



8èmes Rencontres du RMT Quasaprove « Recherche appliquée, Formation & Transfert »

Contamination par les mycotoxines : relations entre mode de culture, équilibre d'espèces et mycotoxinogénèse

Laetitia PINSON-GADAIS,



INRA
SCIENCE & IMPACT

Unité MycSA

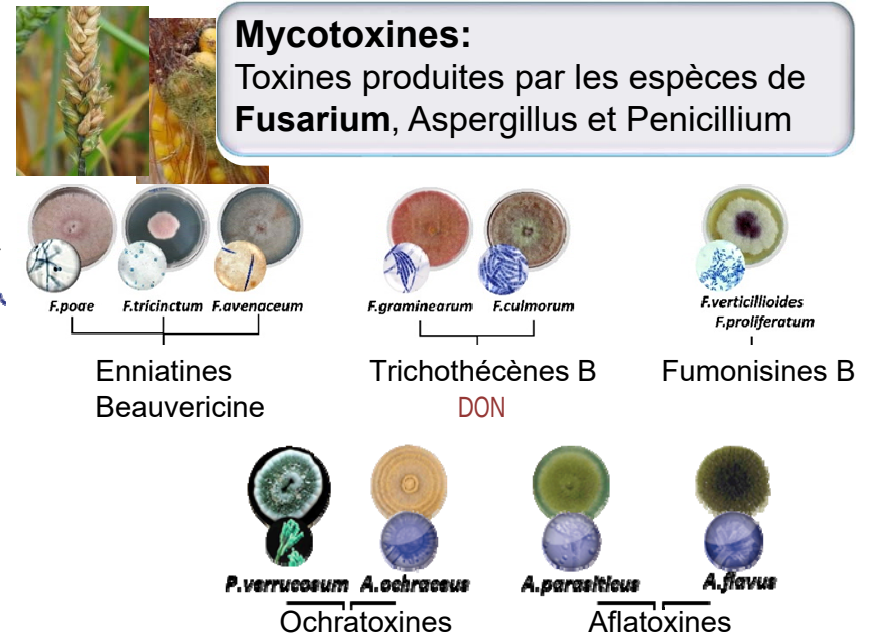


Les mycotoxines: contaminants majeurs des récoltes céréalières

Résidus de pesticides
Herbicide, fongicide, insecticide
Régulateur de croissance

Polluants organiques persistants
Dioxines, furanes, hydrocarbures
aromatiques

Mycotoxines:
Toxines produites par les espèces de
Fusarium, **Aspergillus** et **Penicillium**



Métaux lourds: Plomb,
Mercure, Arsenic et cadmium

Espèces fusariennes sur blé /orge et toxines associées

Fusarium

F. graminearum
F. avenaceum
F. culmorum
F. poae
F. tricinctum
F. sambucinum
F. sporotrichoides
F. equiseti
F. acuminatum
F. crookwellense = cerealis
F. langsethiae
F. pseudograminearum
F. heterosporum
F. oxysporum
F. verticilloides

Toxines

TCTB, ZEA
MON, BEA, ENNs
TCTB, ZEA
TCTB (NIV), BEA, ENNs
MON, BEA, ENNs
TCTA, ZEA, BEA, ENNs
TCTA, ENNs, BEA
TCTA et B, ZEA, BEA, ENNs
TCTA, ENNs
TCTB, ZEA
TCTA, ENNs, BEA
TCTB
ZEA
Fumonisine C, ENNs, BEA
Fumonisines B

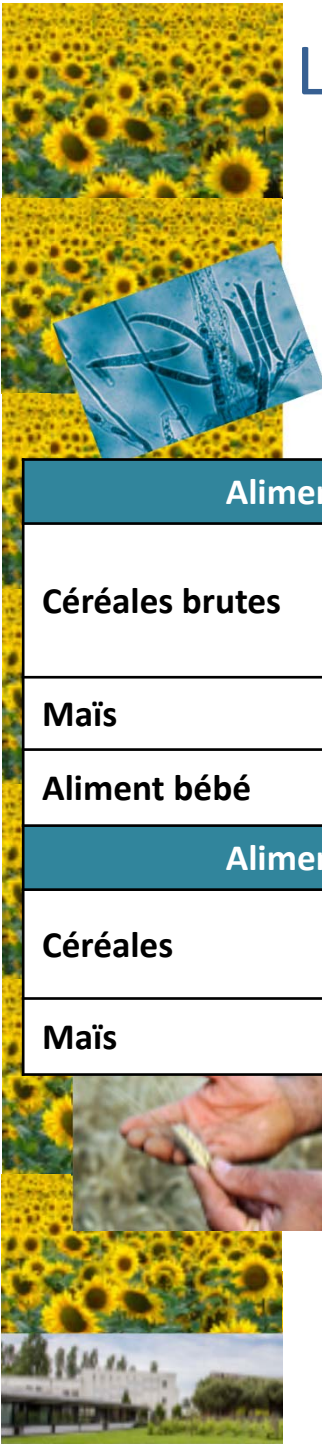
TCTB Trichothécènes B ➔ **DON** Déoxynivalénol, **15 ADON** 15-Acetyldeoxynivalénol, **3ADON** 3-Acetyldeoxynivalénol,

NIV Nivalénol, **Fx** Fusarénone X ou 4-Acetylnivalénol

TCTA Trichothécènes A ➔ **DAS** diacétoxyscirpénol, **T-2, HT-2, ...**

ZEA Zearalenone **FUM** Fumonisines **MON** Moniliformine **BEA** Beauvericine **ENNs** Enniatines

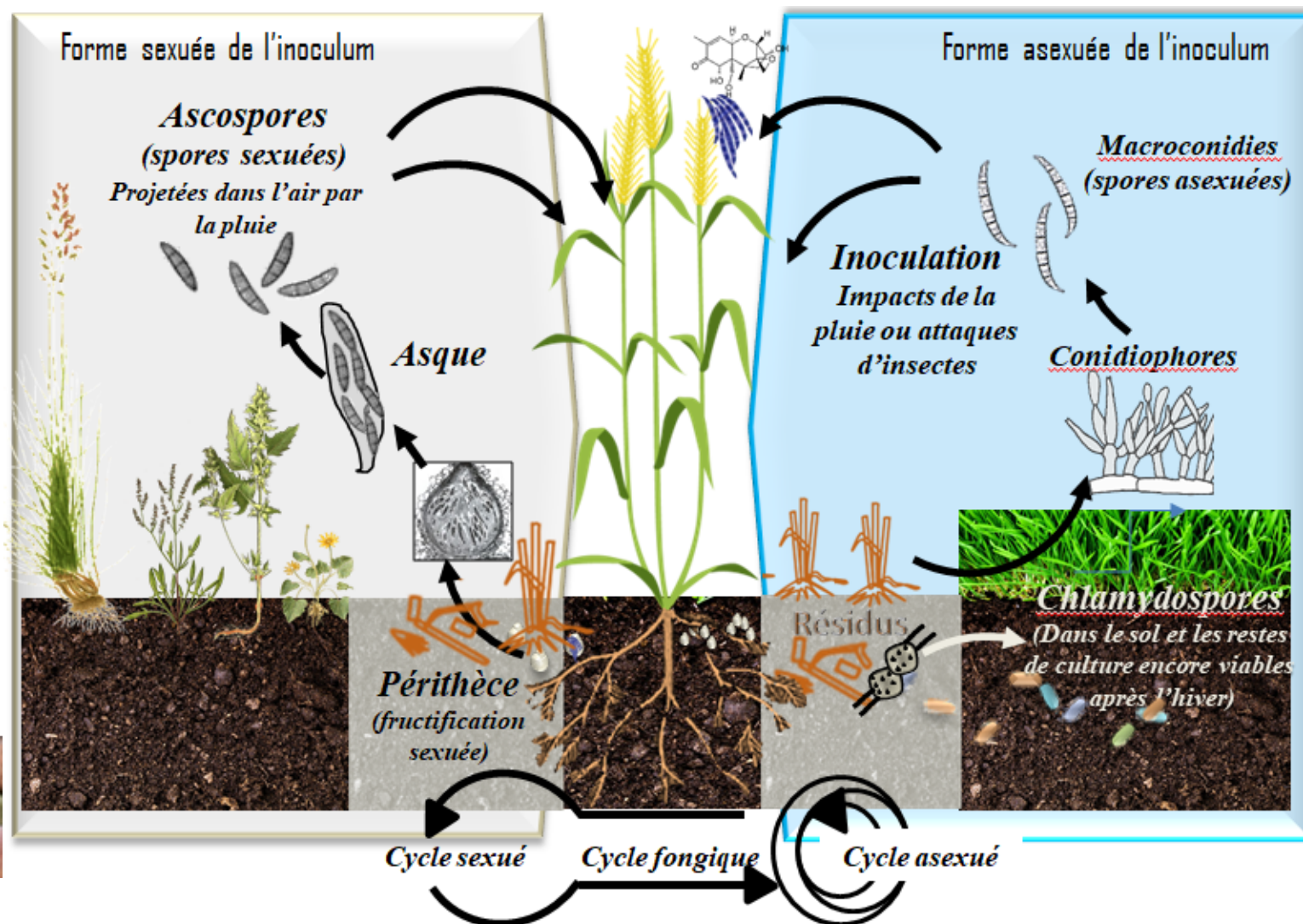
Limites maximales réglementaires et recommandées applicables dans la filière céréalière



Teneurs maximales en mycotoxines, µg/kg						
	DON	ZEА	FB1+FB2	T2+HT2	OTA	AFB1
Alimentation humaine						
Céréales brutes	1 250 blé dur et avoine : 1 750	100	-	100 Orge: 200 Avoine: 1 000	5	2
Maïs	1 750	350	4 000	200	5	2
Aliment bébé	200	20	200	15	0,5	0,1
Alimentation animale						
Céréales	8 000	2 000	-	500 Avoine: 2 000	250	20
Maïs	8 000	2 000	60 000	500	250	20

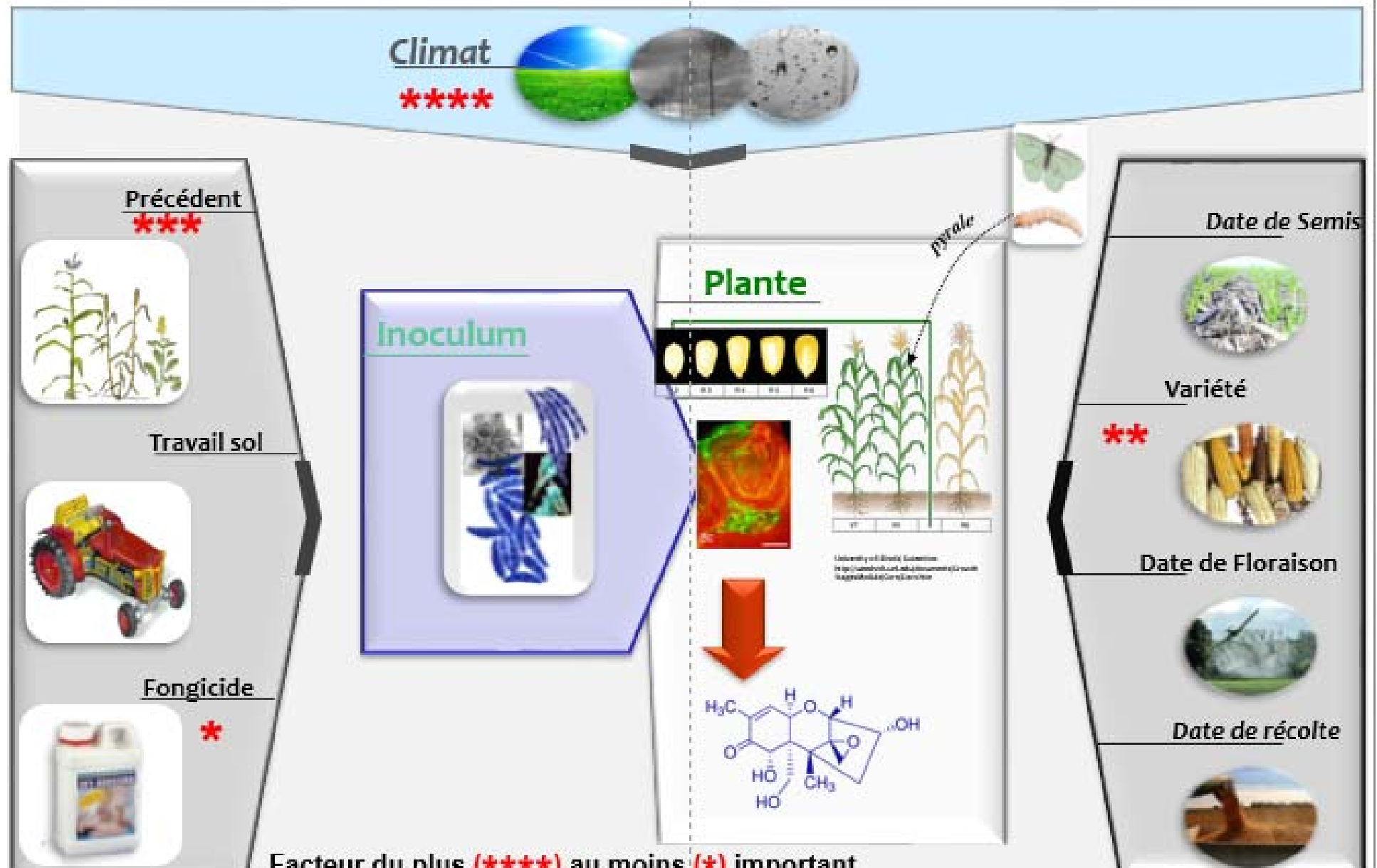
Réglementation_ CE /1126/2007 et CE/32/2002 Recommandation – CE/165/2013 et CE/576/2006

Cycle fongique de *Fusarium graminearum*





Facteurs influençant l'accumulation de mycotoxines dans l'épis



Objectifs Projet QUASAGRO

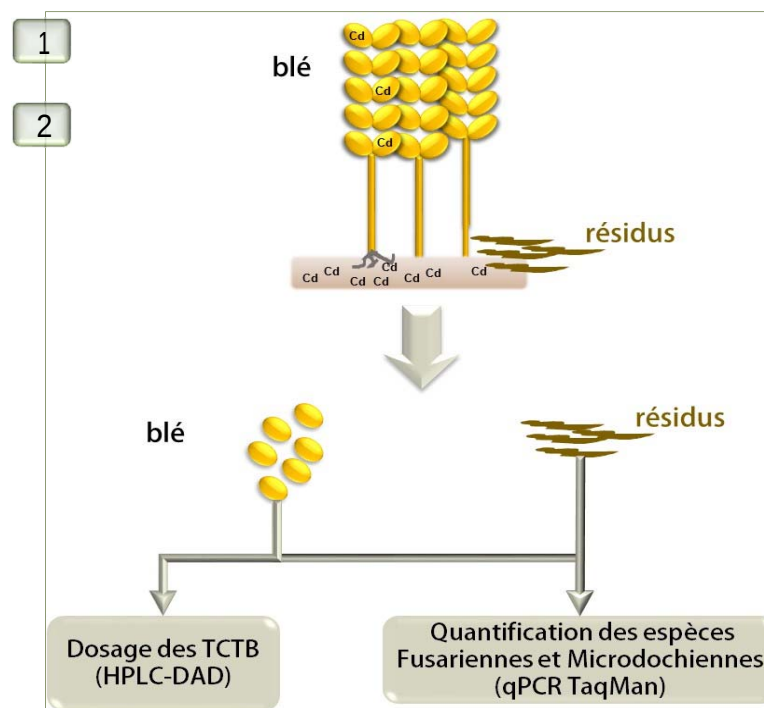
Acquérir des références sur les niveaux de contamination des BD et BT

- 1 population Fusarienne des blés tendres et blés durs
- 2 des teneurs en fusariotoxines des blés tendres et blé durs
- 3 éléments-traces des sols agricoles et des productions de blé tendre, blé dur, tournesol en alimentant la base de données Quasaprove,

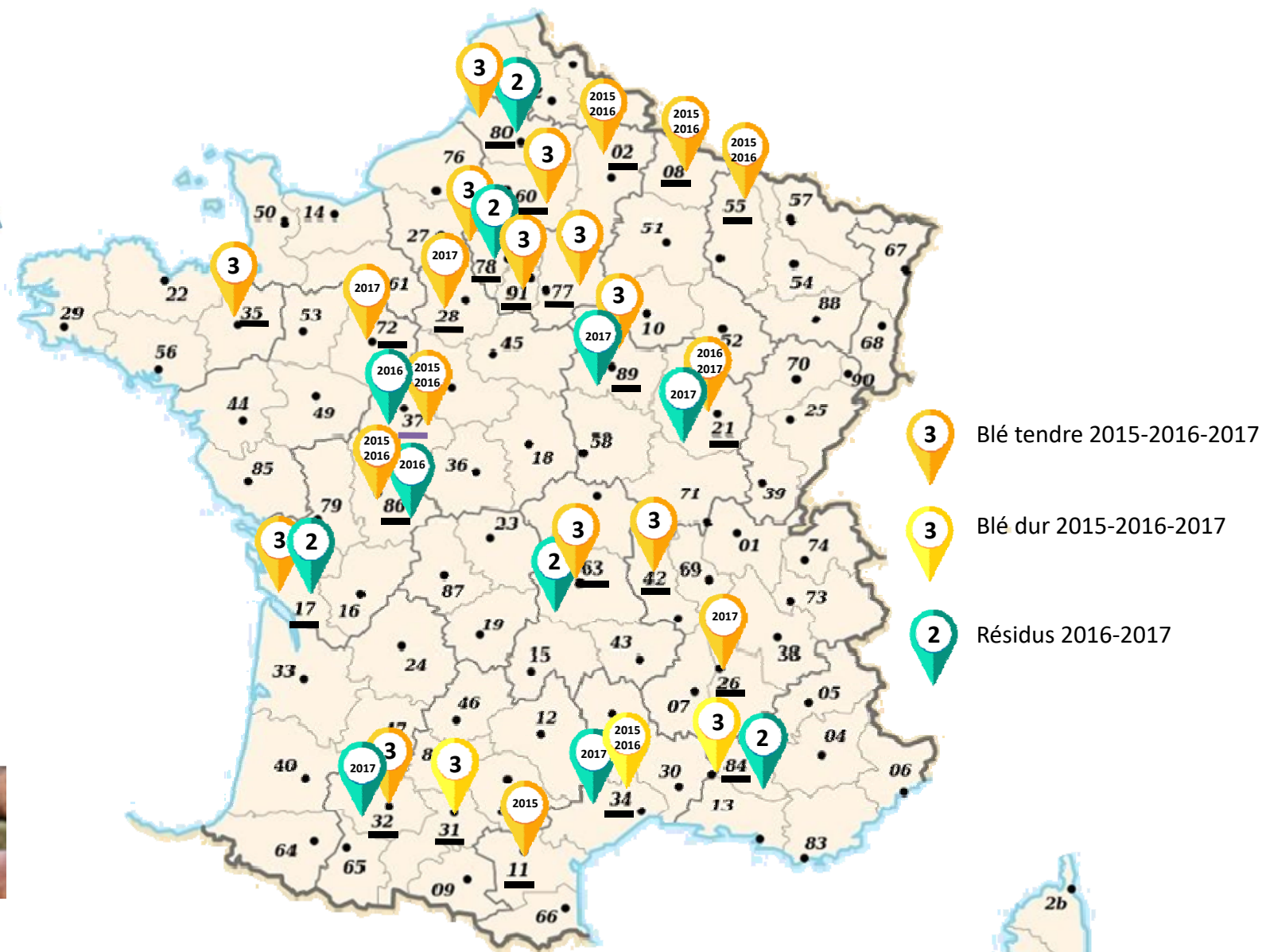
➡ Dégager une typologie des situations pédoclimatiques à risque et déterminer les leviers agronomiques pour limiter les contaminations

Année de récolte	2015	2016	2017
Grains Blé			
Tendre	23	27	16
Dur	4	6	3
Résidus			
Tournesol	3	5	
Maïs	3	1	
Blé		2	
Moutarde	1		
Pois	1		
Colza	1	1	
Orge	1		

Echantillons grains de blé :79
Echantillons résidus 19



Répartition des échantillons en France



7èmes rencontres « Recherche Appliquée, Formation et Transfert » du RMT Quasaprove
14 décembre 2017, Surgères



Echantillons

2015

Grains de blé

Echantillon	Région-Département	Type de blé
571	Montbrison - 42	blé tendre
573	Isle sur Sorgues - 84	blé dur
575	Mauguio - 34	blé dur
577	Auch Beaulieu - 32	blé tendre
582	Messac - 17	blé tendre
584	Auxerre - 89	blé tendre
586	Archigny - 86	blé tendre
591		
593	Boigneville - 91	blé tendre
595		
597	Carcassonne - 11	blé tendre
599	Chambray - 37	blé tendre
601	Versailles-Grignon - 78	blé tendre
603		
605	Brie Comte Robert - 77	blé tendre
607	Toulouse - 31	blé dur
609	Crézancy - 02	blé tendre
611	Rethel - 08	blé tendre
613	Bar le Duc - 55	blé tendre
615	Estrée Mons - 80	blé tendre
617	Rennes - 35	blé tendre
619		
621	Lusignan - 86	blé tendre
623		
625	Clermont Ferrand - 63	blé tendre
629	Avignon - 84	blé dur
633	Airion - 60	blé

Résidus

Echantillon résidus	Région-Département	Type
627	Clermont Ferrand-63	pois
628	Lusignan-86	orge de printemps
632	Avignon-84	tournesol
636	Messac-17	tournesol
650	Epoisses-21	tournesol
653	Chambray-37	colza
656	Lusignan-86	moutarde
657	Versailles Grignon-78	maïs
658	Estrée Mons-80	maïs
659	Lusignan-86	maïs

2016

Grains de blé

Echantillon	Région-Département	Type de blé
791	Auch 32	blé tendre
793		
795	Mauguio - 34	blé dur
797		
799	Isle sur la Sorgue-84	blé dur
801	Etoile sur Rhone-26	blé tendre
803	Montbrison-42	blé tendre
805	Biras-24	blé tendre
807	Messac-17	blé tendre
809	Archigny-86	blé tendre
811	Bar le Duc-55	blé tendre
813	Rethel-08	blé tendre
815	Crézancy-02	blé tendre
817	Brie Comte Robert-77	blé tendre
819		
821	Boigneville-91	blé tendre
823	Chambray-37	blé tendre
825		
827	Toulouse-31	blé dur
829		
831	Lusignan-86	blé tendre
833		
835		
839		
841	Estrée Mons-80	blé tendre
843	Versailles -78	blé tendre
845	Auxerre-89	blé tendre
847	Clermont Ferrand-63	blé tendre
849		
851	Rennes-35	blé tendre
853	Epoisses-21	blé tendre
859	Airion-60	blé tendre
866	Avignon-84	blé dur

Résidus

Echantillon Résidus	Région-Département	Type
796	Mauguio-34	blé dur
837	Lusignan-17	colza
846	Auxerre-89	blé tendre
856	Mauguio-34	tournesol
858	Messac-17	tournesol
871	Avignon -84	tournesol
873	Isle sur la Sorgue-32	tournesol
875	Epoisses-21	tournesol
876	Clermont Ferrand-63	maïs
891	Versailles-78	maïs
892	Estrée Mons-80	maïs

2017

Grains de blé

Echantillon	Région-département	Type de blé
945	Isle sur Sorgue-32	blé dur
947	Lusignan-86	blé tendre
949	Chartres-28	blé tendre
951	Epoisses-21	blé tendre
953	Le Mans-72	blé tendre
955		
957	Boigneville-91	blé tendre
959	Auxerre-89	blé tendre
961	Estrée Mons-80	blé tendre
963	Messac-17	blé tendre
965	Rennes-33	blé tendre
967	Versailles-78	blé tendre
969	Montbrison-42	blé tendre
973	Avignon-84	blé dur
979	Clermont Ferrand-63	blé tendre
985	Airion-60	blé tendre
1003	Etoile sur Rhone-26	blé tendre
1017	Toulouse-31	blé dur
1021	Chambray-37	blé tendre

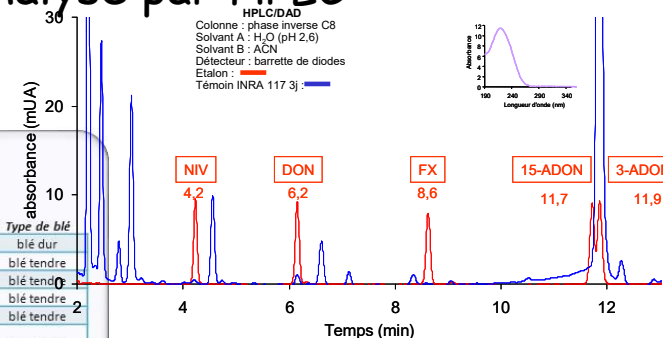
Teneurs en Trichothécènes de type B

Des échantillons de blé 2015 -2016- 2017

Broyage
des grains

Extraction des
trichothécènes

Analyse par HPLC



2015 Grains de blé

Échantillon	Région-Département	Type de blé
571	Montbrison-42	blé tendre
573	Isle sur Sorgues-84	blé dur
575	Mauville-34	blé dur
577	Auch Beaulieu-32	blé tendre
582	Messac-17	blé tendre
584	Auxerre-89	blé tendre
586	Archigny-86	blé tendre
591		
593	Boigneville-91	blé tendre
595		
597	Carcassonne-11	blé tendre
599	Chambray-37	blé tendre
601	Versailles-Grignon-78	blé tendre
603		
605	Brie Comte Robert-77	blé tendre
607	Toulouse-31	blé dur
609	Crézancy-02	blé tendre
611	Rethel-08	blé tendre
613	Bar le Duc-55	blé tendre
615	Estrée Mons-80	blé tendre
617	Rennes-35	blé tendre
619		
621	Lusignan-86	blé tendre
623		
625	Clermont Ferrand-63	blé tendre
629	Avignon-84	blé dur
633	Airion-60	blé

Pas TCTB

2016 Grains de blé

Échantillon	Région-Département	Type de blé
791	Auch 32	blé tendre
793		
795	Mauguio-34	blé dur
797		
799	Isle sur la Sorgue-84	blé dur
801	Etoile sur Rhone-26	blé tendre
803	Montbrison-42	blé tendre
805	Biras-24	blé tendre
807	Messac-17	blé tendre
809	Archigny-86	blé tendre
811	Bar le Duc-55	blé tendre
813	Rethel-08	blé tendre
815	Crézancy-02	blé tendre
817	Brie Comte Robert-77	blé tendre
819	Boigneville-91	blé tendre
821	Chambray-37	blé tendre
823		
825	Toulouse-31	blé dur
827		
829		
831	Lusignan-86	blé tendre
833		
835		
839		
841	Estrée Mons-80	blé tendre
843	Versailles-78	blé tendre
845	Auxerre-89	blé tendre
847	Clermont Ferrand-63	blé tendre
849		
851	Rennes-35	blé tendre
853	Epoisses-21	blé tendre
859	Airion-60	blé tendre
866	Avignon-84	blé dur

2017 Grains de blé

Echantillon	Région-département	Type de blé
945	Isle sur Sorgue-32	blé dur
947	Lusignan-86	blé tendre
949	Chartres-28	blé tendre
951	Epoisses-21	blé tendre
953	Le Mans-72	blé tendre
955		
957	Boigneville-91	blé tendre
959	Auxerre-89	blé tendre
961	Estrée Mons-80	blé tendre
963	Messac-17	blé tendre
965	Rennes-35	blé tendre
967	Versailles-78	blé tendre
969	Montbrison-42	blé tendre
973	Avignon-84	blé dur
979	Clermont Ferrand-63	blé tendre
985	Airion-60	blé tendre
1003	Etoile sur Rhone-26	blé tendre
1017	Toulouse-31	blé dur
1021	Chambray-37	blé tendre

Pas TCTB

2 échantillons => DON uniquement
 n° 809 => 10,36 µg/g *
 n° 821 => 2,25 µg/g *
 Les autres échantillons n'ont pas de TCTB

* Au dessus de la réglementation [blé tendre 1250 µg/kg / Blé dur 1750 µg/kg]

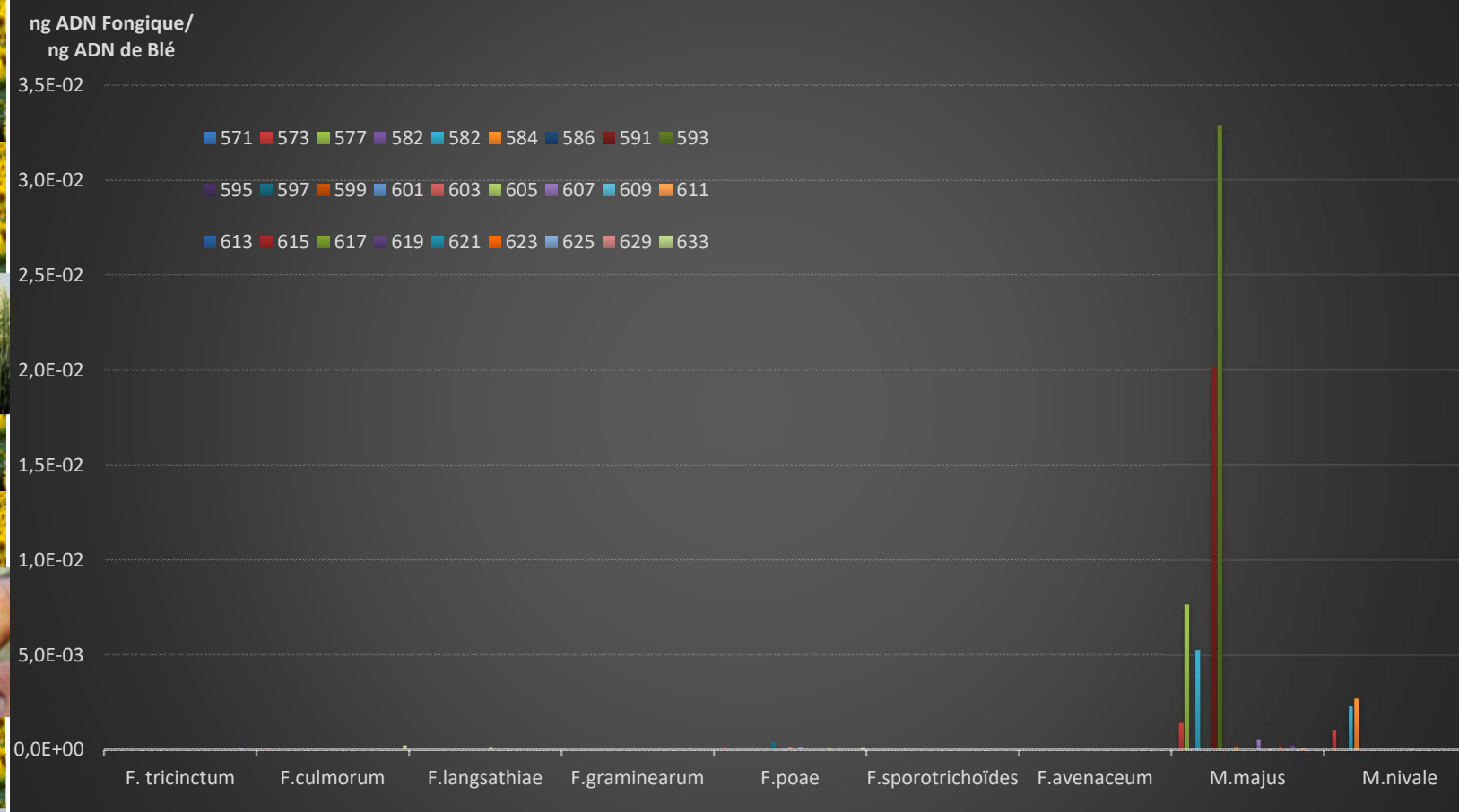
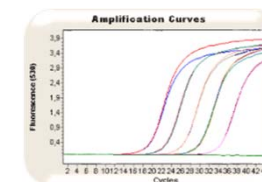
Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

Récoltes 2015

Broyage
des grains

Extraction
ADN total

Quantification
ciblée QPCR

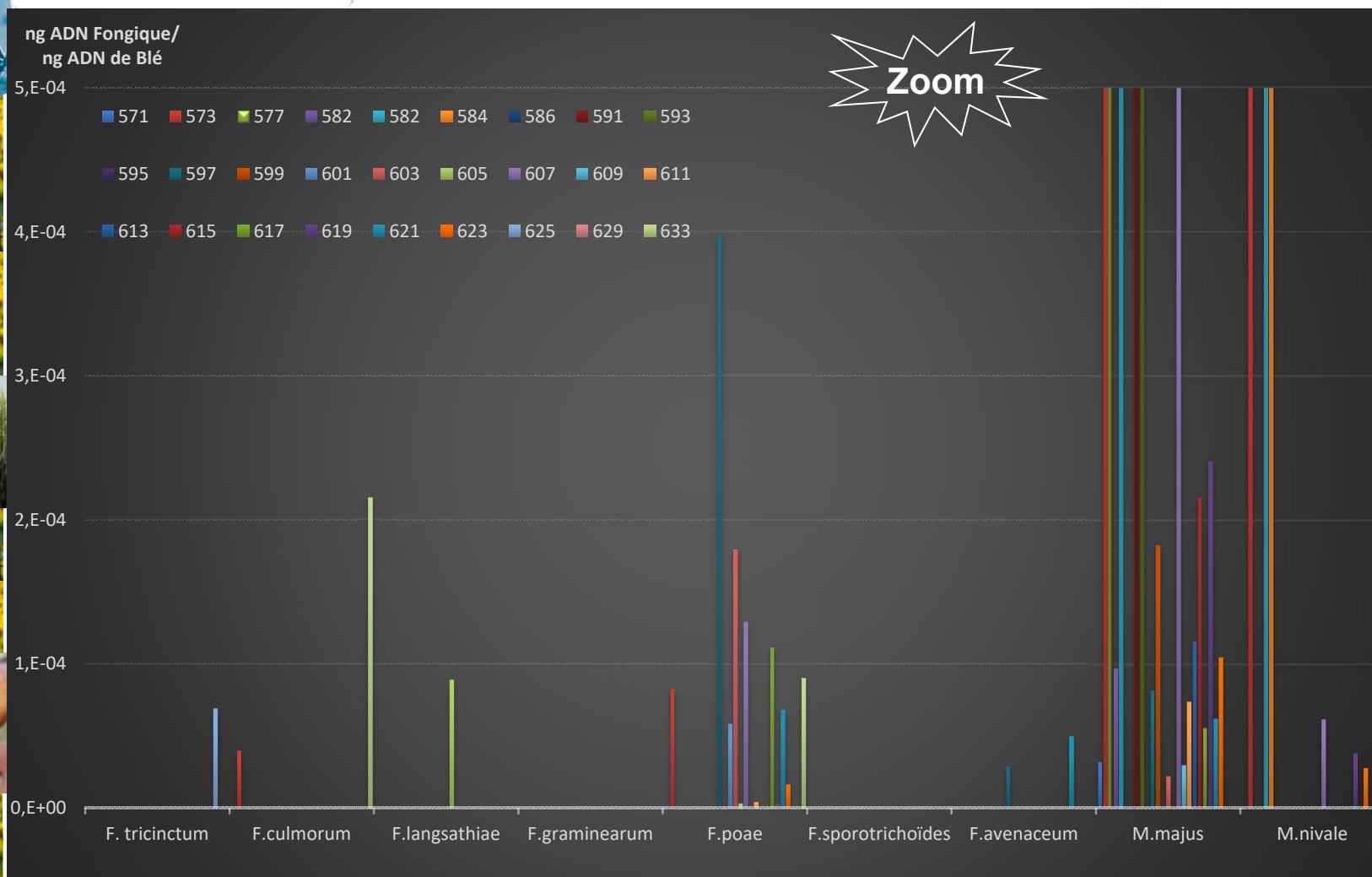


7èmes rencontres « Recherche Appliquée, Formation et Transfert » du RMT Quasaprove
14 décembre 2017, Surgères

RMT Quasaprove 11

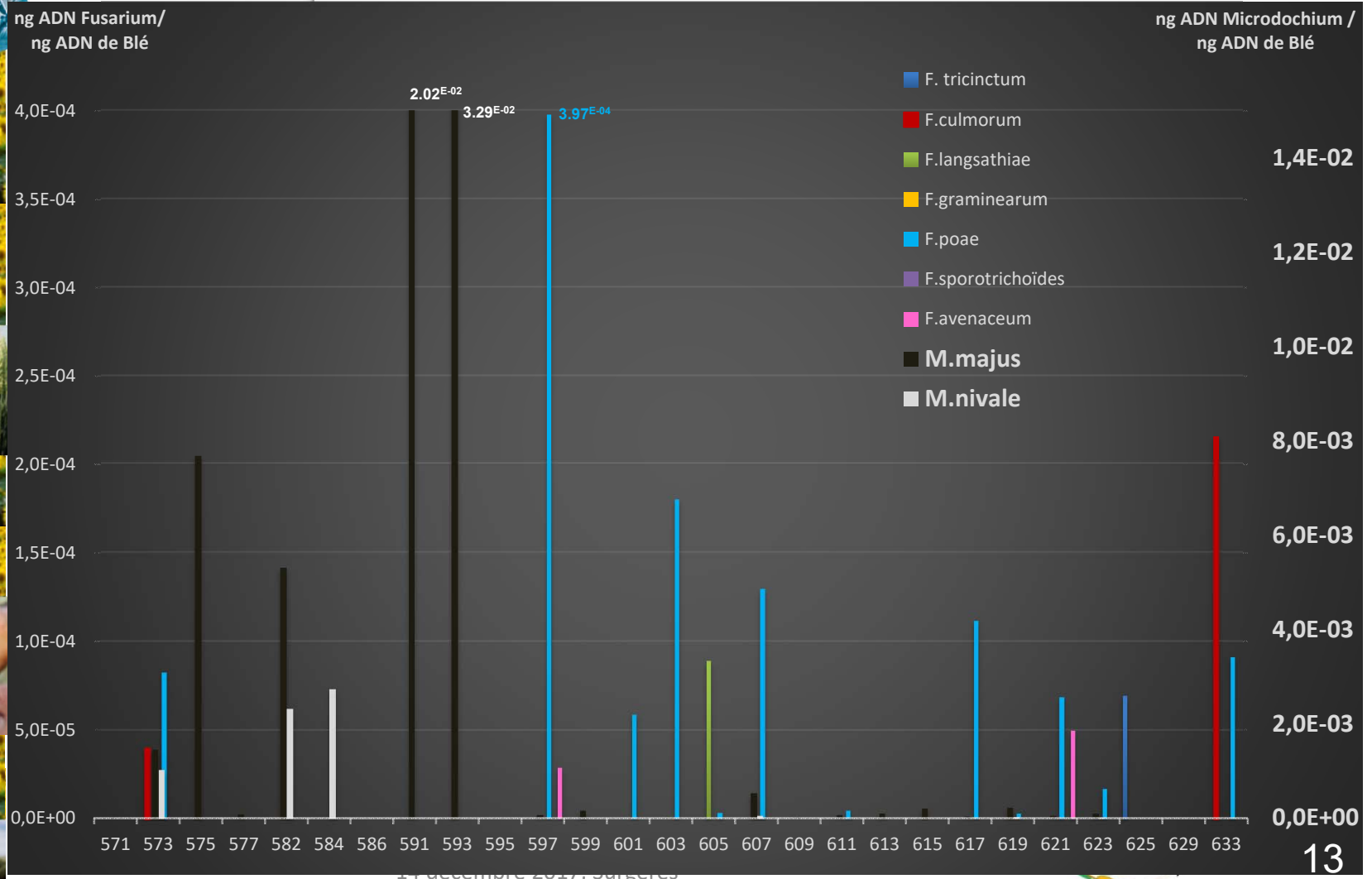
Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

Récoltes 2015



Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

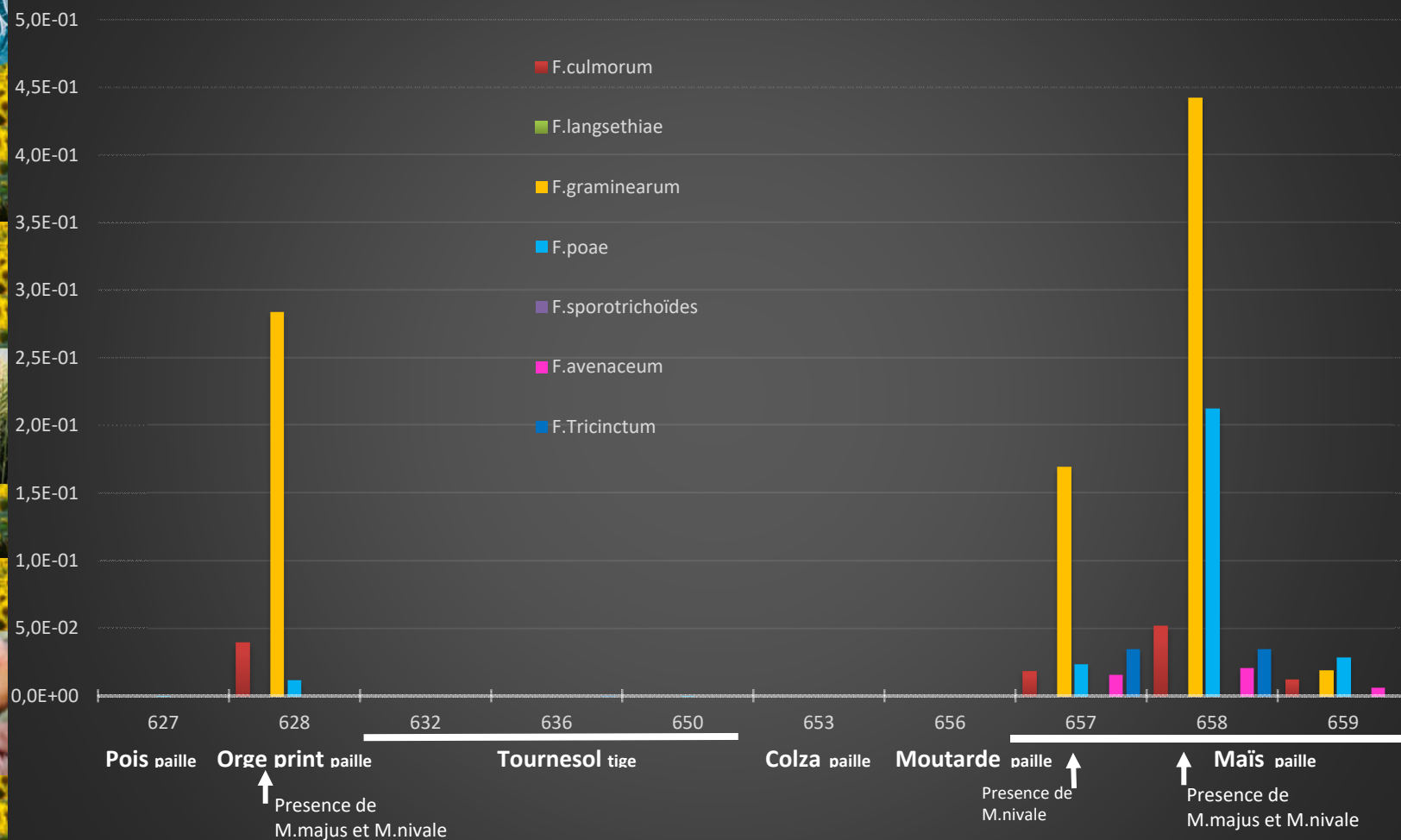
Récoltes 2015



Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

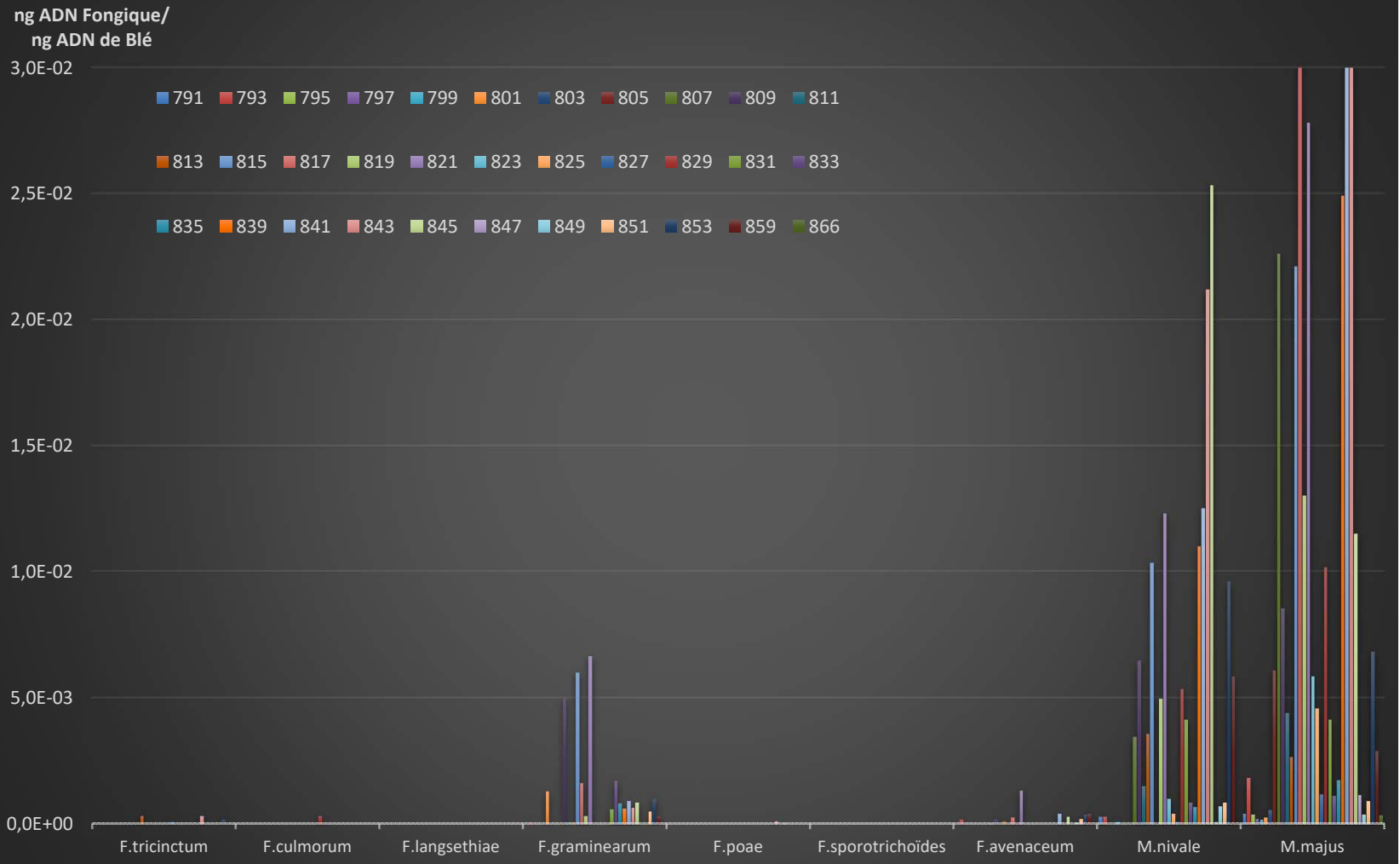
Résidus 2015

ng/μl pour 20ng ADN total



Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

Récoltes 2016

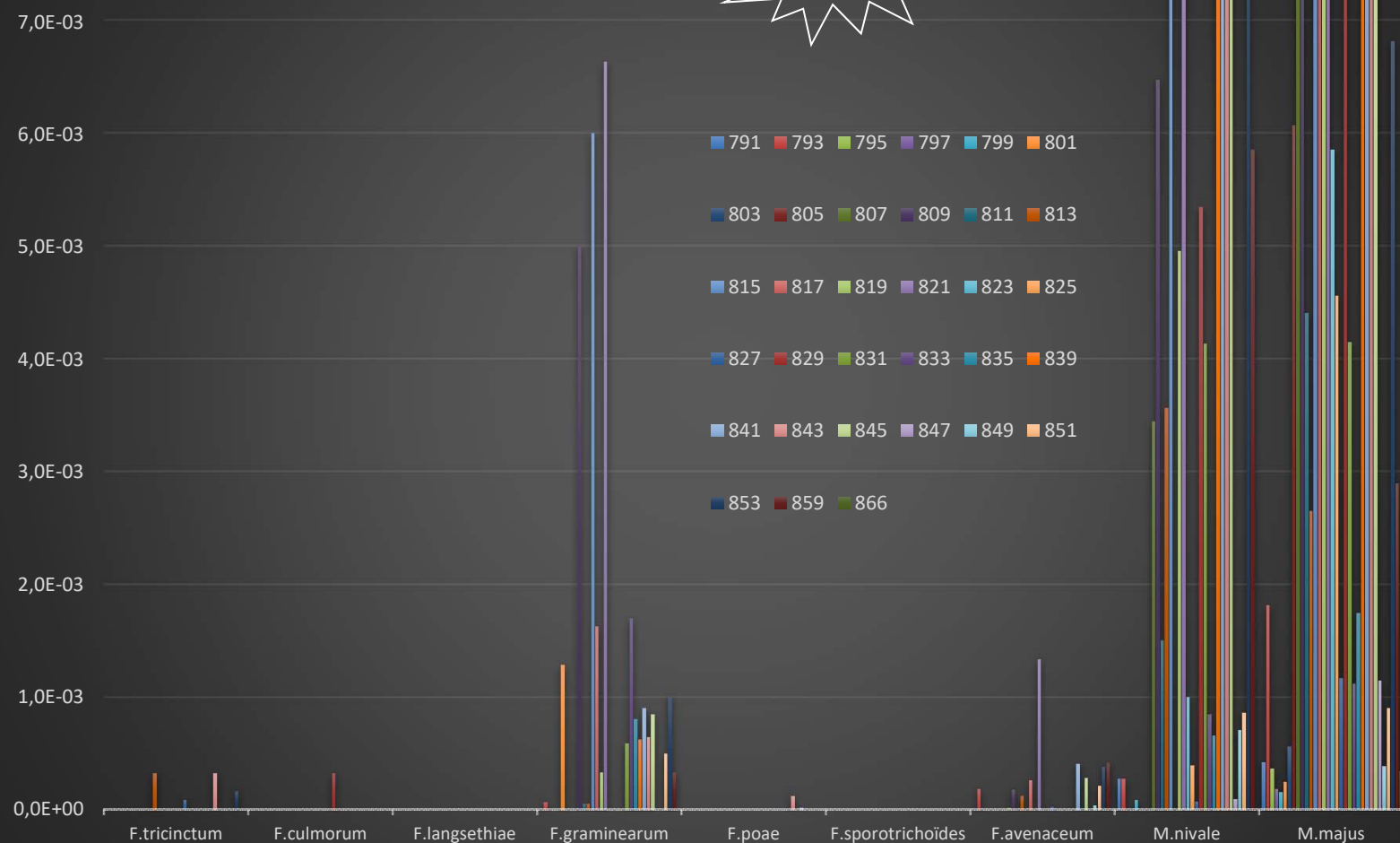


Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

Récoltes 2016

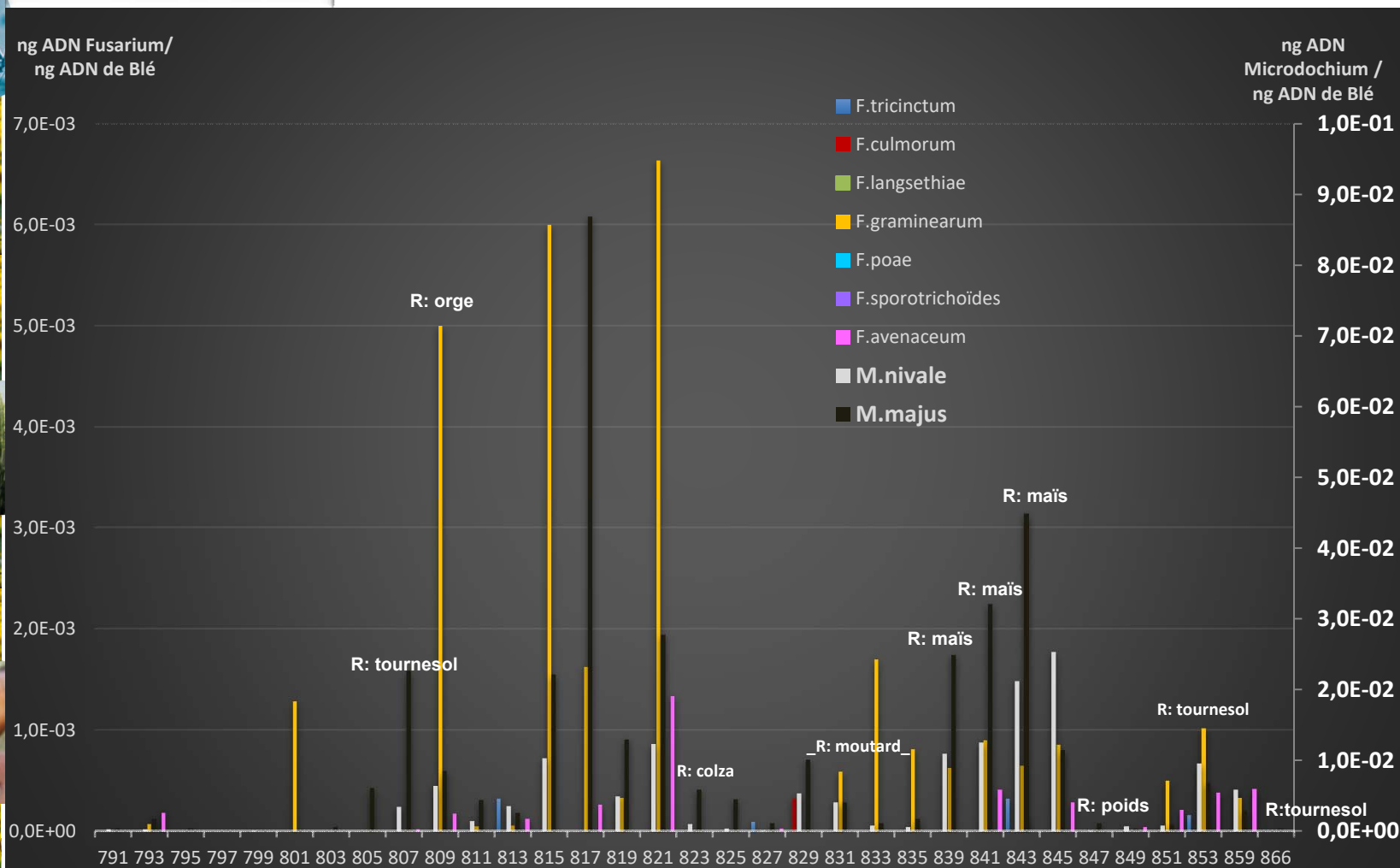
ng ADN Fongique/
ng ADN de Blé

Zoom



Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

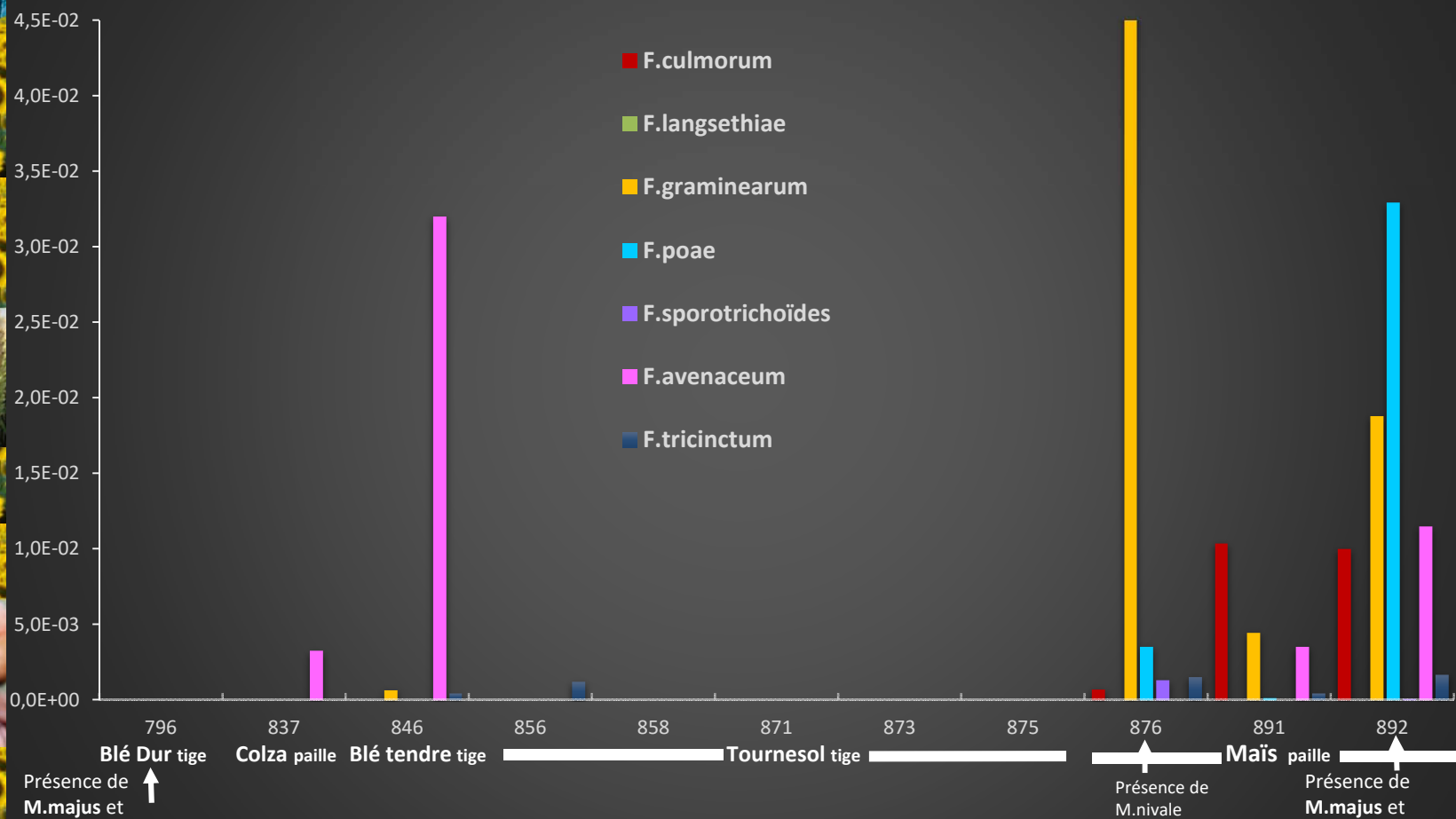
Récoltes 2016



Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

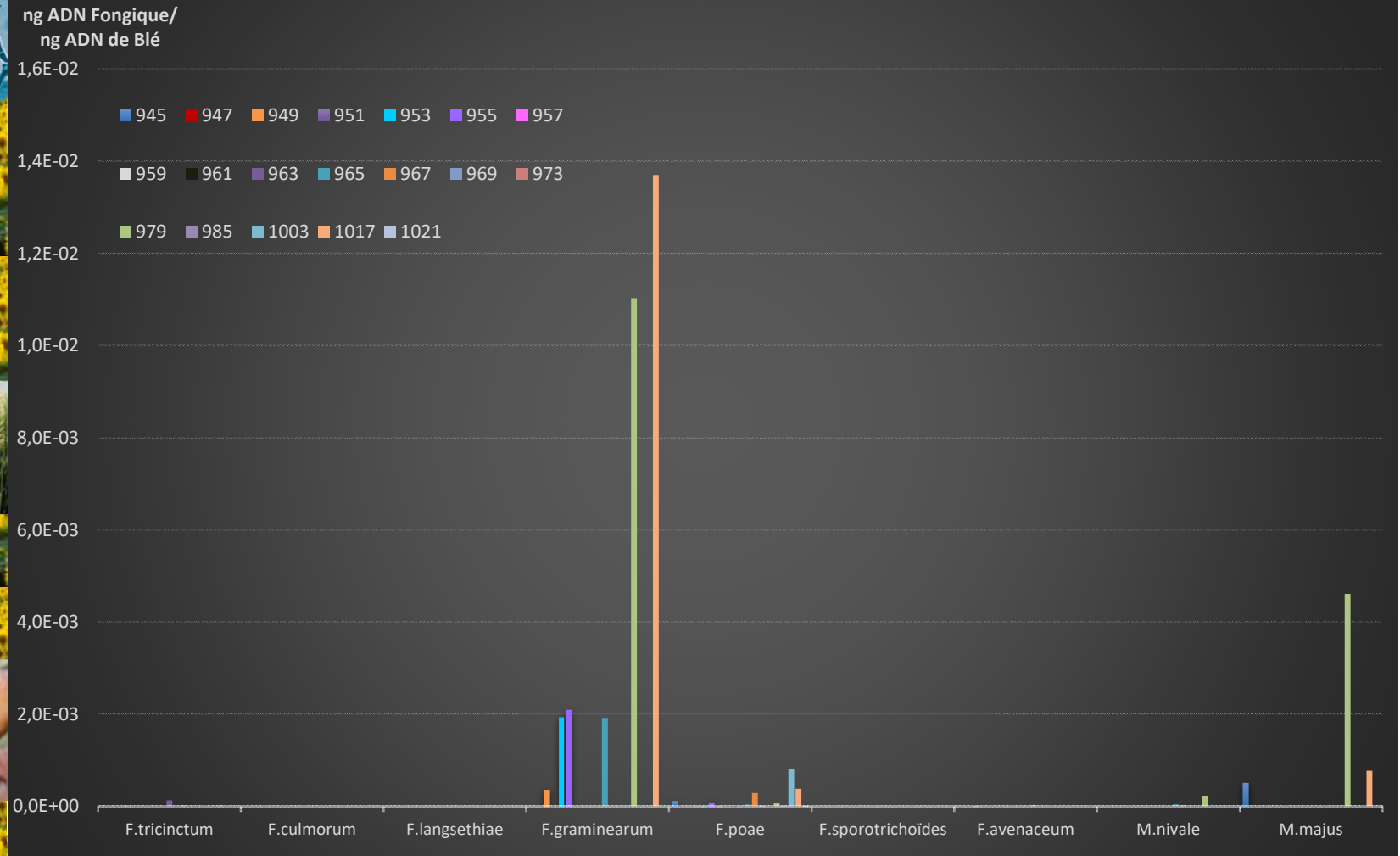
Résidus 2016

ng/μl pour 20ng ADN Total



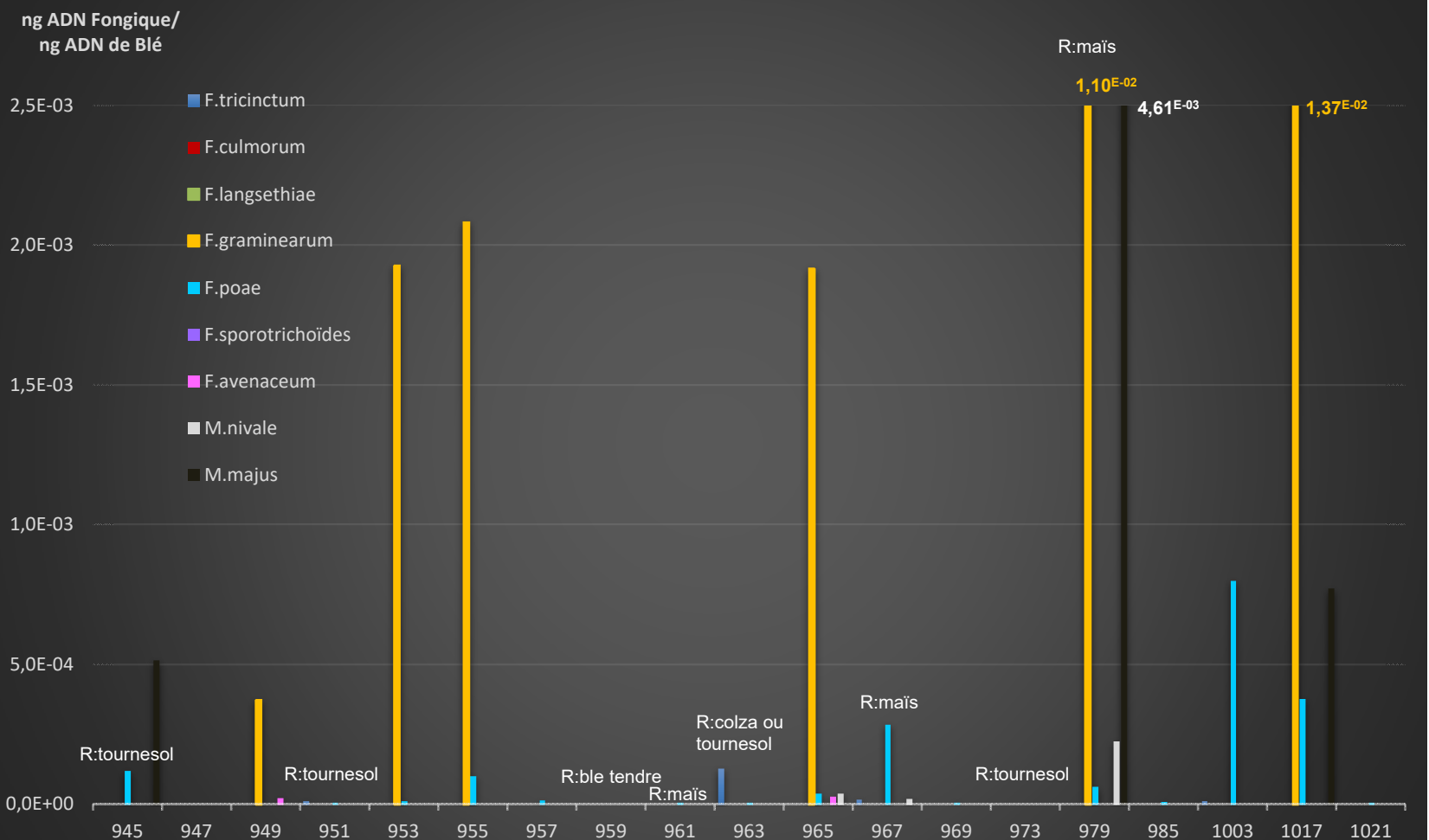
Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

Récoltes 2017



Quantification de la flore fusarienne et microdochienne

Récoltes 2017



Bilan



2015 :



Grains: *M. majus* + présent (fréquence et quantité)
M. nivale - présent que *M. majus* mais + que *Fusarium*
Fusarium : faible en cohérents avec l'absence de TCTB
F. poae + fréquent parmi les *Fusarium* quantifiés mais Qté faible
 Echs + contaminés en *Microdochium* => pas ou peu en *Fusarium* (Sauf n° 573)
 Echs + contaminés en *Fusarium* => pas ou peu en *Microdochium*

Résidus: Pois, colza, tournesol et moutarde : Pas de *Fusarium* ni de *Microdochium*
 Maïs et orge: *F.graminearum* majoritaire,
 Présent en moindre quantité: *F.culmorum*, *F.poeae* et *F.avenaceum*
 Sur les résidus la quantité de *Fusarium* est + importante que sur grains
M. nivale et *M.majus* présents sur les résidus de céréale

2016 :



Grains: *M. majus* + présent (fréquence et quantité)
M. nivale - présent que le *M. majus*
 En 2016 *M.majus* et *M.nivale* => quantité + importante
Fusarium est + faible que *Microdochium*
 ► mais + importante qu'en 2015 (Qté et fréquence)
F. graminearum plus fréquent parmi les *Fusarium* quantifiés
 ► Les 2 Echs avec DON => échantillons les + contaminés en *F.grami*
 Qté et fréquence de *Fusarium* est + important qu'en 2015

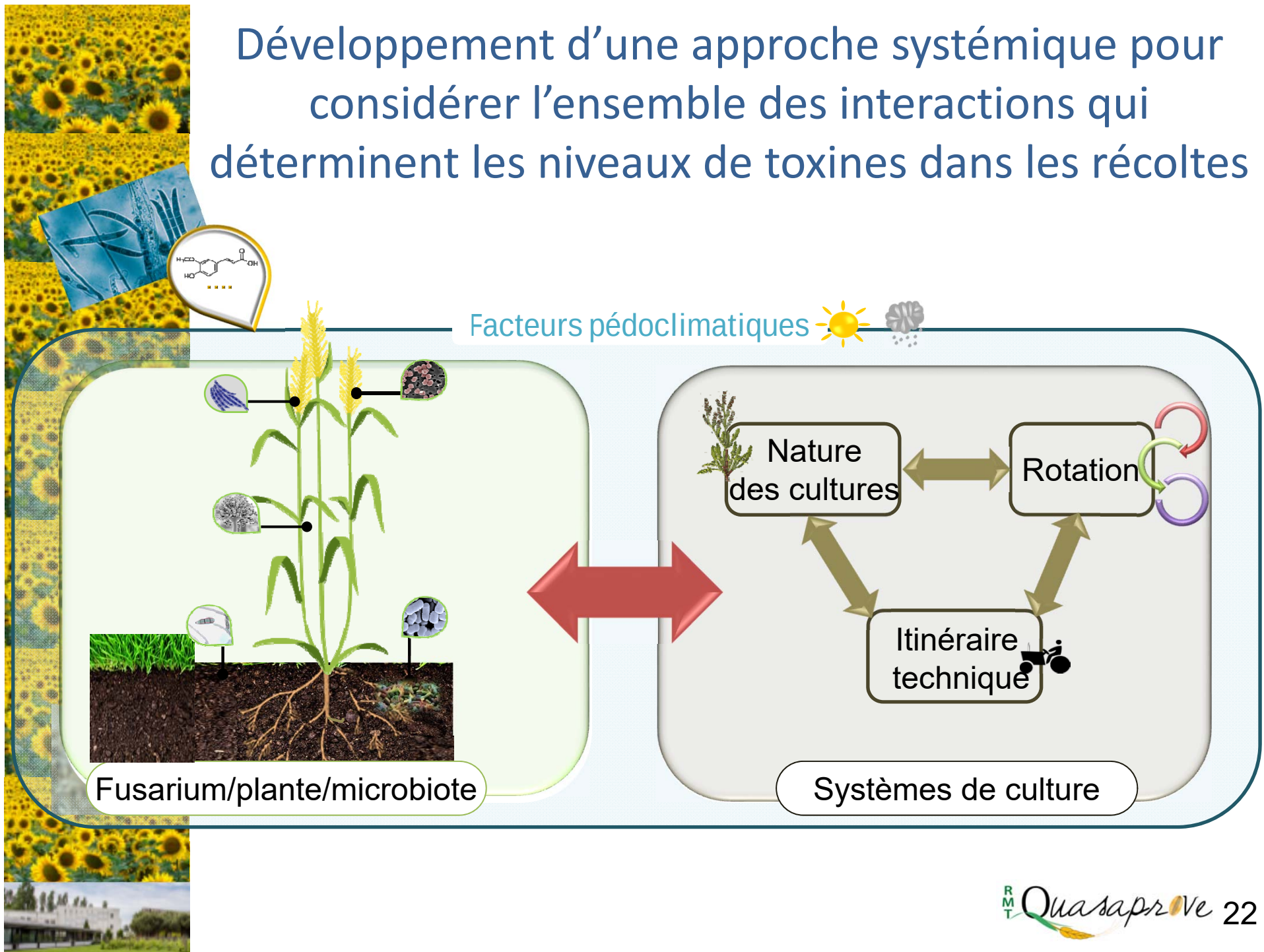
Résidus: Colza, tournesol, blé dur: peu ou pas de *Fusarium* ni de *Microdochium*
 Maïs + fortement contaminés avec une grande diversité d'espèces *Fusariennes* et présence de *M.maju* et *M.nivale*
 Sur les résidus la quantité de *Fusarium* est + importante que sur grains
M. nivale et *M. majus* présents sur les résidus de céréale

2017 :



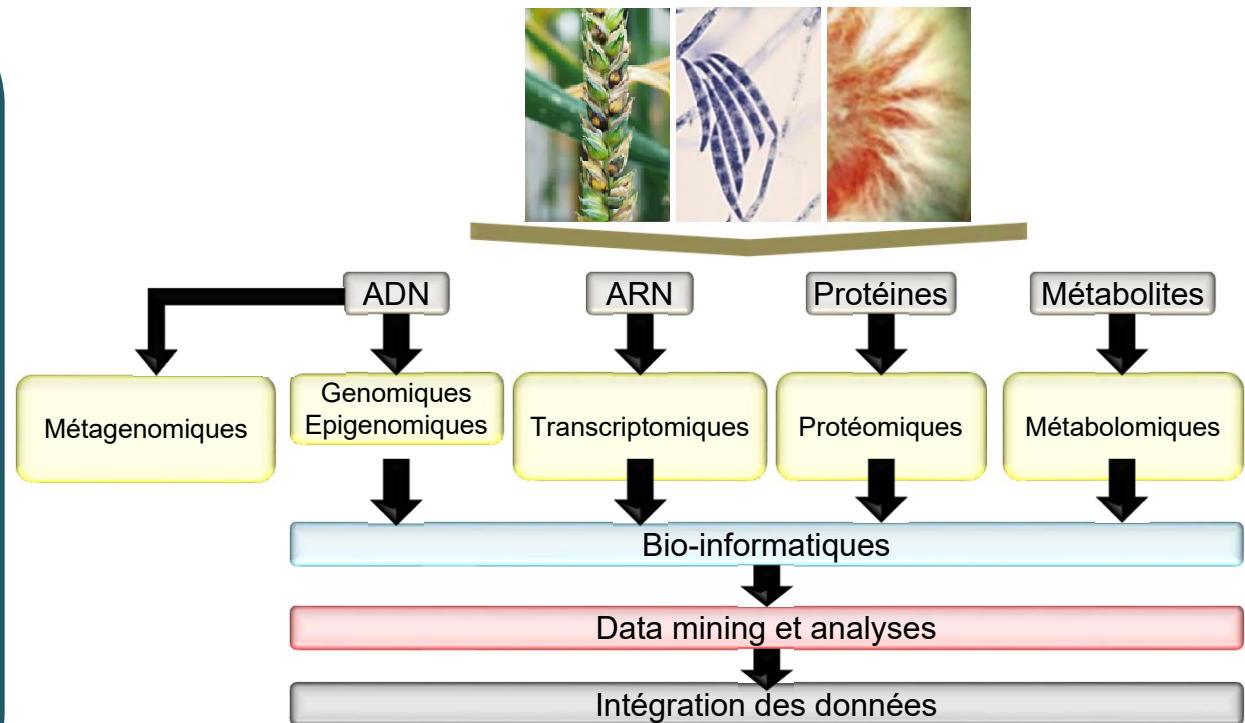
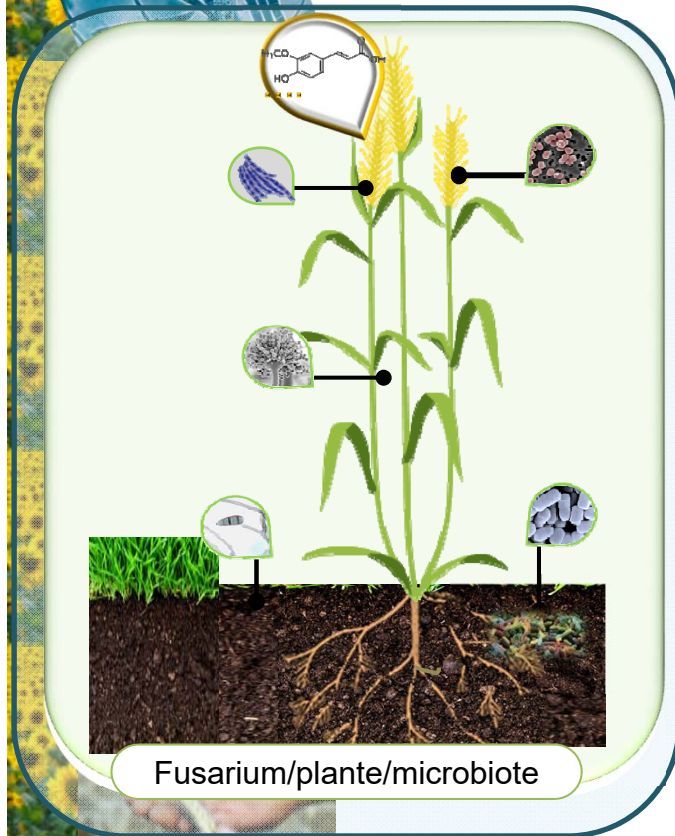
Grains: Peu d'échs contaminés en *Fusarium* et *Microdochium*
F. graminearum + présent (fréquence et quantité) parmi les *Fusarium* quantifiés
 ► mais pas de TCTB

Développement d'une approche systémique pour considérer l'ensemble des interactions qui déterminent les niveaux de toxines dans les récoltes



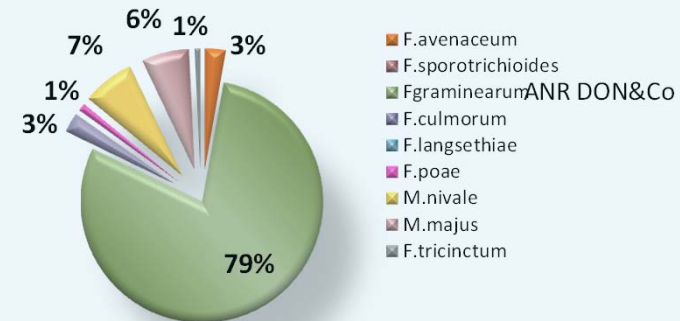
Fusarium/microbiote/plante

Les approches "omics" pour décrypter les interactions



Des approches de métagénomique pour analyser la diversité des *Fusarium* spp. / itinéraires techniques

Récoltes de blés en France [2008-2011]

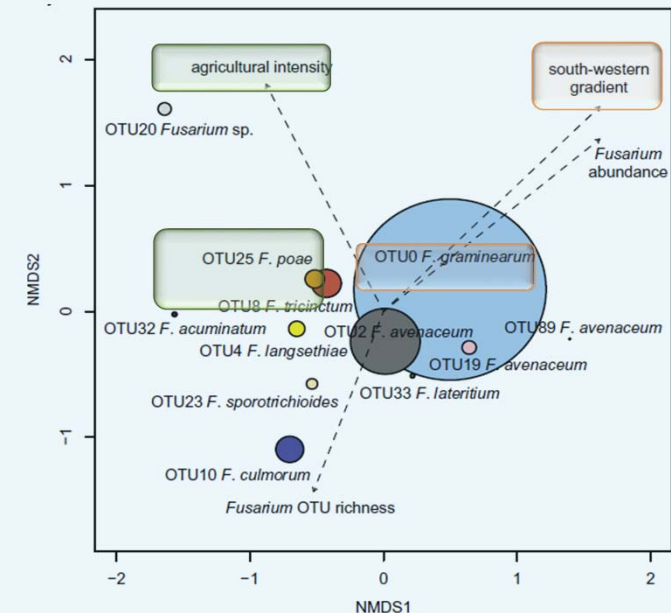


Elaboration de modèles explicatifs pour *F. graminearum* et *Microdochium* sp

- % de variance expliquée par les modèles est de
- 40 % pour *Microdochium* sp.
 - 30% pour *F. graminearum*.

Microdochium sp. est peu influencé par l'agronomie, contrairement à *F. graminearum* (précédent, choix variétal et travail du sol)

Récoltes de blés en Suède [2012]

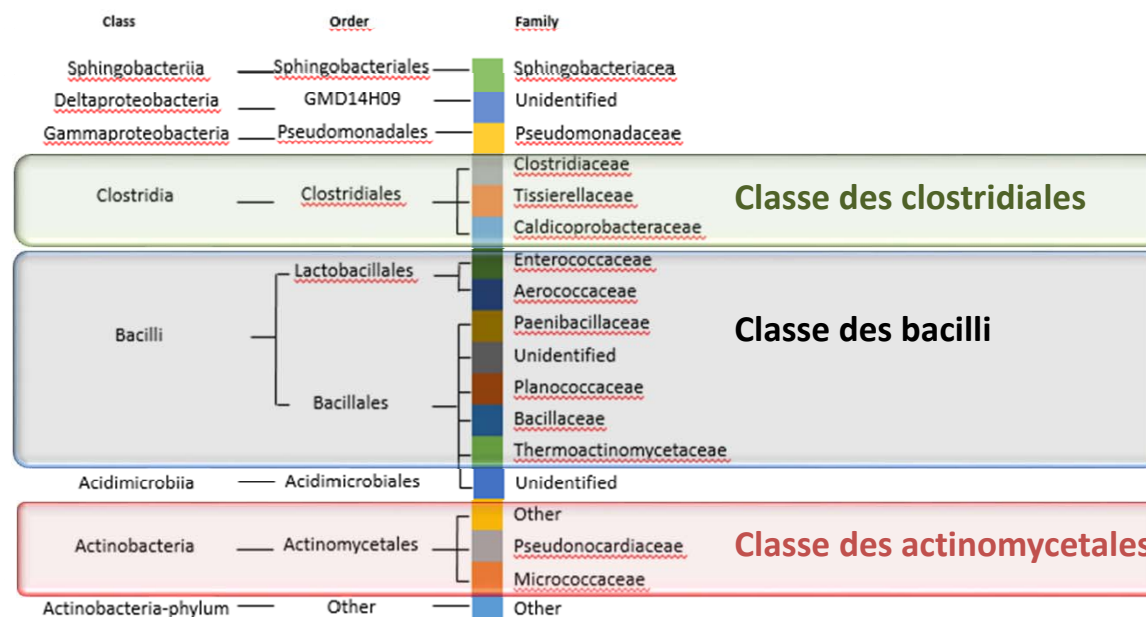
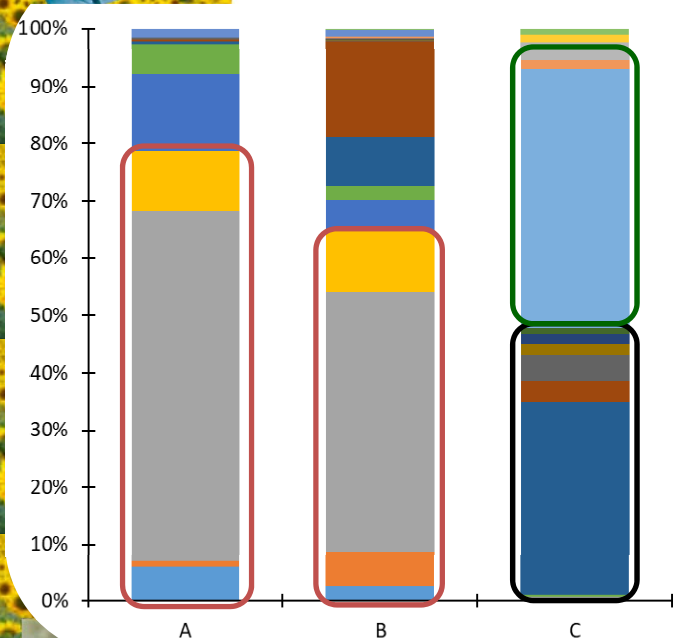


F. graminearum: le + abondant
F. avenaceum: le + fréquent
index élevé "d'intensité" (pesticides et N) favoriserait *F. tricinctum*

Identifier des antagonistes microbiens avec l'aide d'approches de métagénomique

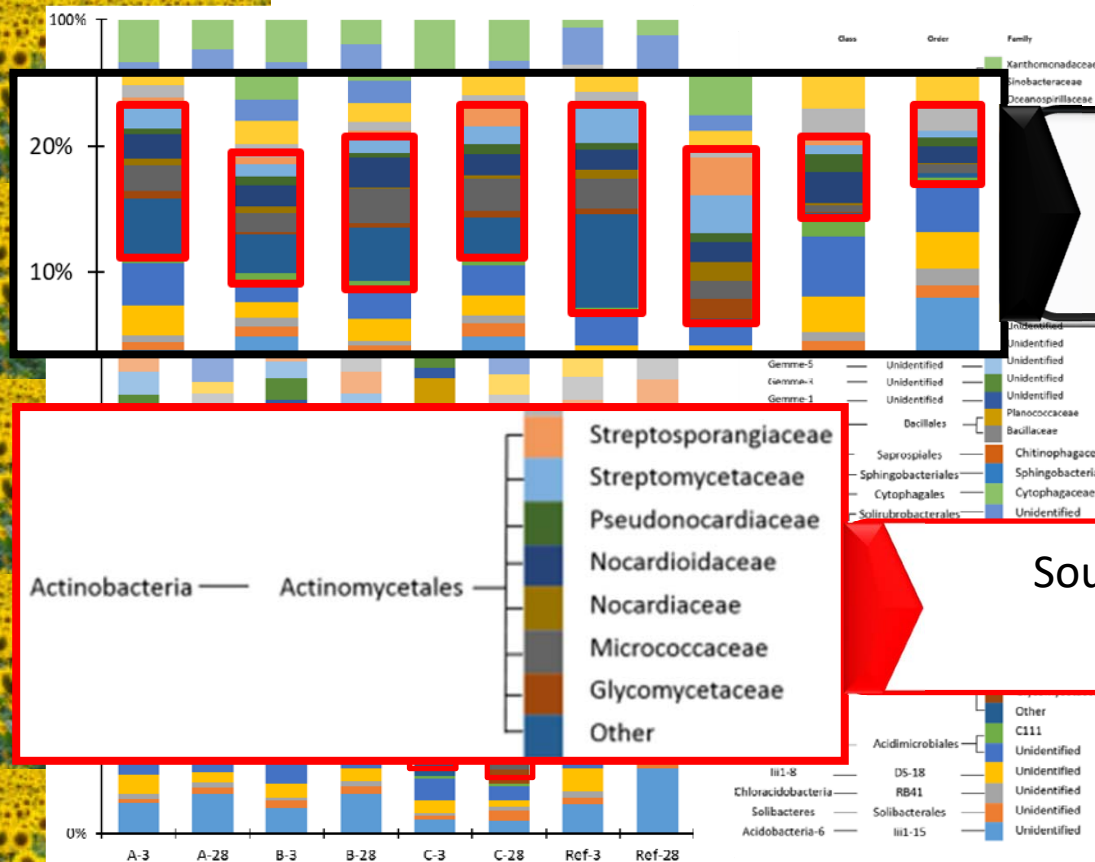
Ex: potentialités offertes par l'utilisation d'amendements (UMR Qualisud, Thèse Anh Nguyen Phuong)

F. verticillioides



3 amendements, A, B et C caractérisés par des communautés microbiennes différentes

Identifier des antagonistes microbiens avec l'aide d'approches de métagénomique



Apport de 1% d'amendement modifie considérablement les communautés microbiennes

Source d'antagonistes microbiens / *F. verticillioides*

1 souche *Streptomyces* sélectionnée — *F. verticillioides* (Croissance et FB)

- comparaisons des endométabolomes et transcriptomes seules ou en confrontation
- 29 métabolites impliqués dans les modifications du métabolome de *F. verticillioides* en co-culture avec *Streptomyces*
- Etude du transcriptome => même sens que celle du métabolome.

Données métabolomiques et transcriptomiques ➔ Compréhension des mécanismes mis en jeu

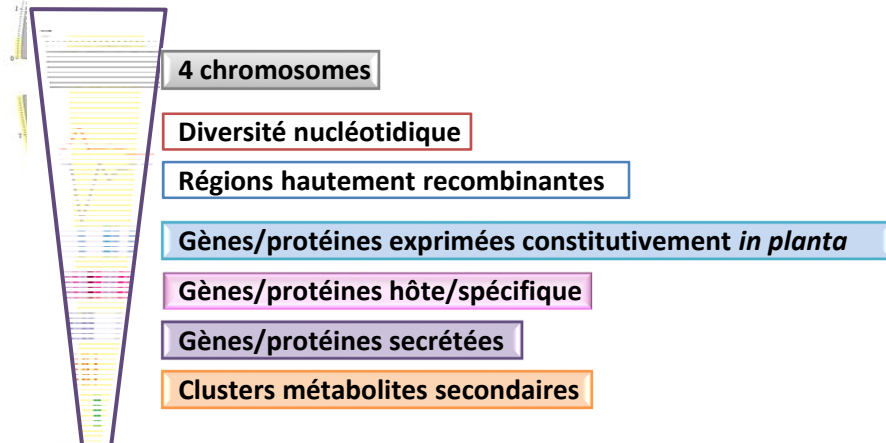
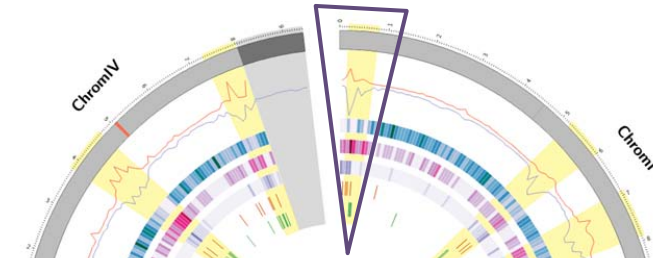
Des approches de métagénomique pour analyser les *Fusarium spp.* au sein d'écosystèmes complexes

- Etudes majoritairement ciblées sur l'analyse des communautés microbiennes dans les sols: sol suppressif ? Antagonistes microbiens ?
Micro-organismes qui favorisent la croissance des plantes (PGPM: plant growth promoting microorganisms) ? (LUBEM, Qualisud)
- Etudes sur épis limitées à l'analyse des grains à maturité et aux communautés fongiques (amplicon sequencing) : impact des conditions pédoclimatiques et systèmes de culture sur l'abondance et diversité des espèces toxigènes

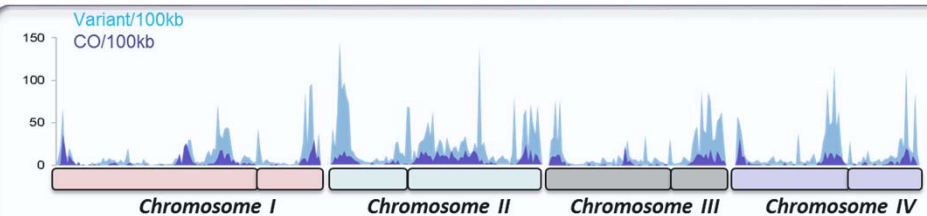
Axes à développer : phyllosphère de l'épi (whole genome shotgun) avec une échelle temporelle (cinétique de la floraison à maturité) et spatiale (situations de production)



Les outils de génomique pour appréhender la diversité intraspécifique chez les *Fusarium* toxinogènes



Représentation de la carte génétique *F. graminearum* (UR MycSA, Laurent et al., 2016)



La **recombinaison** : **moteur** de **diversité**?

Cette organisation illustre la capacité d'adaptation de *F. graminearum* **dans son environnement**

La **production de métabolites secondaires**:

➡ rôle dans la capacité d'adaptation et évolution?

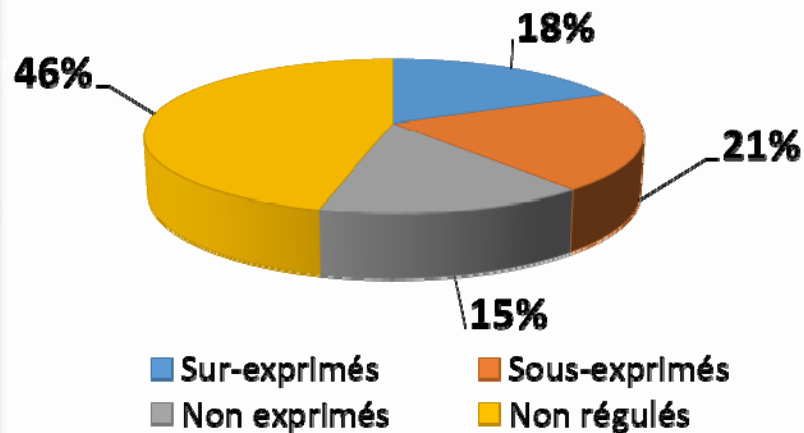


Transcriptomique et métabolomique pour décrypter les réseaux de régulation de la toxinogénèse

Exemple: Toxinogénèse et stress redox

→ Ac caféique 0,5 mM inhibe la biosynthèse de DON sans affecter la biomasse fongique

+ acide caféique (DON-)/vs témoin (DON+)



— biosynthèse de DON en présence d'acide caféique
 → module l'expression de 54 % de gènes (gènes exprimés +/- 14 500)

→ **Réorganisation transcriptionnelle majeure** appuyant l'idée que *F. graminearum* possède une forte capacité d'adaptation aux stress environnementaux et que la production de DON est un élément de cette réponse adaptative



A close-up, slightly low-angle shot of a dense field of sunflowers. The sunflowers are in various stages of bloom, with bright yellow petals and dark brown centers. The background is a clear, bright blue sky with a few wispy white clouds. The overall mood is cheerful and sunny.

ANALYSE

Xylose $\longleftrightarrow$ Xylitol

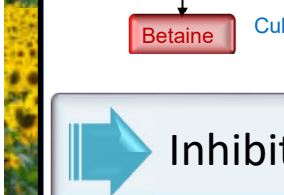
Arabinose

Choline $\longleftrightarrow$ Betaine

Cul

Inhibi

Augment

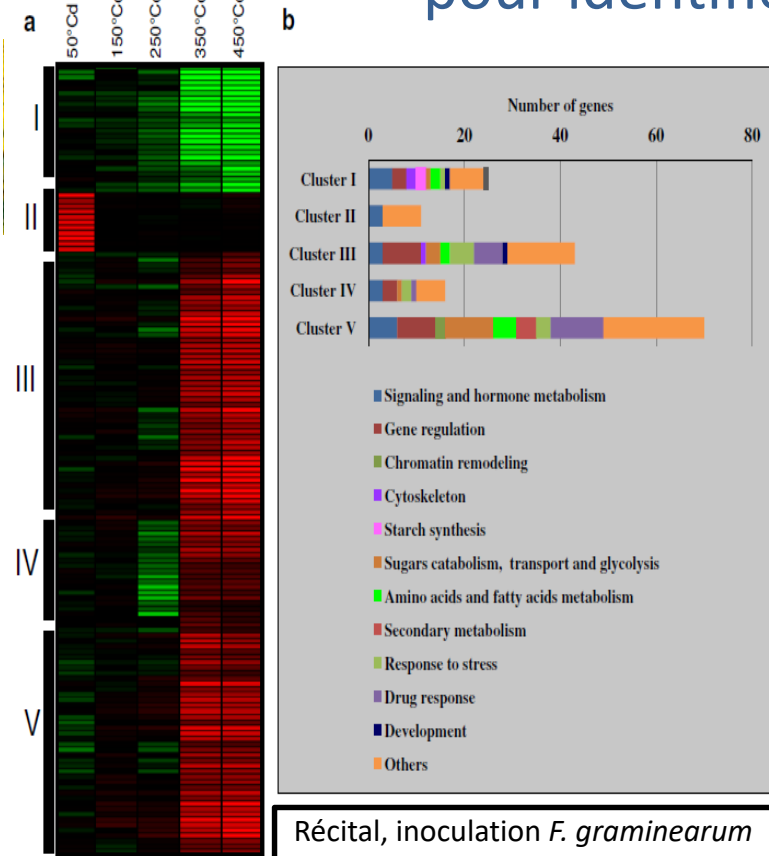


 Inhibition de la production de DON induit une réorganisation métabolomique globale





Interactions Plante/Fusarium: Approches transcriptomiques pour identifier de nouvelles sources de résistance



UMR GDEC, Chetoui et al., 2016



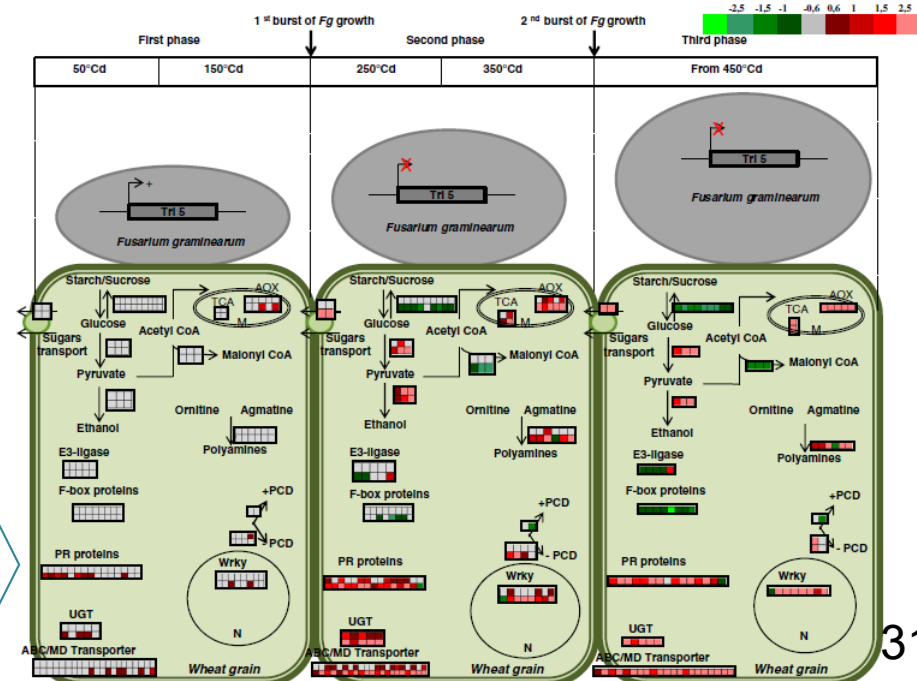
Représentation schématique des profils d'expression génique des voies métaboliques, des voies de défense, des mécanismes de détoxification, des facteurs de transcription et d'apoptose (PCD) aux 3 phases du développement de Fg sur grains de blé

+/-170 gènes dont l'expression est affectée par inoculation et stade ontogénique

F. graminearum "manipule" son hôte pour créer un environnement favorable à son développement

Inhibition mécanismes de défense, Activation mécanismes de détoxification, Remobilisation des réserves, Contrôle des processus de mort cellulaire

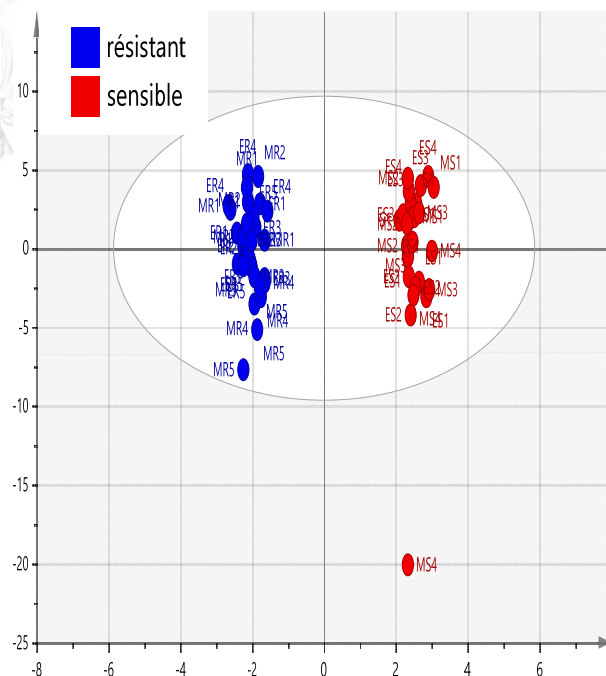
Gènes candidats: résistance et sensibilité → Validation?





Interactions Plante/*Fusarium*: approches métabolomiques pour identifier de nouvelles sources de résistance

Maïs 20 génotypes R/S



$R^2=0,988$

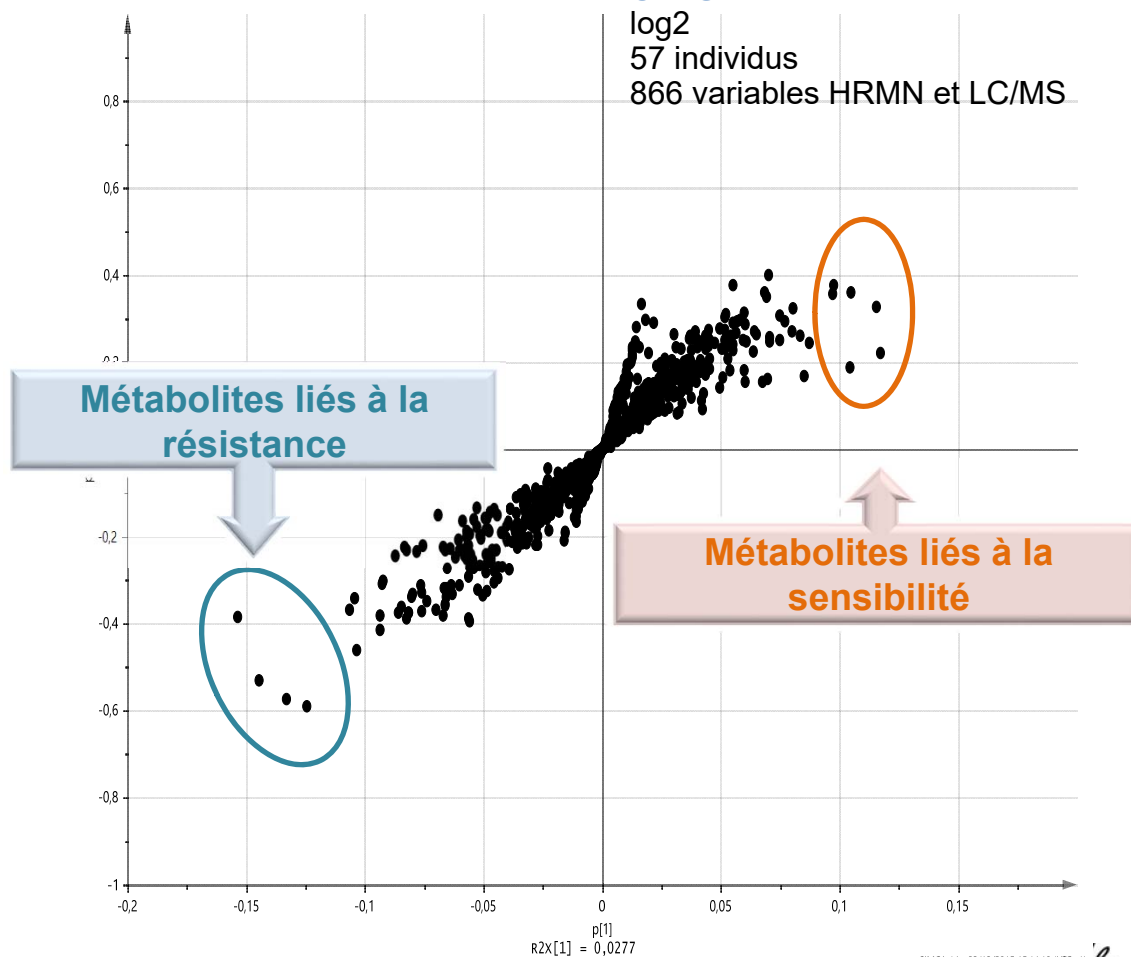
$Q^2=0,631$

OPLS-DA

log2

57 individus

866 variables HRMN et LC/MS



SIMCA 14 - 02/12/2015 15:14:18 (UTC+1)

Intégration des données pour la construction de modèles de gestion, prédiction et anticipation du risque



Variables climatiques et agronomiques

Données de terrain

Modèles empiriques

MycoLIS
(Arvalis)

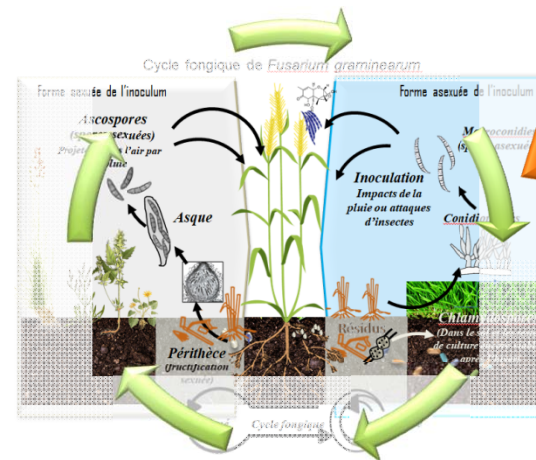
Modèles mécanistiques

IPSIM*-FHB-Wheat
IPSIM*-DON-Wheat
(UMR AGIR, PURPAN)

*IPSIM: Injury Profile SIMuator

Stress environnementaux

Données *in vitro*



Sporulation
Dispersion
Evolution
Germination
Infection/plante
Croissance
Métabolisme
....



Plateforme IPSIM a pour objectif de présenter la méthodologie retenue pour construire les modèles de simulation d'un profil de dégâts pour une culture en fonction des pratiques culturales, du pédoclimat et de l'environnement de la parcelle.



Modification des systèmes de culture et risque "mycotoxine":
pas de conclusions possibles avec les données actuelles

Mettre en place et/ou pérenniser les dispositifs permettant de l'appréhender

Des recherches actives pour identifier/optimiser des solutions
: les données actuelles sont au stade du laboratoire, de la serre

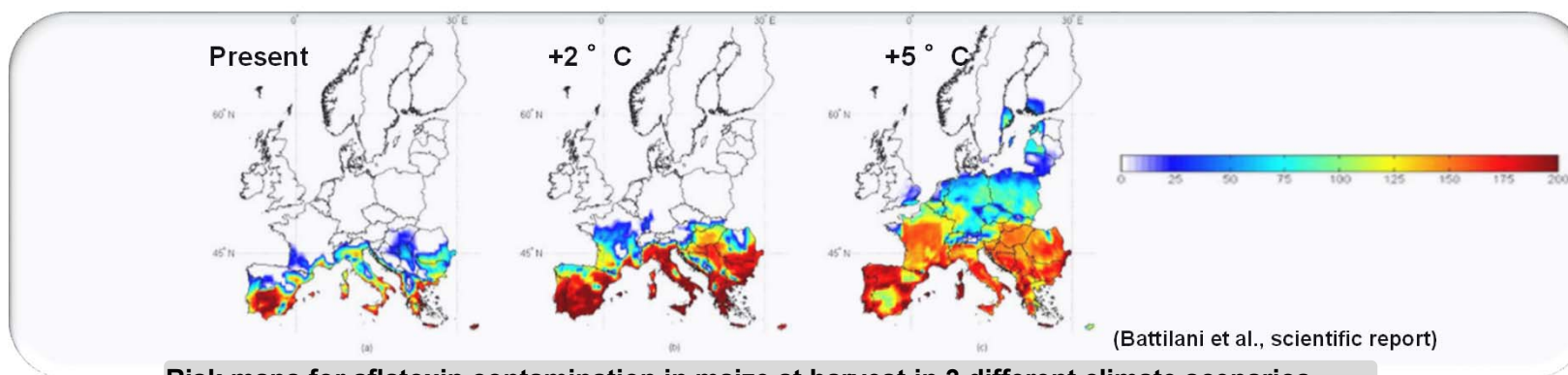
Du laboratoire/serre aux parcelles agricoles et en interactions avec les caractéristiques de la situation de production

Certaines pratiques agronomiques peuvent avoir des effets opposés selon la famille de contaminants

Développer des approches "multicontaminants"

Attention, le profil de contaminants rencontré dans les récoltes est susceptible d'évoluer avec les modifications climatiques

Acquérir les données pour modéliser l'évolution du risque
(en prenant en compte les interactions abiotiques et biotiques qui sont étroitement liées aux systèmes de culture)



Risk maps for aflatoxin contamination in maize at harvest in 3 different climate scenarios





Merci de votre attention



Christine Ducos
Marie-Noëlle Bonnin-Verdal
Gisèle Marchegay
Florence Forget-Richard