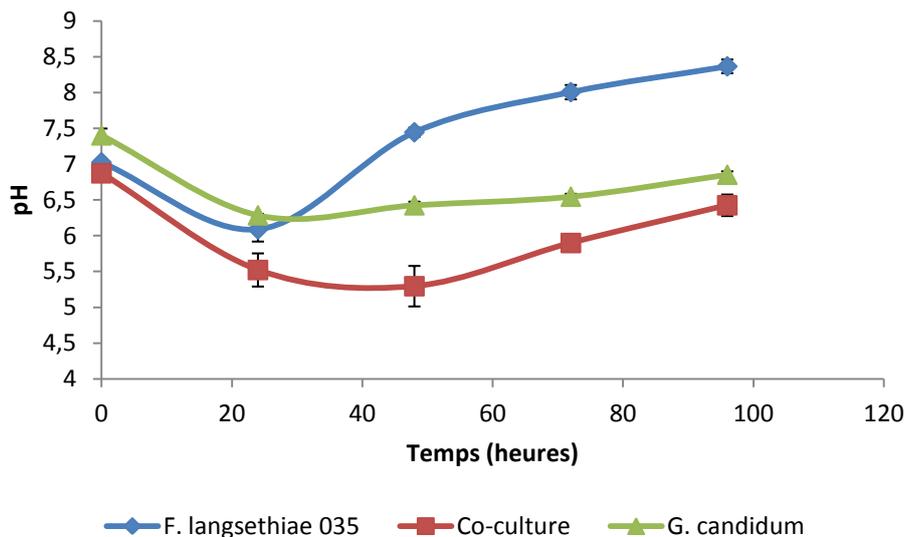


Figure 54. Suivi de pH pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* en culture pure et co-culture (22° C, 200 rpm, 10% inoculation).

Ces observations peuvent s'expliquer avec les hypothèses suivantes : en premier, l'activité enzymatique de *G. candidum* pendant la co-culture avec *F. langsethiae* 033 n'a pas été exprimée de la même manière que dans la co-culture avec *F. langsethiae* 035. En effet, lors de la croissance de *F. langsethiae* 035 le milieu Ym change de couleur, il passe de jaune à violet après 2 à 3 jours de culture. Ce qui n'est pas le cas avec *F. langsethiae* 033. Par contre, en présence de *G. candidum* en co-culture cette coloration n'est pas si marquée comme si la couleur violette était dégradée par la présence de *G. candidum*. La Figure 55 montre la perte de la coloration violette pendant la co-culture de *F. langsethiae* 035 et de *G. candidum*. Le flacon à gauche montre la coloration jaune du milieu Ym en présence de *G. candidum* en culture pure, le flacon du milieu montre la coloration violette du milieu Ym en présence de *F. langsethiae* 035 en culture pure et le flacon à droite la coloration jaune du milieu Ym en présence de *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* en co-culture.

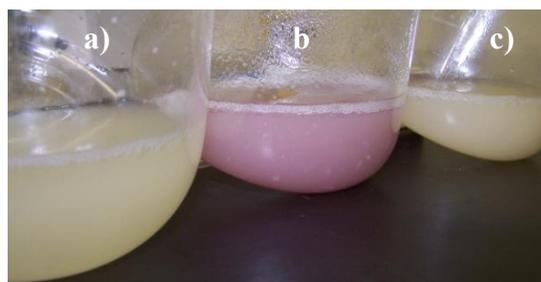


Figure 55. Coloration du milieu Ym a) Culture pure *G. candidum* ; b) Culture pure *F. langsethiae* 035 ; c) Co-culture *F. langsethiae* 035 et *G. candidum*.

G. candidum a la capacité de produire des enzymes ayant une activité de décoloration. Kim and Shoda (1999) ont trouvé que la peroxydase DyP produite par *G. candidum* Dec1 décolore plus facilement les teintures de nature anthraquinone et cette peroxydase a une température optimale d'action de 30°C et reste stable jusqu'à 50°C pendant 11h. Assas et al. (2002); . (2000) ont utilisé *G. candidum* pour décolorer et réduire les composants phénoliques dans les eaux résiduelles d'usine d'olives grâce à la production de la toxine DyP. Dans notre travail, on a observé que pendant la co-culture entre *G. candidum* et *F. langsethiae* 035, le milieu Ym n'est jamais devenu violet comme dans la culture pure de *F. langsethiae* 035. Il est possible que *G. candidum* ait excrété des peroxydases qui ont dégradé les pigments produits par *F. langsethiae* 035 et qui ont pu avoir un effet sur les changements des valeurs de pH en co-culture. Pour cette raison le comportement est similaire aux valeurs de *G. candidum* en culture pure.

L'autre chose à considérer est l'activité de *G. candidum* face à la concentration de la toxine T-2 produite par *F. langsethiae* 033 et 035. Dans la co-culture entre *F. langsethiae* 033 et *G. candidum*, la concentration de la toxine T-2 a été réduite de 96% : de 0,54 dans la culture pure à 0,02 µg/mL en co-culture. Pendant la co-culture entre *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* la concentration a été réduite de 92% : de 4,93 en culture pure à 0,39 µg/mL en co-culture. Il est important de considérer la capacité de production de la toxine T-2 par *F. langsethiae* 035 qui est plus de 9 fois plus importante que pour *F. langsethiae* 033. En tout cas, la réduction de la concentration de la toxine T-2 dans la co-culture est de 90% minimum.

7.3.2 Inoculation à 3%.

Dans le but d'évaluer l'effet de la concentration d'inoculum initial, nous avons réduit de 10 à 3% l'inoculum de *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* dans les cultures pures et co-culture.

La croissance de *F. langsethiae* 035 en culture pure est supérieure à la croissance de *F. langsethiae* 035 et de *G. candidum* en co-culture et à la croissance de *G. candidum* en culture pure (Figure 56). La concentration de la biomasse maximale dans la co-culture et la culture pure de *G. candidum* est trouvée après 24h de culture. Elle est de $1,7 \pm 0,2$ et de $2,4 \pm 0,8$ g/L respectivement. Par contre la concentration maximale de la biomasse de *F. langsethiae* 035 est après 48h d'incubation avec une concentration de $4,1 \pm 0,04$ g/L.

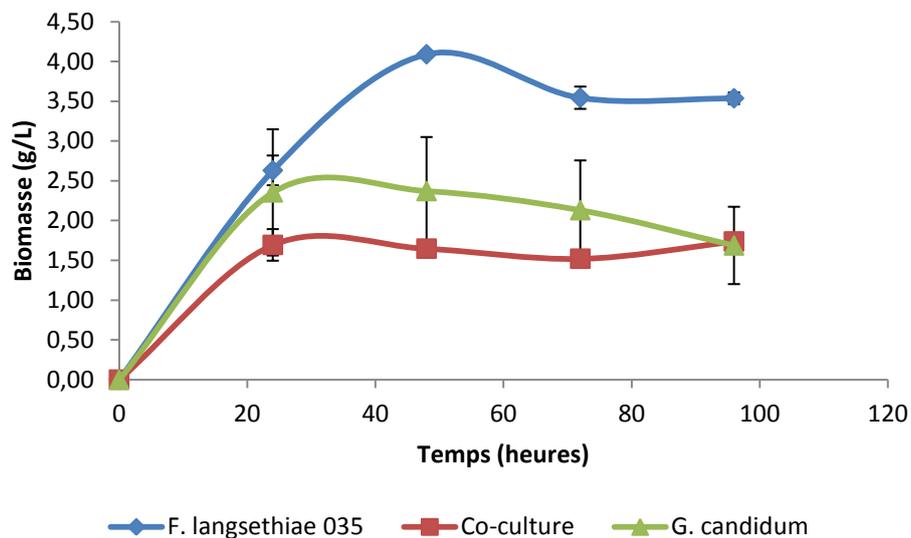


Figure 56. Croissance de *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* en culture pure et en co-culture (22° C, 200 rpm, 3% inoculation).

La concentration de la toxine T-2 est aussi réduite dans la co-culture en comparaison à la concentration de la toxine T-2 produite en culture pure par *F. langsethiae* 035 avec 3% d'inoculation (Figure 57). *F. langsethiae* 035 en culture pure produit la toxine T-2 à une concentration de $2,9 \pm 1,4$ µg/mL après 48h et en présence de *G. candidum* cette concentration n'est que de $0,05 \pm 0,03$ µg/mL après 96h. Une réduction de 99% de la concentration est donc observée. Dans la co-culture la concentration de la toxine T-2

quantifiée au temps zéro est de $0,12 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, après 72h cette concentration est restée constante. Après 96h la concentration en toxine T-2 est montée à $0,20 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$.

La présence de *G. candidum* réduit la concentration de la toxine T-2 dans la co-culture de 99% par rapport à la concentration de la T-2 dans la culture pure.

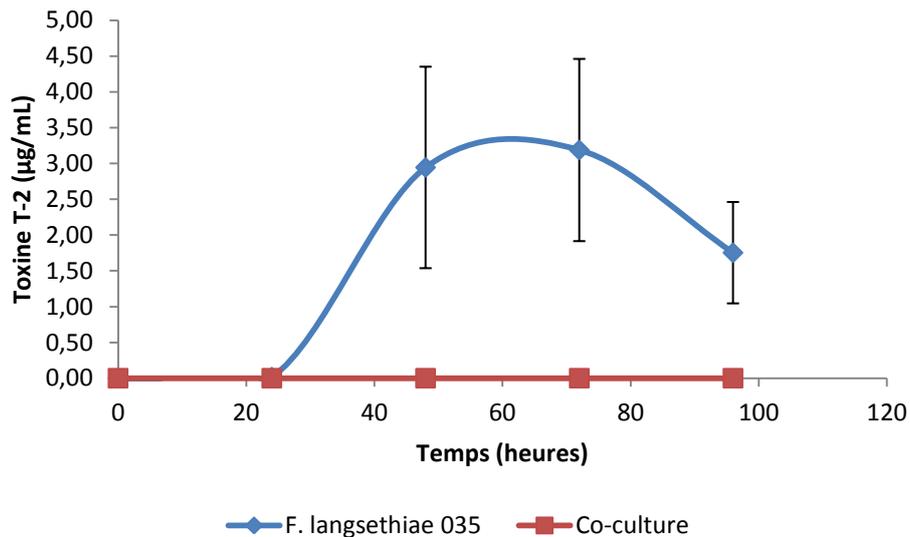


Figure 57. Production de la toxine T-2 par *F. langsethiae* 035 en culture pure et en co-culture avec *G. candidum* (22° C, 200 rpm, 3% inoculation).

Le suivi de l'évolution du pH pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 et de *G. candidum* en culture pure et en co-culture avec 3% d'inoculation montre que le pH de la co-culture varie de la même manière que le pH de la culture pure de *G. candidum* (Figure 58). Cet effet est aussi observé avec une inoculation de 10%. Ces résultats confirment que l'activité de *G. candidum* dans la co-culture a un effet prédominant sur les variations de pH du milieu.

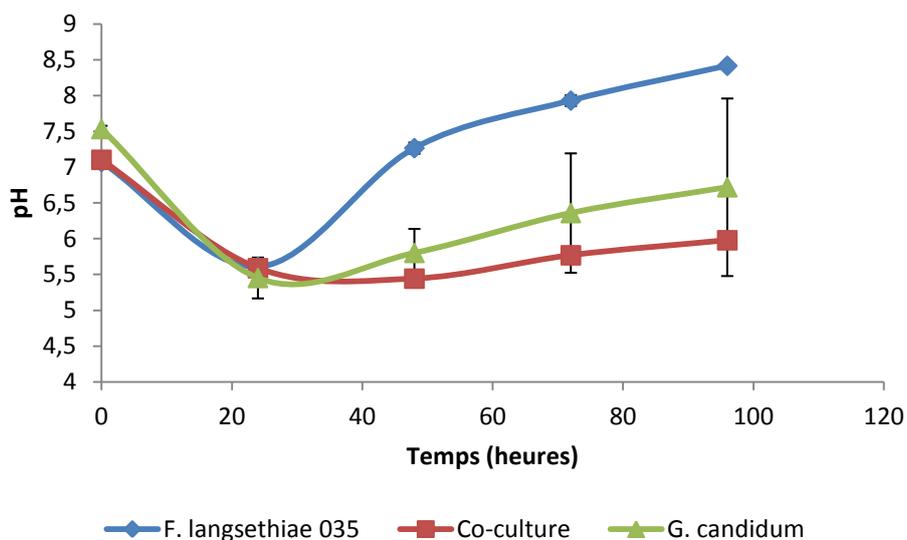


Figure 58. Suivi du pH pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* en culture pure et co-culture (22° C, 200 rpm, 3% inoculation).

7.4 Différentiation de *F. langsethiae* et *G. candidum* par Double-labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescent *In Situ* Hybridization (DOPE-FISH).

Pendant la co-culture, il n'est pas possible de différencier le développement de *F. langsethiae* et celui de *G. candidum*. En effet, du fait que les deux micro-organismes ont une morphologie filamenteuse pendant la croissance, l'observation au microscope optique n'est pas suffisante.

La technique DOPE-FISH permet de différencier les micro-organismes dans une culture mixte par coloration fluorescente.

Nous avons trouvé que *F. langsethiae* présente une forte auto-fluorescence jaune à 470 nm (Figure 59). Ainsi l'hybridation avec la sonde universelle pour Eucaryote qui devait conduire à une fluorescence rouge de *F. langsethiae* n'a pas permis d'améliorer le signal et donc l'autofluorescence naturelle a été gardée. Néanmoins comme nous avons utilisé une coloration jaunâtre pour *Geotrichum*, il a fallu changer la coloration pour différencier ces 2 micro-organismes. Ainsi seule la sonde spécifique pour *G. candidum* pB-01541 couplée à la teinture fluorescente DyLight 488 (vert) a été utilisée et permet de colorer en vert *G. candidum* à 470 nm (Figure 60).

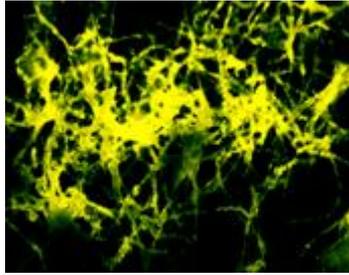


Figure 59. Auto-fluorescence jaune de *F. langsethiae* 033 à 470 nm.

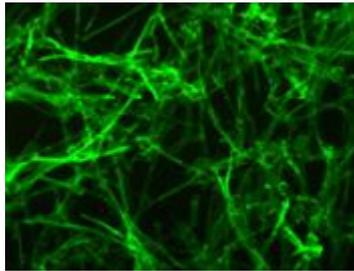


Figure 60. DOPE-FISH de *G. candidum* à 470 nm.

Pendant l'interaction directe de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* en co-culture, cette technique nous permet de différencier de manière qualitative les 2 micro-organismes en croissance. Les cultures pures des 2 micro-organismes servent de témoin.

La Figure 61 montre des photos prises au cours de temps pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 en culture pure, *G. candidum* en culture pure et *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* en co-culture à 22° C, 200 rpm, pendant 5 jours et dans du milieu Ym. D'après les photos de *F. langsethiae* 033 (jaune) à 470 nm, il est possible d'observer qu'après 2 jours la croissance de *F. langsethiae* 033 est maximale. Dans les photos DOPE-FISH de *G. candidum* (vert) à 470 nm, on observe que le développement commence à 24 heures. Finalement, dans les photos de la co-culture au temps zéro il est possible de voir en jaune les spores de *F. langsethiae* 033 et en vert les filaments de *G. candidum*. Au cours du temps, la coloration des photos est surtout verte due à la croissance de *G. candidum* et la présence limitée de *F. langsethiae* 033 en jaune.

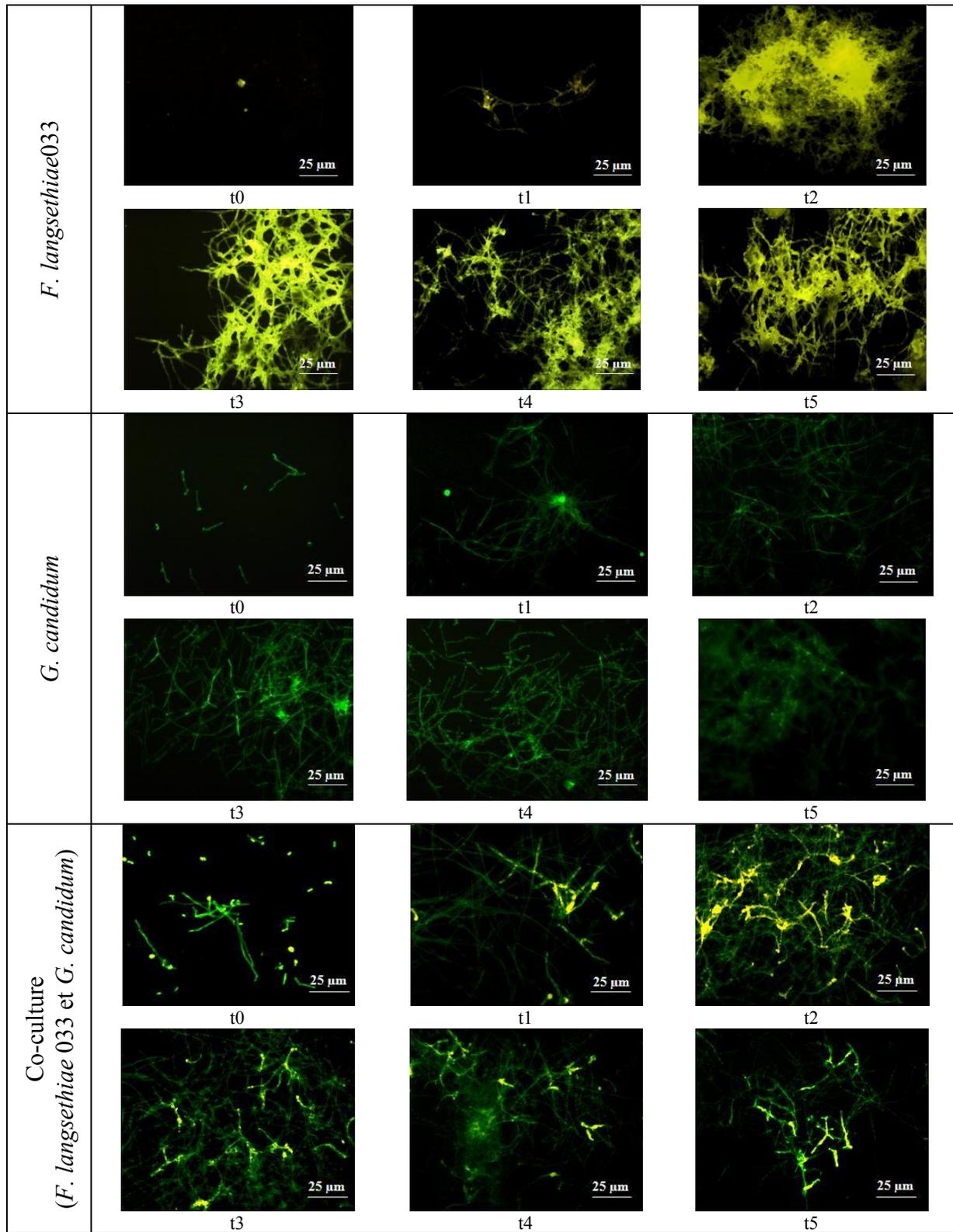


Figure 61. Différentiation entre *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* par DOPE-FISH. Photos de cultures pures et co-culture (22°C, 200rpm, 10% inoculation, t0 à t5 : temps d'incubation en jours).

La co-culture entre *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* a été traitée de la même manière avec la technique DOPE-FISH. La Figure 62 montre les photos au cours de temps (4 jours) des cultures pures et de la co-culture. Les photos de a) à e) représentent la croissance de *F. langsethiae* 035 en culture pure, les photos de f) à j) la croissance de *G. candidum* en culture pure et les photos de k) à o) la croissance de *F. langsethiae* 035 et de *G. candidum* en co-culture. Dans les photos de k) à o), il est possible d'observer que la coloration prédominante est le vert de *G. candidum*. Par contre, cet effet est moins marqué en comparaison avec les photos d'hybridation de la co-culture de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum*.

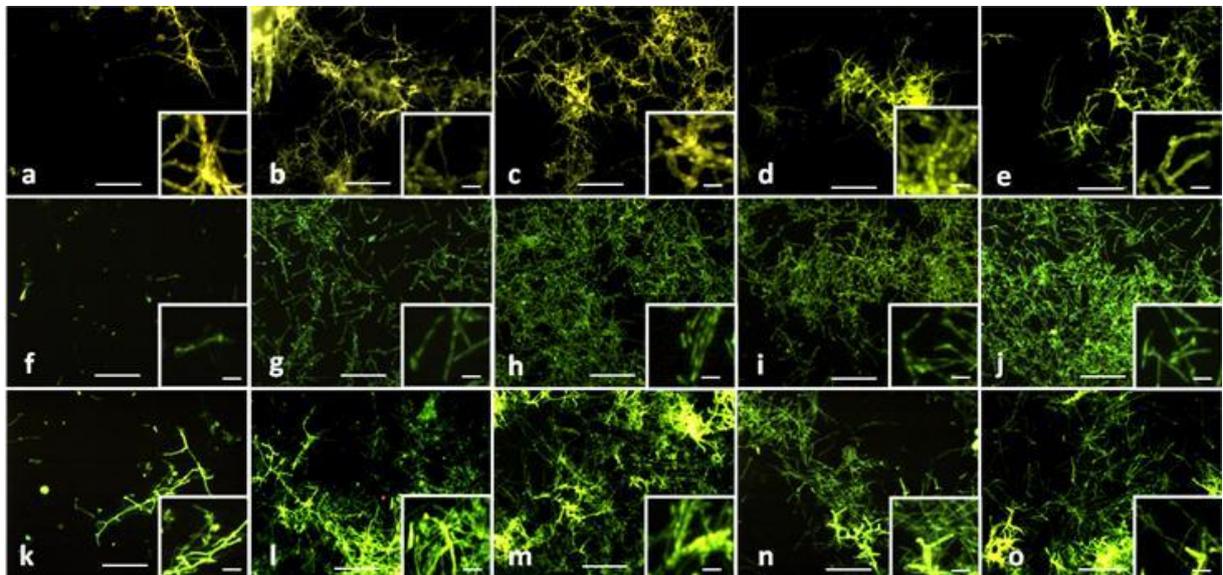


Figure 62. Différentiation entre *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* par DOPE-FISH. Photos de cultures pures et co-culture (22°C, 200rpm, 10% inoculation, a-e : temps d'incubation t0 à t4 jours de *F. langsethiae* 035 en culture pure, f-j : temps d'incubation t0 à t4 jours de *G. candidum* en culture pure et k-o : temps d'incubation t0 à t4 jours de *F. langsethiae* 035 et *G. candidum* en co-culture).

La technique DOPE-FISH nous permet de différencier de façon qualitative la croissance de *F. langsethiae* de celle de *G. candidum* en co-culture.

7.5 Quantification de l'ADN.

En considérant que les deux micro-organismes ont une morphologie filamenteuse pendant la croissance, les méthodes de quantification comme le comptage à la cellule de Thoma ou la mesure de DO sont inutiles.

Comme l'ADN contient l'information génétique qui détermine le développement et le fonctionnement d'un organisme, sa quantification peut être associée à la croissance du micro-organisme. Pour cette raison, nous avons quantifié l'ADN de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* en culture pure et en co-culture (Tableau 35).

Tableau 35. Quantification de l'ADN de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* en culture pure et en co-culture (22° C, 200 rpm, 4 jours, 10% inoculation).

Temps (heures)	<i>F. langsethiae</i> 033		Co-culture de <i>F. langsethiae</i> 033 et <i>G. candidum</i>			<i>G. candidum</i>	
	Biomasse (g/L)	ADN (nombre de génomes)	Biomasse (g/L)	ADN- <i>Fus</i> (nombre de génomes)	ADN- <i>Geo</i> (nombre de génomes)	Biomasse (g/L)	ADN (nombre de génomes)
0	0,0 ± 0,0	2020	0,000	9230	7450	0,0 ± 0,0	2670
24	2,4 ± 0,3	17800	2,090	7730	20500	2,6 ± 0,4	161000
48	4,1 ± 0,5	61700	2,610	40200	87800	2,6 ± 0,1	216000
72	3,9 ± 0,1	94100	2,670	24000	61500	2,4 ± 0,6	52100
96	3,9 ± 0,1	116000	2,720	9540	23300	2,1 ± 0,5	12300

La Figure 63 représente la croissance de *F. langsethiae* 033 (g/L) en culture pure, le nombre de génomes d'ADN et la production de la toxine T-2. La production de la toxine T-2 se fait dans la 2^o partie de la phase de croissance ; cela est typique des métabolites secondaires. La croissance de *F. langsethiae* 033 en culture pure estimée par la mesure du poids sec (g/L) montre un maximum atteint à 48h et une phase stationnaire ensuite. La quantification de l'ADN ne montre pas la même allure. Le nombre de génomes augmente régulièrement jusqu'à 96h. Le nombre de génomes qui augmente suggère que l'activité génomique pendant le développement de *F. langsethiae* 033 en culture pure n'est pas encore finie. Il est possible que, même si la croissance ou la production de la toxine n'augmentent pas, les cellules de *F. langsethiae* 033 ont encore des fonctions enzymatiques en train d'être exprimées. La croissance de *G. candidum* en culture pure estimée par la mesure du poids sec (g/L) montre un maximum atteint à 24h et une phase stationnaire ensuite. La quantification de l'ADN ne montre pas le même comportement. Le nombre de génomes a une valeur maximale

à 48h de 216000 (Figure 64). Ensuite le nombre de génomes diminue jusqu'à 23300 à 96h de culture.

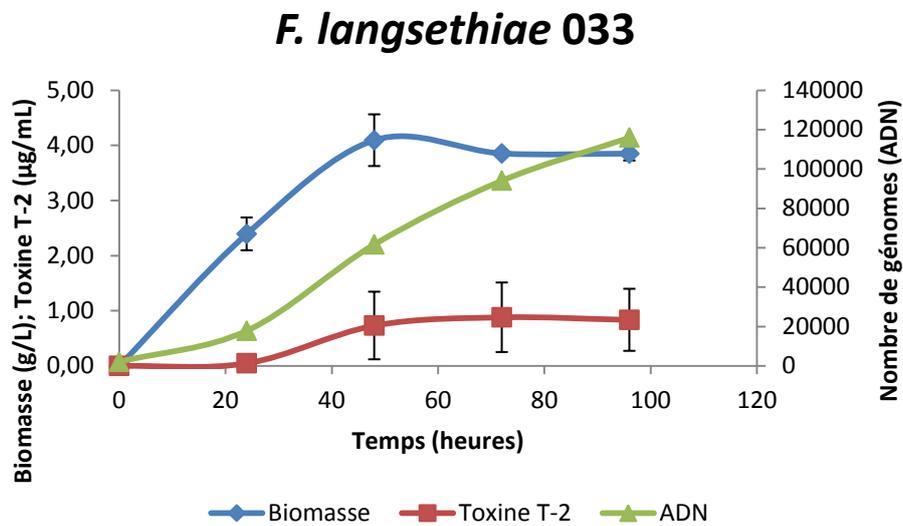


Figure 63. Quantification d'ADN (nombre de génomes), de la biomasse (g/L) et la production de la toxine T-2 (µg/mL) pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 en culture pure (22° C, 200 rpm, 4 jours, 10% inoculation).

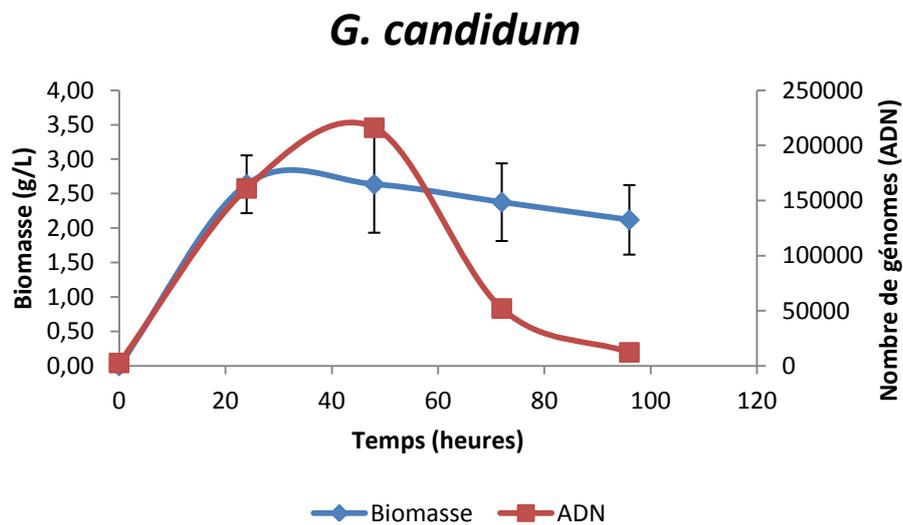


Figure 64. Quantification de l'ADN (nombre de génomes) et de la biomasse (g/L) pendant la croissance de *G. candidum* en culture pure (22° C, 200 rpm, 4 jours, 10% inoculation).

Les résultats de la quantification du nombre de génomes de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* dans la co-culture sont montrés dans la Figure 65. *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* se développent pendant la culture. En comparant le nombre de génomes de *F. langsethiae* 033 en culture pure et en co-culture, nous pouvons observer qu'il y a une diminution du nombre de génomes en co-culture. On peut estimer la biomasse à 48h de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* en co-culture par corrélation de la biomasse estimée en poids sec avec le nombre de génomes de ces 2 micro-organismes en culture pure. *F. langsethiae* 033 a une concentration d'environ de 4,1 g/L, ce qui représente 61700 nombres de génomes en culture pure, si le nombre de génomes en co-culture est de 40200 alors la biomasse de *F. langsethiae* 033 en co-culture peut être estimée à 2,67 g/L. De la même manière pour la culture pure de *G. candidum* à 48h la concentration de biomasse est de 2,6 g/L et elle représente 216000 nombres de génomes, si en co-culture, le nombre de génomes est de 87800, alors la concentration en *G. candidum* est de 1,06 g/L (Tableau 35). Après ces estimations, on peut donc dire que les deux micro-organismes poussent moins qu'en culture pure mais d'après l'observation en culture pure, *F. langsethiae* 033 est plus inhibée en co-culture possiblement à cause de sa croissance moins rapide et de la compétition pour certains nutriments avec *G. candidum*.

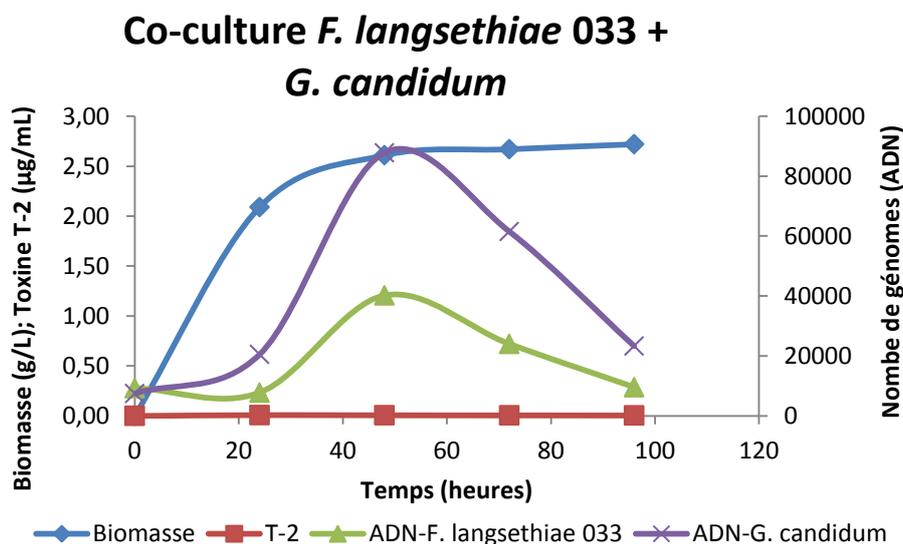


Figure 65. Quantification d'ADN pendant la croissance de *F. langsethiae* 033 et *G. candidum* en co-culture (22° C, 200 rpm, 4 jours, 10% inoculation).

7.6 Conclusion de l'interaction directe.

Les tests d'interaction en boîte de Pétri ont montré que les croissances de *F. langsethiae* 035 et de *G. candidum* ne sont pas inhibées par un contact direct. Il y a une compétition pour les nutriments et l'espace mais il n'y a pas d'inhibition d'un micro-organisme sur l'autre.

L'utilisation du BRM n'a pas été possible à cause de la morphologie filamenteuse de ces deux micro-organismes. Dans le premier test en BRM, *F. langsethiae* 033 a poussé dans et sous la membrane et par conséquent les échanges du milieu ont été réduits. A cause du colmatage de la membrane, les interactions directes ont été faites en co-culture avec 10 et 3% d'inoculation. En utilisant 10% d'inoculum, les résultats ont montré que la concentration totale de la biomasse de *F. langsethiae* 033/035 et de *G. candidum* en co-culture est inférieure à celle de *F. langsethiae* 033/035 en culture pure mais supérieure à celle de *G. candidum* en culture pure. La concentration de la toxine T-2 en co-culture est plus de 90% inférieure à celle observée dans la culture pure de *F. langsethiae*. L'isolat 033 en culture pure a produit $0,5 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$ de toxine après 48h et en présence de *G. candidum* la concentration est seulement de $0,02 \pm 0,001$ $\mu\text{g/mL}$. L'isolat 035 en culture pure a produit $4,9 \pm 1,8$ $\mu\text{g/mL}$ de toxine après 48h et en co-culture 92% de moins soit $0,4 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$. En plus, en culture pure, le milieu Ym avec l'isolat 035 devient violet après 48h mais en co-culture cette coloration ne se produit pas. Il est possible que la souche de *G. candidum* utilisée dans ces tests soit capable de produire des enzymes de décoloration (Assas et al., 2002; ..., 2000; Lee et al., 2000) qui expliquerait cette absence de coloration en co-culture. Comme la coloration du milieu Ym est toujours jaune avec l'isolat 033, l'activité de décoloration du milieu par *G. candidum* n'avait pu être observée. Quand le pourcentage d'inoculation est changé de 10 à 3%, le même effet sur la concentration de la toxine T-2 est observé : une réduction de la concentration supérieure à 90% en co-culture.

La technique DOPE-FISH nous a aidés à différencier la croissance de *F. langsethiae* 033/035 de la croissance de *G. candidum* en co-culture. *F. langsethiae* a une auto fluorescence jaune à 470nm et *G. candidum* est vert après l'hybridation avec les oligosondes. Dans le suivi de la co-culture nous avons observé que la couleur verte est plus abondante que la couleur jaune. Ces résultats suggèrent que *G. candidum* domine *F. langsethiae*. Comme la technique DOPE-FISH est une méthodologie qualitative, nous avons utilisé la quantification de l'ADN (nombre de génomes) qui est spécifique pour chaque micro-organisme même en cultures mixtes. La croissance microbienne a 4 phases : 1) la phase de latence dans la quelle la

tension hélicoïdale de l'ADN est récupérée et l'expression des génomes augmente ; 2) la phase exponentielle où la division cellulaire se déroule grâce à la disponibilité des nutriments ; 3) la phase de transition commence alors que la concentration en nutriments est réduite, à ce point la pente change, les synthèses d'ADN et de protéines diminuent de manière non synchronique et le ratio ADN/protéines augmente, la division cellulaire continue à la même vitesse que pendant la phase exponentielle ; et 4) la phase stationnaire qui se caractérise par l'épuisement des nutriments, ici la concentration de la biomasse ne change pas et les synthèses d'ADN, d'ARN et de protéines sont réduites (Ramírez Santos et al., 2005). Le nombre de génomes de la culture pure de *G. candidum* augmente pendant la phase exponentielle. Ensuite le nombre de génomes continue à augmenter jusqu'à 48h. Cette augmentation peut être en relation avec la phase de transition où le ratio ADN/protéines augmente à cause de la réduction de la disponibilité de nutriments. Après, le nombre de génomes diminue en même temps que la croissance de *G. candidum* entre dans la phase stationnaire. Dans le cas de la culture pure de *F. langsethiae* 033, le nombre de génomes augmente pendant la croissance. Au moment où les nutriments sont épuisés la sporulation est déclenchée et par conséquent le nombre de génomes continue à augmenter. De manière contraire, en co-culture le nombre de génomes augmente jusqu'à 48h de co-culture et diminue ensuite. En co-culture, le nombre de génomes de *F. langsethiae* 033 et de *G. candidum* présente une période de récupération de la tension hélicoïdale suivie d'un incrément de la biomasse. Après il y a un point où les valeurs sont maximales. Cela peut représenter la phase de transition (réduction de la disponibilité de nutriments) puis une réduction de l'expression génomique associée à la phase stationnaire. Si on associe le nombre de génomes de la culture pure et la biomasse aux nombres de génomes en co-culture, nous pouvons estimer la concentration de la biomasse de chaque micro-organisme. Alors, en co-culture *F. langsethiae* a une concentration de biomasse d'environ 2,67 g/L et *G. candidum* de 1,06 g/L. Ces estimations suggèrent que *F. langsethiae* 033 est partiellement inhibée par la présence de *G. candidum* en contact direct. L'observation la plus importante est que la concentration de la toxine T-2 est affectée et réduite de plus de 90% en co-culture.

8. Caractérisation partielle du MFG.

Le milieu pré-fermenté par *G. candidum* (MFG) montre des effets de contrôle sur la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* sur ce milieu. Dans le but d'avoir une idée sur la nature de l'agent actif sur la réduction de la toxine T-2, le milieu MFG est traité thermiquement et avec des enzymes protéolytiques pour déterminer si l'activité détoxifiante serait éventuellement de nature enzymatique.

8.1 Tests thermiques.

La stabilité thermique du milieu fermenté par *G. candidum* (MFG) est évaluée en traitant le milieu dans deux conditions différentes : à 100°C pendant 30 min (bain-Marie) et à 120°C pendant 20 min (cycle d'autoclavage).

Après les traitements thermiques, *F. langsethiae* 035 est inoculé et sa croissance et sa production de la toxine T-2 sont suivies pendant 4 jours, à 22° C et 200 rpm. La Figure 66 montre la croissance de *F. langsethiae* 035 dans le milieu témoin Ym, le milieu MFG sans traitement thermique, le milieu MFG avec le traitement à 100°C/30min (Tt1) et le milieu MFG avec le traitement à 120°C/20min (Tt2). Il est possible d'observer que la croissance de *F. langsethiae* 035 dans les milieux Tt1 et Tt2 est similaire à celle visible dans le milieu témoin Ym. La croissance dans le milieu MFG non traité, est inférieure à la croissance dans le milieu témoin Ym.

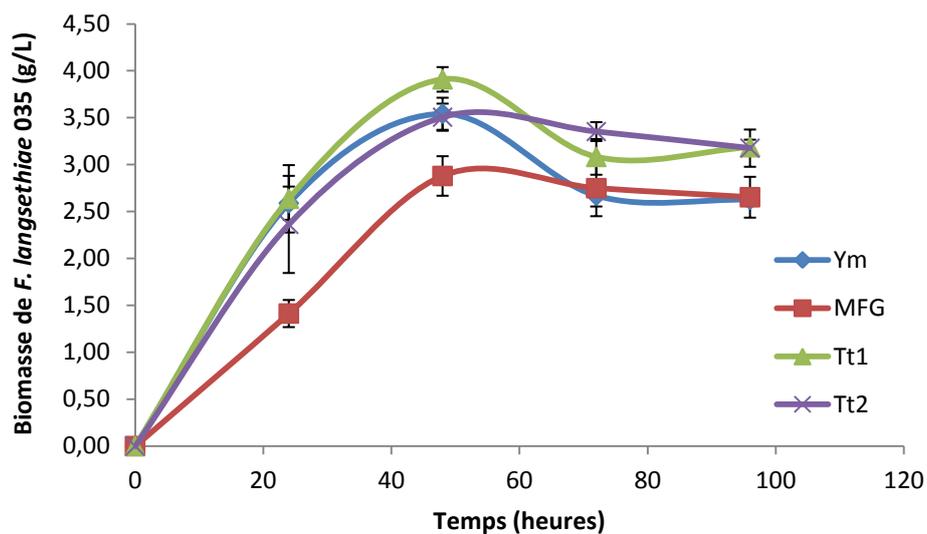


Figure 66. Effet des traitements thermiques du milieu MFG sur la croissance de *F. langsethiae* 035 (Milieu témoin : Ym, milieu non traité MFG, milieu MFG traité à 100°C pendant 30 min : Tt1, milieu MFG traité à 120°C pendant 20 min : Tt2).

Par rapport à la production de la toxine T-2, sa concentration dans le milieu témoin Ym est supérieure aux concentrations détectées dans les milieux MFG, Tt1 et Tt2 (Figure 67). La concentration maximale trouvée dans le milieu témoin est de $6,1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ après 48 heures de culture. Par contre dans les milieux MFG, Tt1 et Tt2 cette concentration reste inférieure de 98% dans le milieu MFG ($0,1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$), de 91% dans le milieu Tt1 ($0,5 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) et de 95% dans le milieu Tt2 ($0,3 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$). Une augmentation de 5 fois plus dans le milieu Tt1 ($0,5 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) et 3 dans le milieu Tt2 ($0,3 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) est observé.

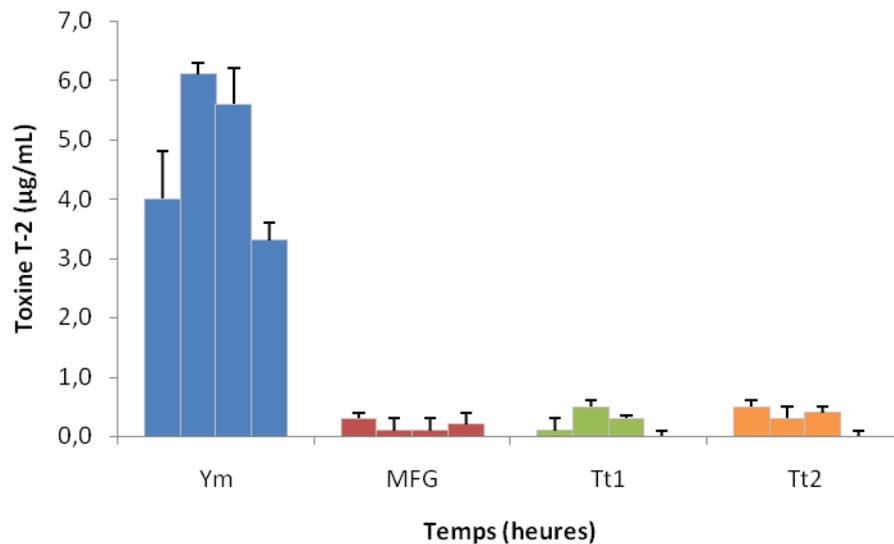


Figure 67. Effet des traitements thermiques du milieu MFG sur la concentration de la toxine T-2 pendant la culture de *F. langsethiae* 035 (Milieu témoin : Ym, milieu non traité MFG, milieu MFG traité à 100°C pendant 30 min : Tt1, milieu MFG traité à 120°C pendant 20 min : Tt2).

Nous avons deux hypothèses : la présence d'un agent actif dans le milieu MFG et sa nature est protéique. Si l'agent actif dans le milieu MFG est de nature protéique, le traitement thermique aurait détruit l'agent et par conséquent la concentration de la toxine T-2 aurait du être comme celle du témoin Ym. Les résultats ont montré que même si la croissance et la concentration de la toxine T-2 dans les milieux Tt1 et Tt2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 sont supérieures aux valeurs trouvées dans le milieu non traité thermiquement, la concentration de la toxine T-2 produite n'a jamais été de l'ordre de celle du milieu témoin Ym. Ainsi, la composition du milieu MFG (présence d'un agent actif) est capable de maintenir les concentrations de la toxine T-2 au-dessous de 90% de la valeur du témoin même si le milieu est traité thermiquement jusqu'à 120° C.

Nous pouvons dire qu'un agent actif présent dans le milieu MFG n'a pas d'effet sur la croissance de *F. langsethiae*, que cet agent actif est stable thermiquement et que cet agent actif affecte sûrement directement la production de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* dans le milieu MFG.

8.2 Tests enzymatiques.

Le traitement du milieu MFG avec des enzymes protéolytiques est aussi effectué pour déterminer si l'agent actif présent dans le milieu fermenté par *G. candidum* est de nature protéique. Dans la section 2.4.2 il est mentionné que le milieu MFG traité avec les enzymes est nommé de la manière suivante : E1 milieu traité avec la Protéase type XIV, E2 avec la α -chymotrypsine type II et E3 avec la pepsine. Si l'agent actif est affecté par l'action des enzymes utilisées, le développement de *F. langsethiae* 035 et la production de toxine doivent être similaires à ceux obtenus dans le milieu témoin Ym.

Les traitements enzymatiques du milieu MFG ont eu différents effets sur la croissance de *F. langsethiae* 035. La vitesse moyenne de croissance de *F. langsethiae* 035 (v_{XF}) à 24 heures dans les milieux MFG, E1, E2 et E3 est de 45 à 93% réduite en comparaison avec la vitesse à 24 heures dans le milieu témoin Ym qui est de 0.12 ± 0.01 g/L/h. La vitesse moyenne de croissance dans les milieux MFG et E1 est similaire à 24h, elle est de $0,06 \pm 0,01$ g/L/h. Cependant, le traitement du milieu MFG par l'enzyme Protéase type XIV (E1) a donné une augmentation de la croissance de *F. langsethiae* 035 à 72h. D'après la feuille de spécifications données par Sigma Aldrich, l'enzyme Protéase type XIV de *Streptomyces griseus* est un mélange d'au moins 10 protéases : 5 protéases de type serine, 2 zinc endopeptidases, 2 zinc leucine aminopeptidases et 1 zinc carboxypeptidase. L'enzyme Protéase type XIV est très stable sur une gamme de pH compris entre 5,0 et 9,0 et elle a un spectre tellement large qu'elle peut digérer plus de 70% de la caséine en acides aminés. Le pH de la culture est ajusté à 7,0, et ce pH est dans la zone où l'activité de la Protéase type XIV est optimale. Le milieu de culture Ym a une composition à base de tryptone (digestion enzymatique de caséine), d'après la spécificité de la Protéase XIV, ce composant peut être partiellement ou complètement digéré par cette enzyme. Par conséquent la disponibilité des sources d'azote et de carbone probablement a augmenté et comme les composants sont moins complexes, le transport à l'intérieur de la cellule peut être aussi favorisé. La stabilité du pH et la digestion non spécifique de la Protéase XIV ont donc contribué au meilleur développement de *F. langsethiae* 035 pendant la culture dans le milieu traité avec cette enzyme. Une concentration maximale de biomasse de $4,3 \pm 0,2$ g/L a été déterminée après 72 heures, soit 21.5% de plus que la concentration maximale trouvée dans le milieu témoin Ym qui est de $3,5 \pm 0,2$ g/L après 48h de culture. L'espèce *Fusarium* sp. a la capacité de produire des enzymes de type protéase pendant le processus d'infection (Pekkarinen *et al* 2000, Ahmad *et al* 2006, Andrade *et al* 2002, Farnworth *et al* 2003, and El-Shora *et al* 2008). Pekkarinen *et al* (2000)

ont trouvé que l'activité protéasique est détectable jusqu'au moment où le glucose est complètement utilisé par *F. culmorum* et *F. graminearum* dans un milieu minéral. C'est possible que l'activité protéasique de *F. langsethiae* 035 en combinaison avec l'activité de la Protéase XIV ait facilité la dégradation et la consommation des nutriments, et pour cette raison la phase exponentielle a duré 24 heures plus que dans le milieu témoin Ym.

La croissance de *F. langsethiae* dans les milieux E2 et E3 a été plus lente que celle sur le milieu témoin et une réduction de 77% et 93% est observée dans la vitesse de croissance. La culture de *F. langsethiae* 035 dans les milieux traités avec l' α -chymotrypsine type II et la pepsine a montré une phase de latence de 24 heures (Figure 68). Ce retard dans la croissance peut être dû au changement des conditions du milieu. Par conséquent, la concentration maximale de biomasse a été atteinte après 96h de culture ($2,9 \pm 0,7$ g/L) dans le milieu E2 et après 72h dans le milieu E3 ($2,1 \pm 0,3$ g/L).

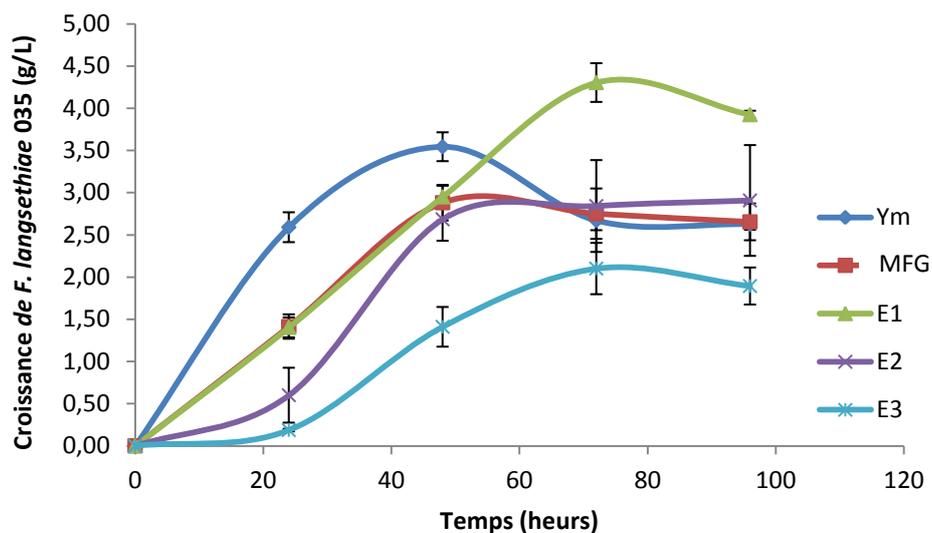


Figure 68. Effet des traitements enzymatiques du milieu MFG sur la croissance de *F. langsethiae* 035 (Ym : milieu témoin, MFG : milieu pré-fermenté par *G. candidum* et non traité enzymatiquement, E1 : milieu MFG traité avec l'enzyme Protéase XIV, E2 : milieu MFG traité avec l'enzyme α -chymotrypsine II, E3 : milieu MFG traité avec l'enzyme pepsine).

En considérant l'hypothèse que l'agent actif présent dans le milieu pré-fermenté par *G. candidum* est de nature protéique, après les traitements enzymatiques, la concentration de la toxine T-2 doit être supérieure à celle obtenue dans le milieu MFG non traité ($0,09 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ après 48h) ou proche de celle obtenue dans le témoin Ym ($6,1 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ après 48h) lors de la croissance de *F. langsethiae* 035. La Figure 69 montre que les concentrations de la toxine T-2 quantifiées dans les milieux traités avec les différentes enzymes sont les plus faibles. Une réduction de la concentration de la toxine T-2 pendant la culture de *F. langsethiae* 035 supérieure à 98% est observée dans le milieu MFG et tous les milieux MFG traités avec des enzymes protéolytiques par rapport au témoin Ym.

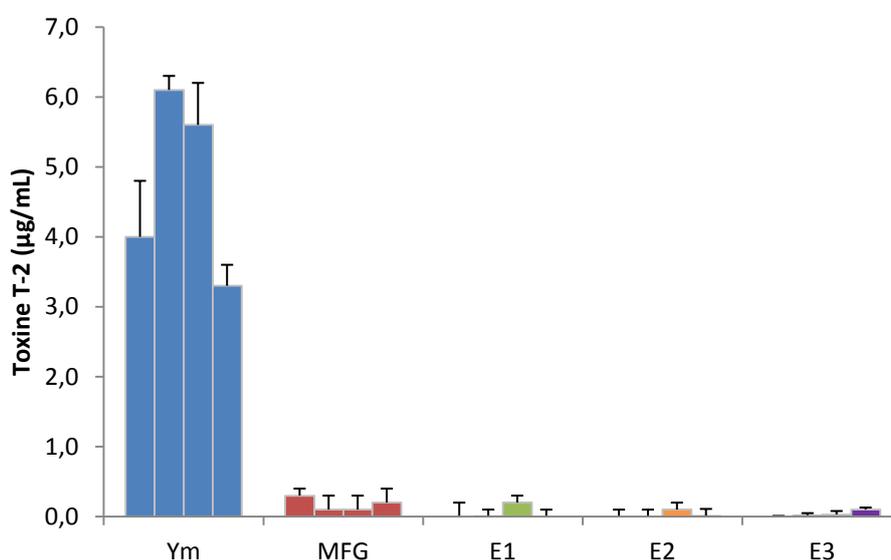


Figure 69. Effet des traitements enzymatiques du MFG sur la production de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 (Ym : milieu témoin, MFG : milieu pré-fermenté par *G. candidum* et non traité enzymatiquement, E1 : milieu MFG traité avec l'enzyme Protéase XIV, E2 : milieu MFG traité avec l'enzyme α -chymotrypsine II, E3 : milieu MFG traité avec l'enzyme pepsine).

L'activité de contrôle de la concentration de la toxine T-2 par le milieu fermenté par *G. candidum* n'a pas été affectée par les activités protéolytiques des enzymes testées. Cela suggère que la nature de l'agent actif du milieu MFG qui contrôle la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* 035 dans le milieu MFG n'est pas de

nature protéique. Pendant les cultures de *F. langsethiae* 035 dans les milieux MFG traités avec les enzymes protéolytiques, la concentration de la toxine T-2 est réduite de manière significative par rapport à celle obtenue dans le milieu témoin Ym, de la même manière que sur le milieu MFG non traité.

Dieuleveux et al. (1998b) ont trouvé que *G. candidum* produit et excrète des métabolites ayant une activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes*. Ils ont identifié ces composants comme du D-3-phenyllactic acide et du D-3-indollactic acide. Ils ont aussi trouvé que l'acide D-3-phenyllactic (PLA) a une action contre des bactéries Gram (+) comme *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* et des bactéries Gram (-) comme *Providencia stuartii* et *Klebsiella oxytoca* (Dieuleveux et al., 1998a). Dans ces études, ils ont rapporté que le PLA provoque des changements dans le comportement et dans la structure bactérienne de *L. monocytogenes*. La bactérie forme des agrégats et secrète des polysaccharides, puis la paroi perd de sa rigidité et par conséquent la cellule explose. Ils ont trouvé que s'ils ajoutent le PLA dans la phase de latence il y a une réduction de 100 fois du développement de *L. monocytogenes* mais la réduction est de 1000 fois si le PLA est ajouté dans la phase exponentielle (Dieuleveux and Guéguen, 1998). Lavermicocca et al. (2003) ont rapporté qu'une concentration inférieure à 7,5 mg/mL inhibe jusqu'à 90% de la croissance des 23 espèces fongiques qu'ils ont testées (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*). Une activité fongicide est observée à une concentration du PLA inférieure ou égale à 10 mg/mL. Dans les espèces mycotoxiques *P. verrucosum*, *P. citrinum* et *P. roqueforti* l'addition de PLA retarde la croissance jusqu'à 2 jours.

Dans la culture pure de *G. candidum* nous avons détecté une odeur caractéristique. Le standard de l'acide D-3-phenyllactic présente cette même odeur. Par rapport aux études rapportées sur *G. candidum*, le PLA et l'odeur perçue, il est très probable que dans le milieu fermenté par *G. candidum* de l'acide D-3-phenyllactic soit produit. Cependant, à la différence de ce qui a été mentionné plus haut, nous n'avons pas observé d'effet sur la croissance de *F. langsethiae*. Ainsi, il semble peu probable que le PLA soit l'agent responsable de l'activité de contrôle de la production de la toxine T-2. Cependant, nous n'avons pas eu le temps de tester cette hypothèse.

9. Conclusions

L'objectif de ces travaux était de comprendre l'interaction entre *F. langsethiae* et *G. candidum* pour caractériser l'activité de contrôle de la production de la toxine T-2. Pour arriver à faire cet objectif, nous avons établi des objectifs spécifiques.

Nous avons réussi à développer un milieu de culture liquide Ym, dans laquelle *F. langsethiae* et *G. candidum* se développent de manière similaire. Dans ce milieu, *F. langsethiae* arrive à produire une concentration maximale de biomasse de 3,5 à 4 g/L et peut produire la toxine T-2 à une concentration maximale de 6 µg/mL après 48h de culture (22° C, 200 rpm). L'isolat 035 est capable de changer la coloration du milieu Ym de jaune à violette après 48 de culture. Ce n'est pas le cas avec l'isolat 033 dont le milieu Ym reste jaune. Sur le milieu Ym, *G. candidum* peut produire une concentration maximale de biomasse de 2,8 à 3,0 g/L après 24h de culture.

Dans ce travail, la mise au point d'une méthodologie de détection/quantification par HPLC-FLD de la toxine T-2 a été établie. Nous avons trouvé que l'extraction liquide-liquide avant la détermination n'est pas nécessaire dans cette technique. La méthode adaptée (Pascale et al., 2003; Trebstein et al., 2009; Trebstein et al., 2008; Visconti et al., 2005) nous a permis de détecter la toxine dans la gamme de 0,05 à 1,0 µg/mL.

L'interaction indirecte de ces 2 micro-organismes a été faite par cultures séquentielles. En premier, nous avons évalué la croissance de *F. langsethiae* dans le milieu pré-fermenté par *G. candidum*. Nous avons trouvé que *F. langsethiae* peut se développer dans le milieu MFG. Par contre la concentration de la toxine T-2 produite pendant la croissance dans ce milieu est au moins réduite de 90%. Ensuite, nous avons évalué la croissance de *G. candidum* dans le milieu pré-fermenté par *F. langsethiae*. Dans ce test *G. candidum* s'est développé aussi bien qu'en culture pure. La concentration de la toxine T-2 présente dans le milieu MFF (≈1 µg/mL) est restée constante pendant la croissance de *G. candidum*. Finalement, on a testé l'interaction entre les milieux pré-fermentés MFG et MFF. Dans ce test, la concentration initiale de la toxine T-2 présente dans le milieu MFF n'a pas changé pendant l'interaction.

Pour les tests d'interaction directe, nous avons d'abord utilisé le bioréacteur à membrane. Par contre, à cause de la croissance de *F. langsethiae* sous forme de filaments sur/dans la membrane, son emploi n'a pas été possible. Nous avons alors utilisé la co-culture pour faire les tests d'interaction directe. *F. langsethiae* et *G. candidum* se sont développés moins que dans les cultures pures de chaque micro-organisme. L'isolat 035 de *F. langsethiae* qui en culture pure présente une coloration violette après 48h, n'a jamais donné cette couleur violette dans le milieu en présence de *G. candidum*. La concentration de la toxine T-2 en co-culture est réduite de plus de 90% par rapport à la concentration détectée en culture pure de *F. langsethiae*. La morphologie filamenteuse des deux micro-organismes a limité l'utilisation de techniques qualitatives (microscope optique) ou quantitatives basiques (détermination du PS, comptage sur cellules de comptage) pour le suivi de leur croissance. Pour cette raison, nous avons utilisé la technique de Double-labeling of Oligonucleotide Probe for Fluorescent *In Situ* Hybridization (DOPE-FISH), laquelle nous a permis de différencier les deux micro-organismes. *F. langsethiae* a une auto-fluorescence naturelle de couleur jaune à 470 nm et *G. candidum* est hybridé avec une oligosonde pour fluorescer en vert. Le suivi de la co-culture chaque 24h nous a montré que ces micro-organismes peuvent se développer au contact direct l'un de l'autre. Dans les observations de la co-culture il apparaît que la coloration verte est plus marquée que la coloration jaune, c'est-à-dire que *G. candidum* s'est mieux développé que *F. langsethiae*. La quantification de l'ADN (nombre de génomes) en co-culture nous a permis d'estimer par corrélation de la biomasse au nombre de génomes en culture pure, la concentration de la biomasse de *F. langsethiae* et de *G. candidum* en co-culture. Les résultats ont montré que le développement des deux micro-organismes en mélange est inférieur à celui en culture pure. La présence de *G. candidum* n'inhibe pas la croissance de *F. langsethiae*. Mais il y a un effet sur la production de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae*, sa concentration diminue de plus de 90%.

D'après les résultats, le milieu pré-fermenté par *G. candidum* contient un métabolite ayant un effet sur la production de la toxine T-2. Finalement nous avons réalisé des traitements thermique et enzymatique du milieu MFG pour déterminer si la nature de cet agent actif était protéique. Nous avons fait l'hypothèse que si la nature de l'agent actif était protéique, les traitements thermique et enzymatique pourraient dégrader l'agent et la concentration de la toxine T-2 pourrait alors être proche de celle obtenue pendant la croissance de *F. langsethiae* en culture pure. Les résultats ont montré que la nature de l'agent actif n'est pas protéique. Dans le milieu traité thermiquement, la concentration de la toxine T-

2 pendant la croissance de *F. langsethiae* est restée inférieure de plus de 90% à la concentration témoin (Y_m). Les traitements enzymatiques ont montré les mêmes résultats, la concentration de la toxine T-2 n'a jamais été proche de la concentration observée dans la culture pure témoin de *F. langsethiae*. Des données de la littérature sur *G. candidum* mentionnent que la levure a la capacité de produire et d'excréter un métabolite ayant une activité inhibitrice sur *L. monocytogenes*, sur des bactéries Gram (+) et Gram (-) appelé acide D-3-phenyllactic. Ce métabolite change la structure, le comportement et la rigidité de la paroi bactérienne. En plus, l'acide D-3-phenyllactic peut inhiber jusqu'à 90% la croissance des champignons du type *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Dans notre travail, la culture pure de *G. candidum* a une odeur caractéristique qui est similaire à l'odeur de l'acide D-3-phenyllactic pure. Il est probable que la souche de *G. candidum* utilisée dans ces travaux soit une productrice de l'acide phenyllactic. Mais il est peu probable que ce métabolite soit le responsable de la très basse production de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae* dans le milieu MFF et en co-culture du fait que la croissance de *F. langsethiae* est très peu touchée.

De manière générale, nous pouvons dire que :

- Pendant l'interaction entre *F. langsethiae* et *G. candidum*, les deux micro-organismes peuvent se développer.
- *F. langsethiae* n'est pas inhibé par la présence de *G. candidum*.
- *G. candidum* ne dégrade pas la toxine T-2 présente dans le milieu pré-fermenté par *F. langsethiae* (MFF).
- La présence de *G. candidum* pendant la croissance de *F. langsethiae* affecte la production de la toxine T-2, réduction supérieure à 90% par rapport à celle en culture pure.
- Le milieu pré-fermenté par *G. candidum* contient un agent actif qui est responsable de l'effet réducteur de la production de la toxine T-2 par *F. langsethiae*.
- La technique DOPE-FISH est une méthodologie utile pour différencier qualitativement les micro-organismes en co-culture.
- La quantification de l'ADN (nombre de génomes) nous a permis d'estimer la concentration de la biomasse de *F. langsethiae* et *G. candidum* en co-culture par corrélation de la biomasse et du nombre de génomes en culture pure.
- L'agent actif est thermiquement stable et actif jusqu'à 120° C/20 min.

- L'agent actif est stable aux traitements enzymatiques protéolytiques (protéase, α -chymotrypsine et pepsine).
- Aucun traitement thermique ou enzymatique n'a réussi à inactiver l'agent actif.

10. Perspectives

- Déterminer le mode d'action de l'agent actif produit par *G. candidum*.
 - Caractériser l'agent actif produit par *G. candidum* : possibilité que l'agent soit l'acide D-3-phényllactique. Même si les données bibliographiques indiquent une activité inhibitrice sur la croissance, dans ce travail nous n'avons pas observé cet effet sur *F. langsethiae*.
 - Valider la production de l'acide D-3-phényllactique par notre souche et mettre en place une méthodologie de détection et de quantification de l'acide D-3-phényllactique dans le surnageant produit par *Geotrichum*.
 - Déterminer si l'agent actif a un effet sur l'excrétion de la toxine : déterminer la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance à l'intérieur des filaments par rupture cellulaire (méthodes enzymatiques, sonication, etc) en culture pure et en co-culture.
 - Evaluer l'effet de l'agent sur la voie de biosynthèse de la toxine T-2 lors de l'interaction directe : effets sur l'expression du gène *Tri5*.
- Déterminer les concentrations minimales inhibitrices de l'agent actif, qui affectent la concentration de la toxine T-2 pendant la croissance de *F. langsethiae*
 - Effet sur la croissance des autres souches de *F. langsethiae*
 - Effet sur la concentration des autres mycotoxines (DON, OTA, etc) produites par autres champignons (*Aspergillus*, *Penicillium*, etc).
- Etudier/optimiser les conditions de culture (température, pH, agitation, temps de culture, culture batch, fed-batch, continu...) pour augmenter la concentration de l'agent actif produit par *G. candidum*.
- Evaluer si économiquement l'application de l'agent actif/*G. candidum* sur l'orge de brasserie est viable pour réduire la concentration des toxines en malterie.
- Evaluer la possible application de l'agent actif sur d'autres produits alimentaires.

11. Références Bibliographiques

- Adour, L., Couriol, C., Amrane, A., and Prigent, Y. (2002). Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in liquid media in relation with the consumption of carbon and nitrogen sources and the release of ammonia and carbon dioxide. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 533-542.
- Alexander, N. J., McCormick, S. P., and Blackburn, J. A. (2008). Effects of xanthotoxin treatment on trichothecene production in *Fusarium sporotrichioides*. *Can J Microbiol* 54, 1023-31.
- Amaha, M., and Kitabatake, K. (1981). Gushing in beer. In "Brewing Science", Vol. 2, pp. 457-489. Academic Press, London.
- Assas, N., Ayed, L., Marouani, L., and Hamdi, M. (2002). Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 38, 361-365.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., and Lebrihi, A. (2006). Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *Int J Food Microbiol* 111, Supplement 1, S46-S52.
- Berger, U., Oehme, M., and Kuhn, F. (1999). Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 47, 4240-4245.
- Berjak, P., Whittaker, A., and Mycock, D. J. (1992). Wet-heat treatment: A promising method for the elimination of mycoflora from maize grains. *S. AFR. J. SCI* 88, 346-349.
- Bhattacharyya, M. S., Singh, A., and Banerjee, U. C. (2008). Production of carbonyl reductase by *Geotrichum candidum* in a laboratory scale bioreactor. *Bioresour Technol* 99, 8765-70.
- Binder, E. M., Tan, L. M., Chin, L. J., Handl, J., and Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137, 265-282.

- Blesa, J., Meca, G., Rubert, J., Soriano, J. M., Ritieni, A., and Manes, J. (2010). Glucose influence on the production of T-2 toxin by *Fusarium sporotrichioides*. *Toxicon* 55, 1157-61.
- Boivin, P., and Malanda, M. B. (1999). Inoculation by *Geotrichum candidum* during malting of cereals or other plants. Vol. 5,955,070. Institut Français des Boissons de la Brasserie, France.
- Bottalico, A., and Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grains in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 611-624.
- Boutrou, R., and Gueguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int J Food Microbiol* 102, 1-20.
- Čonková, E., Laciaková, A., Kováč, G., and Seidel, H. (2003). Fusarial Toxins and their Role in Animal Diseases. *The Veterinary Journal* 165, 214-220.
- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 127, 19-28.
- Croteau, S. M., Prelusky, D. B., and Trenholm, H. L. (1994). Analysis of Trichothecene Mycotoxins by Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. *J. Agric. Food Chem.* 42, 928–933.
- Dallasta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gasparini, M., Sforza, S., Dossena, A., and Marchelli, R. (2004). Simultaneous liquid chromatography?fluorescence analysis of type A and type B trichothecenes as fluorescent derivatives via reaction with coumarin-3-carbonyl chloride. *Journal of Chromatography A* 1047, 241-247.
- Desjardins, A. E., Hohn, T. M., and McCormick, S. P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews* 57, 595-604.
- Dieuleveux, V., and Guéguen, M. (1998). Antimicrobial Effects of D-3-Phenyllactic Acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE Medium, Milk, and Cheese. *Journal of Food Protection* 61, 1281-1285.
- Dieuleveux, V., Lemarinier, S., and Guéguen, M. (1998a). Antimicrobial spectrum and target site of d-3-phenyllactic acid. *Int J Food Microbiol* 40, 177-183.

- Dieuleveux, V., Van Der Pyl, D., Chataud, J., and Gueguen, M. (1998b). Purification and characterization of anti-listeria compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 800-803.
- Dohnal, V., Jezkova, A., Jun, D., and Kuca, K. (2008). Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism* 9, 77-82.
- Edwards, S. G., Barrier-Guillot, B., Clasen, P.-E., Hietaniemi, V., and Pettersson, H. (2009). Emerging issues of HT-2 and T-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal* 2, 173-179.
- European-Commission (2001). Fusarium toxins Part 5: T-2 toxin and HT-2 toxin. (S. C. o. Food, ed.).
- Fournier, R. (2009). *Fusarium langsethiae*, from barley culture (*Hordeum vulgare*) to the finished product (beer) and byproducts: study of the biology and the epidemiology of the pathogen, the conditions of T2/HT2 toxins production, of their transfer, their biological breakdown and of their toxicity, for a better sanitary risk management. In "ISM Conference", pp. Poster 052, Tulln.
- Fournier, R., and Boivin, P. (2007). Suivis visuel et biomoléculaire des populations de *Fusarium* toxigènes et des toxines produites sur les orges de brasserie françaises au cours des récoltes 2003 à 2006. In "Colloque Fusariotoxines des Céréales", pp. 1-11, Arcachon.
- Fredenhagen, A., Molleyres, L.-P., Böhlendorf, B., and Laue, G. (2006). Structure determination of Neofrapeptins A to N: peptides with insecticidal activity produced by the fungus *Geotrichum candidum*. *J. Antibiot* 59, 267-280.
- Santos, M. A., and Ramos Gómez, E. (2000). Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 35, 751-758.
- Grosjean, F., and Barrier-Guillot, B. (2004). Mycotoxins in feedstuffs produced or imported in Europe for animal feeds. *International Society for Animal Hygiene*, 223-224.

- Groves, F. D., Zhang, L., Chang, Y. S., Ross, P. F., Casper, H., Norred, W. P., You, W. C., and Fraumeni, J. F. J. (1999). Fusarium mycotoxins in corn and corn products in a high-risk area for gastric cancer in Shandong Province, China. *J Assoc Off Anal Chem Int* 82, 657-662.
- Guéguen, M. (1984). Contribution to knowledge of *Geotrichum candidum* and in particular to its variation. Consequences for Dairy Technology., Université de Caen, Caen, France.
- Guéguen, M., Delespaul, G., and Lenoir, J. (1974). La flore fongique superficielle des fromages de St-Nectaire et de tome de Savoie. In "Revue Laitière Française", Vol. 325, pp. 795-816, France.
- Hazel, C. M., and Patel, S. (2004). Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol Lett* 153, 51-9.
- Hietaniemi, V., and Kumpulainen, J. (1991). Contents of Fusarium toxins in Finnish and imported grains and feeds. *Food Additives and Contaminants* 8, 171-181.
- Jiménez, M., Mateo, J. J., and Mateo, R. (2000). Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 870, 473-481.
- Kim, S. J., and Shoda, M. (1999). Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1029-1035.
- Kocic-Tanackov, S. D., Skrinjar, M. M., Grujic, O. S., and Pejin, J. D. (2005). Fungal growth during malting of barley. *Acta Periodica Technologica* 2005, 51-60.
- Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., and Jestoi, M. (2010). Mycotoxin production of selected Fusarium species at different culture conditions. *Int J Food Microbiol* 143, 17-25.
- Koshinsky, H. A., Cosby, R. H., and Khachatourians, G. G. (1992). Effects of T-2 toxin on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem.* 16, 275-286.
- Kotal, F., Holadová, K., Hajšlová, J., Poustka, J., and Radová, Z. (1999). Determination of trichothecenes in cereals. *Journal of Chromatography A* 830, 219-225.
- Kottapalli, B., and Wolf-Hall, C. E. (2008). Effect of hot water treatments on the safety and quality of Fusarium-infected malting barley. *Int J Food Microbiol* 124, 171-8.

- Kottapalli, B., Wolf-Hall, C. E., and Schwarz, P. (2006). Effect of electron-beam irradiation on the safety and quality of Fusarium-infected malting barley. *Int J Food Microbiol* 110, 224-31.
- Kottapalli, B., Wolf-Hall, C. E., Schwarz, P., Schwarz, J., and Gillespie, J. (2003). Evaluation of hot water and electron beam irradiation for reducing Fusarium infection in malting barley. *J. Food Prot.* 66, 1241-1246.
- Krska, R., Baumgartner, S., and Josephs, R. (2001). The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 371, 285-299.
- Lafont, J., Romand, A., and Lafont, P. (1981). Effect of mycotoxins on the rate of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycopathologia* 74, 119-123.
- Langseth, W., and Rundberget, T. (1998). Instrumental methods for determination of nonmacrocytic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A* 815, 103-121.
- Lattanzio, V. M. T., Pascale, M., and Visconti, A. (2009). Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28, 758-768.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., and Visconti, A. (2003). Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 634-640.
- Lee, T. H., Aoki, H., Sugano, Y., and Shoda, M. (2000). Effect of molasses on the production and activity of dye-decolorizing peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89, 545-549.
- Lemaesquier, H. (1987). Inter-relationships between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the Champagne area and lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 4, 91-94.
- Lippolis, V., Pascale, M., Maragos, C. M., and Visconti, A. (2008). Improvement of detection sensitivity of T-2 and HT-2 toxins using different fluorescent labeling reagents by high-performance liquid chromatography. *Talanta* 74, 1476-83.

- Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., and Bottalico, A. (2002). Toxinogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 597-609.
- Luo, Y., Yoshizawa, T., and Katayama, T. (1990). Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 3723-3726.
- Marasas, W. F. O., Yagen, B., Sydenham, E., Combrinck, S., and Thiel, P. G. (1987). Comparative yields of T-2 toxin and related trichothecenes from five toxicologically important strains of *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 693-698.
- Mateo, J. J., Mateo, R., and Jiménez, M. (2002). Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *Int J Food Microbiol* 72, 115-123.
- McMullen, M. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis* 81, 1340-1348.
- Medina, A., and Magan, N. (2011). Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiol* 28, 392-8.
- Molimard, P., and Spinnler, H. E. (1995). Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169-184.
- Moss, M. O., and Thrane, U. (2004). *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicol Lett* 153, 23-8.
- Nakamura, K., Inoue, Y., Matsuda, T., and Misawa, I. (1999). Stereoselective oxidation and reduction by immobilized *Geotrichum candidum* in an organic solvent. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2397-2402.
- Nielsen, M. S., Frisvad, J. C., and Nielsen, P. V. (1998). Colony Interaction and Secondary Metabolite Production of Cheese-Related Fungi in Dual Culture. *Journal of Food Protection* 61, 1023-1029.

- Onji, Y., Aoki, Y., Tani, N., Umebayashi, K., Kitada, Y., and Dohi, Y. (1998). Direct analysis of several Fusarium mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 815, 59-65.
- Park, J. C., Zong, M. S., and Chang, I. M. (1991). Survey of the presence of the Fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and T-2 toxin in Korean cereals of the 1989 harvest. *Food Addit Contam.* 8, 447-451.
- Pascale, M., Haidukowski, M., and Visconti, A. (2003). Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthrolylnitrile. *Journal of Chromatography A* 989, 257-264.
- Peng, S., Dong, J., and Yang, J. (1996). Studies on relationship between toxicity of trichothecene toxin T-2 and its structure. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 30, 141-143.
- Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F., and Macdonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78, 21-37.
- Plihon, F., Le Doujet, S., Amrane, A., and Prigent, Y. (1998). Effect of amino acids on the growth of submerged cultures of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii*. *Journal of Food Mycology* 1, 203-210.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (2002). "Microbiology," McGraw-Hill.
- Rafai, P., Bata, A., Vanyi, A., Papp, Z., Brydl, E., Jakab, L., Tuboly, S., and Tury, E. (1995). Effect of various levels of T-2 toxin on the clinical status, performance and metabolism of growing pigs. *Veterinary Record* 136, 489-489.
- Rajakylä, E., Laasasenaho, K., and Sakkars, P. J. (1987). Determination of mycotoxins in grain by high-performance liquid chromatography and thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 384, 391-402.
- Ramakrishna, N., Lacey, J., and Smith, J. E. (1991). Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. *Int J Food Microbiol* 13, 47-54.

- Ramírez Santos, J., Contreras Ferrat, G., and Gómez Eichelmann, M. C. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47, 92-101.
- Renouf, V. (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin: Interactions et équilibres - Relation avec la qualité du vin., INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE Toulouse, Fr.
- Robinson, P. M., McKee, N. D., Thompson, L. A. A., Harper, D. B., and Hamilton, J. T. G. (1989). Autoinhibition of germination and growth in *Geotrichum candidum*. *Mycological Research* 93, 214-222.
- Samson, R. A., Hong, S.-B., and Frisvad, J. C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44, 133-148.
- Schollenberger, M., Lauber, U., Jara, H. T., Suchy, S., Drochner, W., and Müller, H. M. (1998). Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 815, 123-132.
- Schollenberger, M., Muller, H. M., Ruffle, M., Suchy, S., Dejanovic, C., Frauz, B., Oechsner, H., and Drochner, W. (2008). Simultaneous determination of a spectrum of trichothecene toxins out of residuals of biogas production. *J Chromatogr A* 1193, 92-6.
- Scott, P., and Trucksess, M. W. (1997). Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *J Assoc Off Anal Chem Int* 80, 941-949.
- Scudamore, K. A., Nawaz, S., and Hetmanski, M. T. (1998). Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Addit Contam.* 15, 30-55.
- Stoecker, K., Dorninger, C., Daims, H., and Wagner, M. (2010). Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Appl Environ Microbiol* 76, 922-6.
- Strub, C., Pocaznoi, D., Lebrihi, A., Fournier, R., and Mathieu, F. (2010). Influence of barley malting operating parameters on T-2 and HT-2 toxinogenesis of *Fusarium langsethiae*, a worrying contaminant of malting barley in Europe. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 27, 1247-52.

- Sudakin, D. (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicol Lett* 143, 97-107.
- Sweeney, M. J., and Dobson, A. D. W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol* 43, 141-158.
- Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Sugiura, Y., and Ueno, Y. (2000). Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 882, 23-28.
- Tariq, V. N., and Campbell, V. M. (1991). Influence of volatile metabolites from *Geotrichum candidum* on other fungi. *Mycological Research* 95, 891-893.
- Torp, M., and Nirenberg, H. I. (2004). *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *Int J Food Microbiol* 95, 247-56.
- Toussaint, J., Fournier, R., Goergen, J.-L., and Boivin, P. (2009). Visual detection tool for T-2 and HT-2 toxins contaminated parcels and post-harvest mycotoxins reduction on malting barley. In "ISM conference", pp. Poster 056, Tulln.
- Trebstein, A., Marschik, S., Lauber, U., and Humpf, H.-U. (2009). Acetonitrile: the better extractant for the determination of T-2 and HT-2 toxin in cereals using an immunoaffinity-based cleanup? *European Food Research and Technology* 228, 519-529.
- Trebstein, A., Seefeldt, W., Lauber, U., and Humpf, H.-U. (2008). Determination of T-2 and HT-2 toxins in cereals including oats after immunoaffinity cleanup by liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4968-4975.
- Trenholm, H. L., Charmley, L. L., Prelusky, D. B., and Warner, R. M. (1992). Washing procedures using water or sodium carbonate solutions for the decontamination of three cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2147-2151.
- Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., and Visconti, A. (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol Lett* 233, 289-95.
- van den Tempel, T., and Nielsen, M. S. (2000). Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *Int J Food Microbiol* 57, 193-199.

- Visconti, A., Lattanzio, V., Pascale, M., and Haidukowski, M. (2005). Analysis of T-2 and HT-2 toxins in cereal grains by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1075, 151-158.
- Westlake, K., Mackie, R. I., and Dutton, M. F. (1987). T-2 toxin metabolism by rumial bacteria and its effect on their growth. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 587-592.
- Wilson, A., Simpson, D., Chandler, E., Jennings, P., and Nicholson, P. (2004). Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiol Lett* 233, 69-76.
- Wolf-Hall, C. E. (2007). Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int J Food Microbiol* 119, 89-94.
- Yoshizawa, T., Mirocha, C. J., Behrens, J. C., and Swanson, S. P. (1981). Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. *Food and Cosmetics Toxicology* 19, 31-39.
- Yoshizawa, T., Swanson, S. P., and Mirocha, C. J. (1980). In vitro metabolism of T-2 toxin in rats. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 901-906.
- Young, J. C., Blackwell, B. A., and ApSimon, J. W. (1986). Alkaline degradation of the mycotoxin 4-deoxynivalenol. *Tetrahedron Letters* 27, 1019-1022.
- Young, J. C., Trenholm, H. L., Friend, D. W., and Prelusky, D. B. (1987). Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs. *J. Agric. Food Chem.* 35, 259-261.

12. ANNEXES

Annexe 1 : CONSERVATION DE *Fusarium langsethiae*.

a) Repiquage de *Fusarium langsethiae*.

Le repiquage de *F. langsethiae* 033 et 035 est fait à partir d'une boîte de Pétri après croissance. La figure A1 illustre la méthodologie. Un cube de gélose d'environ 1cm² est coupé et mis dans une nouvelle boîte de Pétri (milieu PDA). La surface qui contient les spores et filaments est mise en contact direct sur la surface de la nouvelle boîte. *F. langsethiae* est cultivé pendant 7-10 jours à 22° C. Puis les boîtes sont para-filmées et stockées au frigo à 4° C.

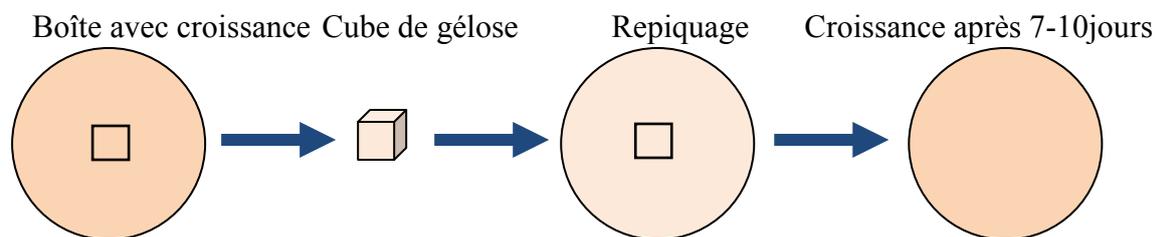


Figure A1. Méthodologie de repiquage de *F. langsethiae* 033 et 035 à 22° C.

b) Cryotubes de *Fusarium langsethiae* 033, milieu MGOx.

Nous avons essayé de standardiser la concentration d'inoculum de *F. langsethiae*, à partir du stock de spores en cryotube (-20° C). Le milieu MGOx permet la sporulation de *F. langsethiae* 033 en culture liquide avec une faible production des filaments. Pour cette raison nous avons stocké en cryotube les spores à -20° C. La méthodologie utilisée est montrée dans la figure A2. Après une culture de 3 jours de *F. langsethiae* 033, les spores sont rincées et concentrées, puis stockage dans le milieu Ym en présence de glycérol à -20° C.

Malheureusement, cette technique de stockage n'a pas été utilisée car *F. langsethiae* 033 perdait sa capacité de production de la toxine T-2 après décongélation et remise en culture.

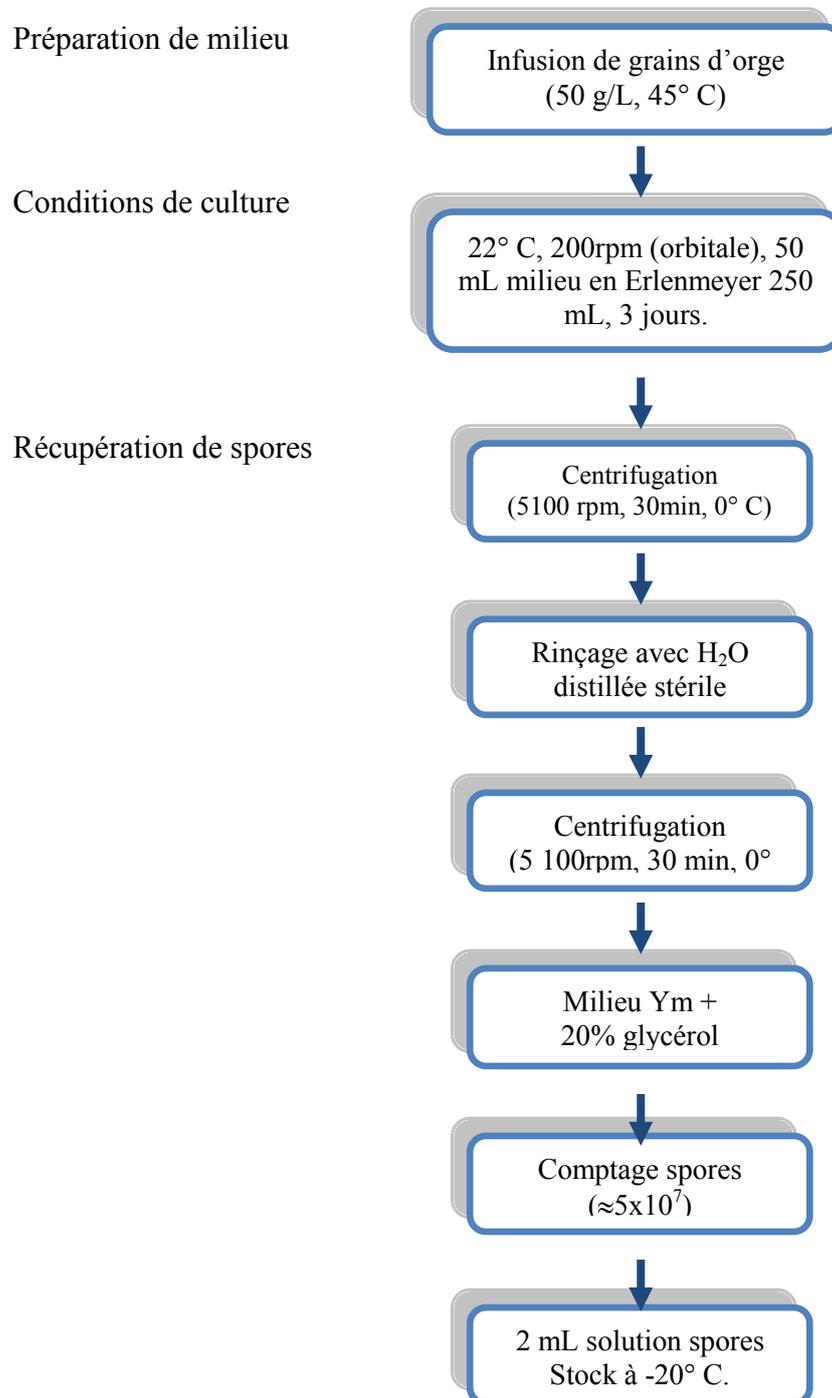


Figure A2. Méthodologie de stockage de spores en cryotube à -20° C de *F. langsethiae* 033 à partir de culture liquide (milieu : MGOx)

c) Cryotubes *F. langsethiae* 033, à partir de boîte de Pétri.

Après la perte de la capacité de production des toxines T-2 et HT-2 par *F. langsethiae* 033, au lieu de stocker les spores formées en culture liquide (milieu MGOx) nous avons décidé de mettre en cryotube les spores obtenues à partir de boîte de Pétri. Après la croissance sur boîte de Pétri de *F. langsethiae* (7-10 jours, 22° C, milieu PDA), les spores sont grattées avec un triangle stérile à l'aide d'une solution Tween 0,1%. Puis la solution de spores est additionnée de 20% de glycérol (v/v) avant le stockage en cryotube à -20° C.

Les spores de *F. langsethiae* 033 et 035 qui ont été stockées avec cette technique, ont encore perdu leur capacité de production des toxines après quelque mois de stockage. Après les tests de stockage en cryotube à -20° C, nous avons décidé de conserver la souche en boîte de Pétri et de la repiquer de la même manière chaque 3 mois.

Le but de stocker les spores de *F. langsethiae* en cryotube était de standardiser la concentration initiale d'inoculation. Par contre ce type de stockage n'a pas été possible à cause de la perte de production de toxines par *F. langsethiae* 033 et 035. A partir des boîtes on procède différemment : la récupération de spores et la pré-culture. La figure A3 montre les étapes de grattage de spores jusqu'au début de la pré-culture. 10mL de milieu de culture Ym sont ajoutés dans la boîte de Pétri qui contient la croissance de *F. langsethiae* (Figure A3a), après les spores sont grattées avec le triangle (figure A3b) et le milieu avec les spores est récupéré avec une pipette (figure A3c). Un volume d'environ 9mL est récupéré et puis inoculé dans l'Erlenmeyer (figure A3d) pour commencer la pré-culture qui dure 3 jours (22° C, 200rpm).

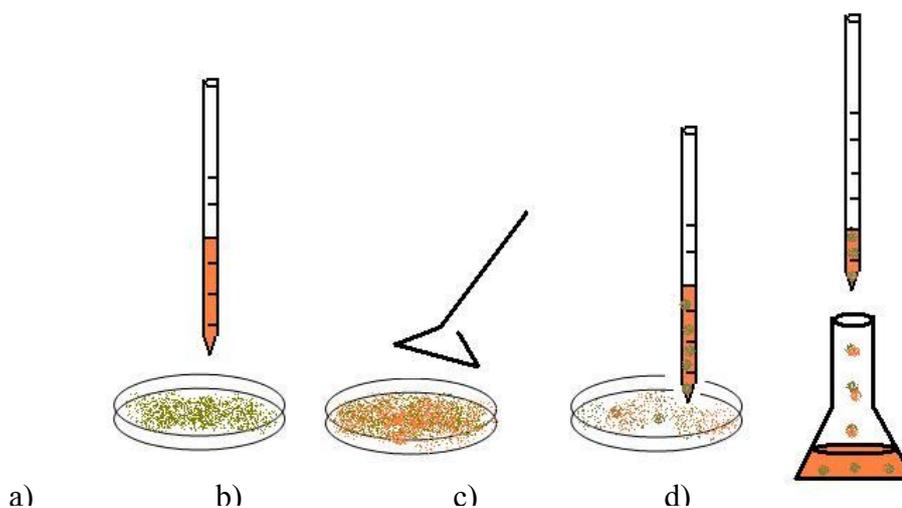


Figure A3. Etapes d'inoculation de spores de *F. langsethiae* pour la pré-culture.

ANNEXE 2: Conservation de *Geotrichum candidum*.

a) Repiquage de *G. candidum*.

La souche lyophilisée de *G. candidum* (Cargill) a un temps de vie de 3 mois après ouverture du sachet. Le repiquage de cette souche est fait en boîte de Pétri (milieu PDA) chaque 2 mois.

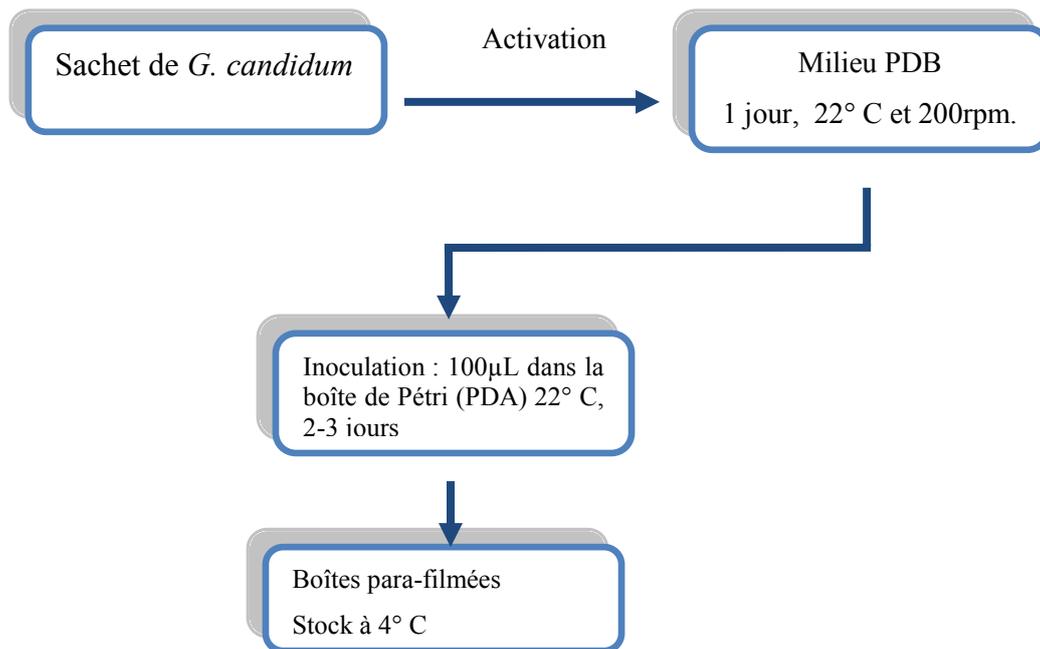


Figure A4. Méthodologie de repiquage de *G. candidum*.

b) Conservation en cryotubes

Dans le but de conserver les cellules de *G. candidum*, le stockage en cryotube à -20° C a été testé. Après l'activation des cellules lyophilisées dans le milieu Ym (22° C, 200 rpm, 2 jours), les cellules sont lavées avec Na₂HPO₄ (0,1M pH 7,0) 2 fois et suspendues dans le milieu Ym + 20% de glycérol (v/v). Puis 2 mL de cette suspension de cellules sont stockés en cryotubes à -20° C.

Un test d'activation après stockage après 1, 3 et 6 semaines de stockage a été fait pour évaluer la viabilité des cellules. 1 cryotube a été inoculé dans 100 mL de milieu Ym (22° C,

200rpm) et la croissance a été suivie pendant 5 jours pour vérifier la capacité de *G. candidum* à se développer après le stock à -20° C.

Malheureusement, après 5 jours de culture *G. candidum* ne s'est pas développé. Le même problème a été observé après 3 et 6 semaines de stockage. *G. candidum* est affecté de manière négative par le stockage en cryotube à -20° C.

Pour cette raison, le stock de *G. candidum* est fait en boîte de Pétri contenant du milieu PDA à 4° C, et le repiquage est fait chaque 2-3 mois.

ANNEXE 3 : Perte de la production des toxines par *F. langsethiae*.

Pendant les tests réalisés au cours de la thèse, plusieurs fois une perte de la production de la toxine T-2 a été détectée avec la souche de *F. langsethiae*033. Le tableau suivant montre les changements de la concentration de la toxine T-2 détectés au cours de temps.

Date	T-2 ($\mu\text{g/mL}$)	Lieu de la détermination
2009	0,943	Qualtech
Avril-2010	$1,3 \pm 0,01$	ENSAT
Juin-2010	0,02	ENSAT
	$0,03 \pm 0,01$	ENSAT
	$0,01 \pm 0,002$	ENSAT
	$0,06 \pm 0,05$	ENSAT
Juillet - 2010	$0,2 \pm 0,03$	ENSAT
	$0,01 \pm 0,01$	ENSAT
	$0,05 \pm 0,2$	ENSAT
Novembre-2010	$0,05 \pm 0,2$	ENSAT

Après la perte de la production de la toxine T-2, une nouvelle boîte de *F. langsethiae* 033 était envoyée par l'IFBM en décembre 2010. Dans la période 2009-2010, le stockage de *F. langsethiae* 033 était fait en cryotubes après le repiquage.

Nous supposons que le stock en cryotubes à -20°C est le responsable de la perte de la production de la toxine. Pour cette raison, en 2011 nous avons fini les travaux expérimentaux en utilisant la souche 035 de *F. langsethiae* qui arrive à produire jusqu'à $6 \mu\text{g/mL}$ de la toxine T-2 en culture liquide Ym (22°C , 200 rpm, 3 jours). Son stock est faite en boîtes de Pétri avec milieu PDA à 4°C .

ANNEXE 4 : Problème de dissolution de la toxine T-2 dans le milieu Ym.

Dans les tests d'interaction indirecte, nous avons testé la croissance de *G. candidum* dans un milieu de culture contenant la toxine T-2 pour analyser sa capacité à se développer et/ou dégrader la toxine.

Nous avons eu le problème que la toxine T-2 est insoluble dans l'eau et par conséquent dans le milieu Ym. La toxine T-2 standard est dissoute dans une solution mère de l'acétonitrile ; une fois que la solution standard de la toxine est mélangée au milieu Ym, la concentration de la toxine T-2 n'est pas détectable.

Plusieurs tests ont été réalisés pour dissoudre la toxine dans le milieu Ym :

- La toxine T-2 dissoute dans de l'acétonitrile à une concentration de 1g/mL est additionnées au milieu Ym à pH 5,5 et 7,0. Addition de méthanol, pour améliorer la solubilité. Dans tous les cas, la toxine détectée est inférieure à la concentration initial théorique.

Test	Concentration théorique (µg/mL)	Concentration trouvé (µg/mL)
Ym pH 5,5	1,0	0,047
Ym pH 7,0	1,0	0,030
Méthanol + Ym pH 5,5	0,5	0,014
Méthanol + Ym pH 7,0	0,5	0,026

- La toxine T-2 est dissoute dans l'éthanol. La toxine se dissout bien mais au moment où elle est additionnée au milieu Ym, une séparation de phases est observée et par la détection en HPLC, les concentrations trouvées sont 99% inférieures à la valeur théorique ou non détectables.
- La toxine est dissoute dans du DMSO. Une concentration de DMSO de 10 mM est utilisée pour essayer la dissolution. La toxine ne se dissoute pas dans le DMSO même avec 5 ml de DMSO pure.

En conclusion, la toxine T-2 purifiée ne se dissout pas dans le milieu Ym. Si la toxine est d'abord dissoute dans un solvant soit acétonitrile, méthanol ou éthanol, puis rajouté dans le milieu Ym, elle n'est pas détectable par l'HPLC-FLD ou une perte de 99% est observée. Alors que la toxine produite directement dans le milieu Ym lors de la culture de *F.*

langsethiae est détectable. Nous supposons que la forme chimique de la toxine T-2 produit par *F. langsethiae* pendant la culture liquide dans le milieu Ym a une structure que lui permette de rester dans l'environnement aqueuse du milieu et pour cette raison elle est détectable par HPLC-FLD.