



Dégradation de la Fumonisine B1 par la communauté microbienne dans les ensilages de maïs grain humide

Ccori Silbina Martinez Tuppia

► To cite this version:

Ccori Silbina Martinez Tuppia. Dégradation de la Fumonisine B1 par la communauté microbienne dans les ensilages de maïs grain humide. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0250 . tel-01720257

HAL Id: tel-01720257

<https://theses.hal.science/tel-01720257>

Submitted on 1 Mar 2018

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ DE MICROBIOLOGIE

Par Ccori MARTINEZ TUPPIA

**Dégradation de la Fumonisine B1 par la communauté
microbienne dans les ensilages maïs grain humide**

Sous la direction de : Jean-Michel SAVOIE

Soutenue le 4 décembre 2015

Membres du jury :

Mme. LE HENAFF, Claire	Professeur ISVV de Bordeaux	Président
M. MORGAVI, Diego	Directeur de Recherche INRA de Clermont-Ferrand	Rapporteur
M. SIMONET, Pascal	Directeur de Recherche CNRS, EC de Lyon	Rapporteur
Mme. PICOT, Adeline	Maître de Conférences UBO de Brest	Examineur
Mme. FORGET, Florence	Directeur de Recherche INRA de Bordeaux	Examineur
Mme. CHAUCHEYRAS, Frédérique	Ingénieur de Recherche LALLEMAND	Invité

Titre : Dégradation de la Fumonisine B1 par la communauté microbienne dans les ensilages de maïs grain humide

Résumé : Les mycotoxines telles que la fumonisine B1 (FB1) produites par les champignons du genre *Fusarium* sont particulièrement préoccupantes pour la filière maïsicole. L'ensilage de maïs est un processus de fermentation naturel susceptible de favoriser l'évolution des teneurs en FB1. La maîtrise du risque de contamination par la FB1 et la recherche de moyens permettant la décontamination des ensilages est donc nécessaire.

L'objectif de ce travail est de caractériser le devenir de la FB1 dans les ensilages de maïs grain et de mettre en évidence l'existence d'agents microbiens capables de dégrader cette toxine. Pour cela, des mini-silos contenant du maïs grain naturellement contaminé en FB1 provenant de différentes parcelles et issus des deux années de récolte ont été préparés. La stratégie analytique basée sur le dosage de la FB1 libre et la FB1 complexée par HPLC-MS/MS a révélé une diminution significative de la teneur en FB1 totale qui ne peut être attribuée à un mécanisme de complexation et résulte d'un mécanisme de dégradation. La recherche du microbiote associé à la dégradation de la FB1 a été réalisée par deux approches complémentaires : Une analyse métagénomique combinant l'extraction sélective de l'ADN microbien et le séquençage haut débit «shotgun» afin de comparer la diversité taxonomique et fonctionnelle d'un ensilage dégradant la FB1 et d'un ensilage moins dégradant. En parallèle, un criblage de microorganismes cultivables capables de métaboliser la FB1 a été conduit et a permis de confirmer les résultats de l'analyse globale. Ce travail apporte une première image du microbiote potentiellement associé à la dégradation de la FB1, ainsi que des activités microbiennes responsables.

Mots clés: Ensilage, fumonisine B1, biodégradation, métagénomique.

Title: Degradation of Fumonisin B1 by microorganisms in high moisture maize grain silages

Abstract: Fungi of the genus *Fusarium* are one of the major contaminants of maize that can produce mycotoxins, such as the fumonisin B1 (FB1). Maize silage which is based on the fermentation of whole crop plant or grains is considered the main source of monogastrics and cattle feeding in Europe. The ensiling process could favor changes in FB1 content; however this has scarcely been documented. This led to questioning regarding the possibility of managing the microbiota during ensiling in order to reduce the level of mycotoxins exposure and improve feed quality.

The aim of this work is to study the fate of FB1 during ensiling process of high moisture maize grain and to identify an endemic microbiota capable of degrading FB1. Laboratory scale silages were prepared with naturally contaminated FB1 grains from two cropping years. An analytical procedure allowed assessing both free and matrix associated FB1 forms and showed a significant decrease in total FB1 content that are not linked to the presence of bound FB1. Additionally, our data showed that the FB1 content decrease was mainly due to a degradation process. Identification of a potential microbiota responsible for FB1 degradation was conducted. A metagenomics approach combining a selective microbial DNA extraction and high-throughput shotgun sequencing showed microbial specific patterns between FB1 degrading and weakly degrading silage. These results were also supported by the isolation of microbial strains able to metabolize FB1. Ultimately, this work evidenced a microbiota associated to FB1 degradation and the functional diversity involved in this activity. Bacteria and yeasts have been obtained for further studies on degradation activities and their usage as silage starter.

Keywords: Silage, fumonisin B1, biodegradation, metagenomics.

MYCOLOGIE & SÉCURITÉ DES ALIMENTS (MycSA)

INRA de Bordeaux, UR1264, 71 avenue Edouard Bourlaux, CS20032
33882 Villenave d'Ornon Cedex France

« L'homme dans tout son être est toujours régi par le destin du dévoilement. Tout dévoilement vient de ce qui est libre, va à ce qui est libre, et conduit vers ce qui est libre. »

Martin Heidegger

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'unité Mycologie et Sécurité des Aliments de l'INRA de Bordeaux dans le cadre d'une convention CIFRE dont les partenaires étaient l'INRA, l'ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique) et la société Lallemand.

Je voudrais commencer par adresser mes sincères remerciements à Mme Claire Le Henaff-Le Marrec, Mr Diego Morgavi, Mme Adeline Picot et Mr Pascal Simonet pour avoir accepté de juger ce travail de thèse ainsi que pour leurs précieuses remarques.

Je remercie Jean-Michel Savoie, mon directeur de thèse et directeur de l'unité MycSA, pour m'avoir accueillie au laboratoire pendant ces trois années, pour votre aide et m'avoir proposé un sujet aussi intéressant.

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance à Christian Barreau et Florence Richard-Forget, pour l'encadrement de cette thèse. Merci pour votre confiance, votre patience, votre disponibilité, et pour être aussi bons chercheurs qu'êtres humains. Vos enseignements, conseils et encouragements (qui réchauffent le cœur) m'ont permis de grandir et d'aboutir cette thèse malgré mon stress fréquent.

Je remercie très vivement Vessela Atanasova-Penichon et Nadia Ponts, pour m'avoir encadrée et guidée au cours de cette thèse. Vessela, merci pour tous ces enseignements et pour avoir partagé toute ta passion pour la biochimie avec moi. Merci de ta gentillesse, de ta franchise et de ta justesse. Tes commentaires ont toujours été fort judicieux et ont enrichi ma formation. Nadia, tu m'as permis de découvrir ma chère « métagénomique », toujours d'une façon très positive. Merci pour avoir partagé toute ton expertise avec moi et de toutes nos discussions autant sur le plan professionnel que personnel. Les filles, cette thèse est aussi grâce à vous.

Un grand, grand merci également à Sébastien Theil. Merci pour ton aide précieuse, ta disponibilité et ton travail magnifique dans la partie métagénomique, qui a beaucoup contribué à ce travail et à ma formation.

Je voudrais remercier Nathalie Ferrer pour avoir pris soin de nos petits isolats, pour ta motivation et pour toutes les « manipes » que tu as réalisées. Cela a beaucoup contribué au résultat de ce travail.

Merci également à Sylvain Chéreau, car malgré ton arrivé en cours de route, tu m'as beaucoup aidée. Tes remarques ont toujours été très pertinentes et enrichissantes ainsi que ta bonne humeur stimulante. Je veux également remercier Laetitia pour son aide (notamment pour la qPCR), sa gentillesse et pour avoir toujours eu un petit moment pour m'écouter.

Mes plus chaleureux remerciements vont également à Frédérique Chaucheyras, Henri Durand, Mathieu Castex et Pascal Drouin de la société Lallemand SAS, pour votre confiance, vos conseils et le temps consacré tout au long de ce travail.

Je voudrais également remercier tous les techniciens du laboratoire, particulièrement Cathy, pour ton aide à la paillasse ; Magalie (ma Mag), pour m'avoir aidée dès que j'en avais besoin ; Christine, pour m'avoir révélé les mystères de la qPCR ; Gisèle, pour m'avoir aidée avec le dosage de fumonisines, Enric pour tes conseils et ton aide.

Je remercie également Régis Coudure de l'Institut Arvalis et Jean-George Cazaux de l'AGPM pour être à la source de ce projet et pour m'avoir fourni le matériel végétal nécessaire pour mettre en œuvre ce travail. Ses observations sur la diminution de la fumonisine dans les ensilages de maïs et leur intérêt pour comprendre ce phénomène ont permis donner naissance à ce projet. Je remercie également Monique Zagorec, directrice de Recherche de l'Unité Mixte de Recherche INRA/Oniris pour son expertise dans l'écologie microbienne de systèmes alimentaires, ses conseils et le temps accordé à ce travail.

Merci beaucoup à Corinne et Marie-France pour m'avoir aidée dans toute la partie administrative. Merci également à Thierry pour avoir pris soin de mon ordinateur.

Je voudrais remercier le reste de l'équipe Mycsa pour le partage au cours de ces 3 années et vos conseils. Une pensée particulière pour Marie Foulongne et Christophe Billette.

Je n'oublie pas mes chères sœurs et frère de thèse, car sans vous ce travail n'aurait pas été le même. Vous avez toujours eu la patience et la bonne volonté pour améliorer mon français et m'apprendre de nouveaux mots. Petite Léa, merci pour tout ton soutien, ton amitié, ton écoute. Mathilde ou Mathu merci, car même si tu as déjà passé le cap, tu as toujours été là et tu m'as beaucoup aidée et coachée. Cher Benoît ou Benito, merci pour ta bonne humeur, ton énergie, ton dynamisme et nos discussions. Vous allez beaucoup me manquer. Je remercie également les stagiaires passés par le laboratoire et d'autres doctorants. Ils sont contribués d'une façon ou d'une autre à ce travail. Une pensée particulière à Claire, Justine, Maëlys et Clément.

Pour terminer, je remercie de tout cœur ma chère famille (la péruvienne et la française) et mes amis, en particulier mes parents César et Mery, ma sœur Luisa et Patrice, qui m'ont toujours soutenue quoi qu'il arrive et sans qui je n'aurais pu accomplir toutes les choses que j'ai réalisées jusqu'à maintenant. Je leur dédie tout naturellement cette thèse, mais aussi à ma grand-mère qui m'a montré tout au long de sa vie la signification du mot courage.

Production scientifique

Publications

Ccori Martinez Tuppia, Vessela Atanasova-Penichon, Sylvain Chéreau, Nathalie Ferrer, Gisèle Marchegay, Mathieu Castex, Jean-Michel Savoie, Florence Richard-Forget. **High moisture maize grain ensiling is a process conducive to fumonisin B1 degradation.** *Toxins* Article soumis pour publication.

Ccori Martinez Tuppia, Christian Barreau, Vessela Atanasova-Penichon, Nadia Ponts, Florence Richard-Forget, Jean-Michel Savoie. **Contamination of food and feed with mycotoxins: uncovering detoxifying organisms from microbial communities by global genomic approaches.** Article en cours de préparation.

Savoie J-M., Martinez Tuppia C., Richard-Forget F. (2015). **Des microorganismes capables de dégrader les mycotoxines: de nouveaux levains pour garantir la qualité sanitaire d'aliments à base de céréales?** *Innovations Agronomiques* 44, 35-44.

Communications orales

Martinez Tuppia C., Theil S., Ponts N., Richard-Forget F., Barreau C., Castex M., Savoie JM. **Describing the evolution of moist corn grain silage microbiome.** ESF-EMBO Symposium. System biology of host-microbiome interactions. 2015. 5-10 June, Pulstuck, Poland.

Martinez Tuppia C., Theil S., Richard-Forget F., Barreau C., Castex M., Savoie JM., Ponts N. **The fumonisin-degrading microbiome of moist corn grain silage.** FUSATOX meeting. Bordeaux, France, Mars 2015.

Martinez Tuppia C., Atanasova-Penichon V., Barreau C., Castex M., Savoie JM., Richard-Forget F. **Transformation of Fumonisin by microorganisms in moist corn grain silages.** International Mycotoxin Conference. 2014. 20-23 May, Beijing, China.

Présentations poster

Martinez Tuppia C., Theil S., Richard-Forget F., Barreau C., Castex M., Savoie JM., Ponts N. **Microbiome evolution during moist corn grain silage.** Club Bactéries Lactiques. 2015. June 17-19, Lille, France. Prix du meilleur poster.

Martinez Tuppia C., Barreau C., Richard-Forget F., Durand H., Savoie JM. **Degradation of fumonisins by microorganisms in moist corn grain silages.** 35th Mycotoxin Workshop. 2013. May 22-24, Ghent, Belgium.

Martinez Tuppia C., Barreau C., Durand H., Richard-Forget F., Savoie JM. **Degradation of fumonisins by microorganisms in moist corn grain silages.** 12th European Fusarium Seminar. 2013. May 12-16, Bordeaux, France.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFB	Aflatoxine
AGPM	Association générale des producteurs de maïs
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAP	Contig Assembly Program
COG	Clusters of Orthologous Groups
CTAB	Cétyltriméthylammonium bromure
DGGE	Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant
DON	Déoxynivalénol
EC	European Commission
FB1	Fumonisine B1
FLD	Fluorescence Detector
FOAM	Functional Ontology Assignments for Metagenomes
HFB1	Fumonisine B1 hydrolysée
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LAB	Lactic Acid Bacteria
LC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
MGH	Maïs grain humide broyé ensilé
MGHE	Maïs grain humide entier inerté
MM	Milieu minimum
MRS	Gélose de Man, Rogosa, Sharpe
NGS	Séquençage haut débit
NIV	Nivalénol
OTA	Ochratoxine
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	PCR en temps réel
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
Rpkm	Reads Per Kilobase per Million mapped reads
SAX	Colonnes d'échange d'anions
TCA	Acide tricarballoylique
TCT	Trichothécène
TR	Temps de rétention
USDA	U.S. Department of Agriculture
VNC	Viable non cultivable
ZEN	Zéaralène

Table des matières

Introduction générale et objectifs	1
Chapitre I : Contexte bibliographique	5
1. Le maïs et l'ensilage de maïs	6
1.1 Le maïs en quelques chiffres	6
1.2 Ensilage de maïs	7
1.2.1 Ensilage de maïs plante entière	8
1.2.2 Ensilage de maïs grain humide.....	8
1.2.3 Facteurs environnementaux affectant l'ensilage	9
2. La complexité microbienne présente dans les ensilages de maïs	11
2.1 Les bactéries des ensilages	14
2.2 Les levures des ensilages.....	17
2.3 Méthodes globales pour l'étude de la communauté microbienne dans les ensilages de maïs	18
3. Les mycotoxines dans les ensilages de maïs : un problème récurrent	20
3.1 Les fumonisines, un problème fréquent pour les ensilages.....	22
3.1.1 Les agents producteurs de fumonisines.....	23
3.1.2 Structure chimique des fumonisines	23
3.1.3 Mécanisme d'action des fumonisines	24
3.1.4 Toxicité des fumonisines.....	25
3.1.5 Réglementation des fumonisines.....	26
3.1.6 Méthodes d'analyse des fumonisines	27
3.1.7 Fumonisines dites complexées ou masquées	29
3.2 Devenir des mycotoxines dans les processus fermentaires des ensilages	31
4. Méthodes biologiques de détoxification des mycotoxines dans les produits céréaliers	32
Article "Contamination of food and feed with mycotoxins: uncovering detoxifying organisms from microbial communities by global genomic approaches"	36
4.1 Introduction	37
4.2 Screening for mycotoxin degrading microorganisms	40
4.2.1 Microorganisms with multi-mycotoxin degradation abilities	43
4.2.2 Microorganisms from environments: soil and plant tissues.....	44
4.2.3 Microorganisms of animal microbiota: ruminant and non-ruminants animals	45

4.3 Mechanisms and environmental factors involved in mycotoxin transformation by microorganisms.....	46
4.3.1 Mechanisms of degradation	46
4.3.1.1 Aflatoxin transformation	46
4.3.1.2 Ochratoxin transformation	47
4.3.1.3 Trichothecenes transformation	47
4.3.1.4 Zearalenone transformation.....	49
4.3.1.5 Fumonisin transformation.....	49
4.3.1.6 Patulin transformation	51
4.3.1.7 “Emerging Fusarium mycotoxins” transformation	52
4.3.2 Influence of environmental factors on mycotoxin degradation.....	53
4.4 How the knowledge on mechanisms of mycotoxin degradation can be exploited?.....	54
4.4.1 Detoxification by specific microbial enzymes	54
4.4.2 Safe uses of detoxification microbial additives and legislation	56
4.5 New approaches for microbial screening: Molecular fingerprinting and omic methods ...	58
4.6 Conclusions and perspectives.....	62
 Chapitre II : Devenir de la FB1 au cours de l’ensilage de maïs grain.....	63
Article "High moisture maize grain ensiling is a process conducive to fumonisin B1 degradation"	67
1. Introduction	68
2. Results	72
2.1 Dynamic of free FB1 in high moisture maize grain silages	72
2.2 Dynamic of matrix-associated FB1 in high moisture maize grain silages	73
2.3 Search of hydrolysed metabolites of FB1 in high moisture maize grain silages	74
3. Discussion	75
4. Materials and methods	79
4.1 Chemicals and reagents	79
4.2 Maize samples and mini silos preparation	79
4.3 Definition of an analytical procedure to assess the whole fumonisin content in high moisture maize grain silages.....	80
4.4 Extraction and purification of free FB1	81
4.5 Alkaline hydrolysis for matrix-associated FB1 analysis.....	81
4.6 Characterization of FB1 metabolites using ATCC 74269 model yeast strain	81

4.7 LC-MS analysis.....	82
4.8 Data and statistical analyses.....	83
5. Conclusion.....	83

Axe 2 : Recherche d'agents microbiens impliqués dans la dégradation de la FB1 dans les ensilages de maïs grain	85
---	----

Chapitre III : Criblage des microorganismes cultivables pour leur capacité à dégrader la FB1	87
1.Introduction	88
2.Procédures expérimentales	89
2.1 Matériel biologique	89
2.1.1 Echantillons végétaux	89
2.1.2 Préparation des mini-silos	89
2.1.3 Microorganismes de référence	90
2.2 Construction d'une banque des isolats à partir de mini-silos.....	91
2.2.1 Isolement direct des microorganismes	91
2.2.2 Isolement après enrichissement succesif avec FB1.....	92
2.3 Criblage préliminaire des isolats pour leur capacité à se développer dans un milieu enrichit en FB1.....	93
2.4 Extraction d'ADN des isolats candidats.....	93
2.5 Identification taxonomique des isolats candidats.....	94
2.6 Caractérisation des microorganismes capables de métaboliser la FB1	94
2.7 Quantification de FB1 et HFB1 par LC-MS	96
2.8 Mise au point d'un outil moléculaire de caractérisation des gènes impliqués dans la dégradation de la fumonisine B1	96
2.8.1 Dessin d'amorces spécifiques du gène <i>FumI</i> et <i>FumD</i>	97
2.8.2 Conditions d'amplification en qPCR	97
3.Résultats et discussions	98
3.1 Isolats microbiens obtenus à partir des ensilages maïs grain	98
3.2 Capacité des isolats à se développer en présence de FB1	99
3.3 Identification des isolats candidats issus des ensilages de maïs grain	100
3.4 Dégradation de la FB1 par les microorganismes présents dans les ensilages maïs grain	102

3.5 Utilisation de gènes ciblés impliqués dans la dégradation de la FB1 pour repérer des microorganismes potentiellement dégradants.....	106
4.Conclusions	107

Chapitre IV : Analyse globale de la communauté microbienne potentiellement associée à la dégradation de la FB1	109
--	-----

1.Introduction	110
2.Procédures expérimentales	111
2.1 Enrichissement microbien	111
2.2 Extraction de l'ADN microbien	112
2.3 Validation de la méthode d'enrichissement en ADN microbien.....	112
2.4 Analyse métagénomique	113
2.5 Pipeline d'analyse bio-informatique	113
3.Résultats et discussion.....	115
3.1 Stratégie d'analyse de la communauté microbienne	115
3.2 Rendement et qualité du séquençage à haut débit.....	116
3.3 Diversité et évolution de la communauté microbienne au cours de l'ensilage	117
3.4 Profils métagénomiques associés à la dégradation de la fumonisine B1	123
4.Conclusion.....	125

Chapitre V : Discussion générale et perspectives	128
--	-----

1.- Stratégies et résultats majeurs	129
2.- Confirmation de la dégradation de la fumonisine B1 au cours de l'ensilage de maïs grain humide	132
3. Mise en évidence des agents microbiens impliqués dans la dégradation de la FB1	135
4.- Conclusions et perspectives	138
Références	141
Annexes.....	160

Table des figures

Figure 1 : Résumé des différentes questions posées englobant chaque chapitre de ce manuscrit	3
Figure I.1 : Production mondiale du maïs en 2012	5
Figure I.2 : Production de l'ensilage de maïs plante entière en France.....	7
Figure I.3 : Facteurs environnementaux influant sur le développement d'un silo-boudin, qui est fréquemment utilisé pour l'ensilage de maïs grain en France	8
Figure I.4 : Evolution théorique de la teneur en oxygène, du pH et des communautés microbiennes présentes au cours du développement de l'ensilage	10
Figure I.5 : La contamination mondiale en mycotoxines dans le maïs destiné à l'alimentation animal	21
Figure I.6 : Cycle d'infection du maïs par <i>Fusarium verticillioides</i>	22
Figure I.7 : Symptômes classiques d'épis fusarié par <i>F. verticillioides</i>	22
Figure I.8 : Structure chimique des fumonisines du groupe B	23
Figure I.9 : Comparaison entre la structure chimique de la FB1 et les bases sphingoides : sphinganine, sphingosine	23
Figure I.10 : Représentation schématique du mode d'action de la FB1 sur le métabolisme des sphingolipides.....	24
Figure I.11 : Dérivatisation des fumonisines	27
Figure I.12 : Représentation schématisée de la complexation de la FB1 avec des protéines et l'amidon, ainsi que leur libération après hydrolyse alcaline	28
Figure I.13 : Structure chimique des formes conjuguées de la FB1 après traitement thermique	29
 Figure II.1 : Evolution of free FB1 concentration during maize grain ensiling (D0, D78, D141).....	71
Figure II.2 : Evolution of matrix-associated FB1 concentration during maize grain ensiling (D0, D78, D141).....	72
Figure II.3 : Search of FB1 metabolites in ATCC 74269 broth supplemented with FB1.....	73
Figure II.4 : Flow chart of the analytical procedure used to quantify free and matrix-associated FB1 in maize silage	79
Figure III.1 : Grain de maïs ensilés et mini silos utilisés	88
Figure III.2 : Représentation schématique de la méthode d'isolement des microorganismes à partir d'enrichissement successif avec FB1	91

Figure III.3 : Représentation du gradient eau, 0,1% acide formique, utilisé pour l'analyse de FB1 et ses formes hydrolysées	95
Figure III.4 : Cluster de gènes de <i>Sphingopyxis</i> sp. MTA144 impliqué dans la dégradation de la FB1	95
Figure III.5 : Courbes de croissance des microorganismes en présence de la FB1	98
Figure III.6 : Dégradation de FB1 par la souche <i>W. anomalus</i> VA19	102
Figure III.7 : Cinétique de conversion de FB1 en HFB1 par la souche ATCC 55552	103
Figure IV.1 : Schéma de la stratégie d'analyse des lectures de séquençage	112
Figure IV.2 : Schéma présentant la stratégie d'analyse à partir des séquences assemblées et des gènes prédits.....	113
Figure IV.3 : Vérification de l'efficacité de la méthode d'enrichissement microbien.....	115
Figure IV.4 : Estimation de la profondeur de séquençage par l'analyse des courbes de raréfaction des échantillons (MEGAN).....	116
Figure IV.5 : Composition du microbiote présent au cours de l'ensilage de maïs grain. Données obtenues par assignation taxonomique des scaffolds (BLAST).....	117
Figure IV.6 : Phylogramme représentant l'évolution de la composition du microbiote de l'ensilage C pendant 78 jours de fermentation.....	118
Figure IV.7 : Profil fonctionnel de l'ensilage C au cours de la fermentation par regroupement de séquences selon leur catégorie fonctionnelle (SEED).....	120
Figure IV.8 : Comparaison du microbiote présent dans l'ensilage dégradant (D) et moins dégradant (C) à J0 et après 78 jours de fermentation.....	122
Figure IV.9 : Comparaison du microbiote présent dans l'ensilage dégradant (D) et moins dégradant (C) à J0 et après 78 jours de fermentation.....	123
Figure IV.10 : Valeur Rpkms des gènes prédits d'un ensilage dégradant (D) et moins dégradant (C) impliqués dans le métabolisme d'acides aminés (KEGG).....	123

Table des tableaux

Tableau I.1 : Occurrence des fusariotoxines dans les ensilages de maïs plante entière.....	20
Tableau I.2 : Teneurs maximales recommandées en fumonisines pour les produits destinés à l'alimentation animale	26
Tableau I.3 : Microorganisms involved in mycotoxins degradation.....	39-40
Tableau I.4 : Microbial mechanisms involved in mycotoxin transformation	45
Tableau II.1 : Evolution of free FB1 and matrix-associated FB1 in silages processed with maize harvested in 2013 and percentage of matrix-associated FB1 at day 0.....	71
Tableau II.2 : Retention time and compound dependent parameters for LC-MS analysis of free FB1 and HFB1 in maize silages.....	81
Tableau III.1 : Séquences d'amorces utilisées pour l'identification des isolats candidats.....	93
Tableau III.2 : Conditions retenues pour le test de métabolisation de la FB1	94
Tableau III.3 : Amorces spécifiques des gènes <i>FumI</i> et <i>FumD</i> impliqués dans la dégradation de la FB1	96
Tableau III.4 : Exemples des isolats positifs au test de pre-secreening	99
Tableau III.5 : Identification taxonomique des isolats sélectionnés lors du pré-criblage pour leur capacité à croître en présence de FB1	99
Tableau III.6 : Dégradation de la FB1 après 96 h par les souches issues de l'ensilage maïs grain.....	103
Tableau IV.1 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes de référence.....	110
Tableau IV.2 : Rendement et qualité du séquençage à haut débit.....	115
Tableau IV.3 : Composition du microbiote présent au cours de la fermentation pondérée par la taille de génomes des taxons assignés	117

Le maïs est la plante la plus cultivée dans le monde avec une surface de culture de 140 millions d'hectares (AGPM). Le maïs est aussi considéré comme une des cultures céréalières la plus sensible aux maladies fongiques et à l'accumulation de mycotoxines. Le genre *Fusarium* est un des principaux genres incriminés dans les maladies fongiques du maïs. Les espèces fusariennes pathogènes spécifiques du maïs sont aussi capables de produire une très grande diversité de mycotoxines ou fusariotoxines dont les fumonisines. La contamination par les mycotoxines a lieu essentiellement au cours de la culture cependant, elle peut aussi se produire suite à une mauvaise gestion des conditions de stockage (Magan & Aldred, 2007). Lorsque les conditions climatiques sont favorables à l'infection et au développement de la fusariose au champ, aucune stratégie agronomique suffisamment efficace n'est disponible à ce jour pour garantir des taux minimaux en mycotoxines. Les mycotoxines sont des molécules très thermostables et leur dégradation par des procédés chimiques et physiques reste très difficile. Aussi, la problématique mycotoxine est au centre des préoccupations des filières céréalières dont la filière maïsicole. Les fumonisines du groupe B et notamment la fumonisine B1 (FB1) sont considérées comme les plus importantes du fait de leur occurrence et leur toxicité. Ces toxines sont produites principalement par *F. verticillioides* et *F. proliferatum*.

La toxicité des fumonisines est très bien documentée dans la littérature. Chez l'homme, la consommation de maïs contaminé pourrait être responsable de plusieurs pathologies. La FB1 est considérée comme un possible agent cancérigène (classe 2B) par l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer (IARC, 1993).

Cependant dans beaucoup de pays, le maïs est largement utilisé pour l'alimentation animale sous forme de maïs fourrager ou ensilage pour ses propriétés nutritives. L'ensilage de maïs grain est un mode de conservation humide basé sur la fermentation des composés du maïs par la communauté microbienne présente. Cette pratique, qui est en progression constante en Europe, concerne notamment l'alimentation des porcins et des bovins en

complément du maïs fourrager (AGPM). L'ensilage maïs grain permet de préserver la majeure partie des propriétés nutritionnelles du grain récolté. De plus, les conditions d'anaérobiose et d'acidité d'un ensilage bien mené ne sont pas favorables au développement fongique et à la production de fumonisines. Cependant des accidents tels que la hausse de la teneur en eau, de la pression en oxygène et des anomalies pendant l'acidification ne sont pas à exclure et peuvent conduire à la prolifération fongique et à l'accumulation de mycotoxines dans cette matrice (Keller, *et al.* 2013).

La contamination en fumonisines dans l'ensilage de maïs plante entière a été largement étudiée (Kim, *et al.*, 2004, Gonzalez Pereyra, *et al.*, 2008, Uegaki, *et al.*, 2013, Gallo, *et al.*, 2015). Des niveaux de contamination plus ou moins élevés ont été décrits, parfois au-dessus des seuils maximaux recommandés (576/2006/CE). En ce qui concerne l'ensilage de maïs grain, les données sont beaucoup plus fragmentaires. Aucune étude décrivant l'évolution des teneurs en fumonisines au cours de la fermentation n'a été publiée à notre connaissance. Cependant, des observations préliminaires réalisées par Arvalis-Institut du Végétal ont suggéré l'existence de conditions susceptibles de conduire à une diminution très significative du niveau des fumonisines B détectable, pouvant atteindre 80% (Coudure & Cazaux, communication personnelle). L'origine de la diminution de FB1 observée demande à être élucidée afin d'établir qu'il s'agit bien d'une dégradation de la toxine. En effet cette diminution pourrait simplement résulter d'un piégeage des fumonisines sous formes complexées dans la matrice grain au cours de l'ensilage. Plusieurs études ont montré la présence des fumonisines complexées qui ne sont pas détectables par les méthodes d'extraction et analyses conventionnelles (Dall'Asta, *et al.*, 2010, McCormick, 2013). Selon, Dall'Asta, *et al.* (2009) seulement 37% à 68% des fumonisines totales contenues dans le maïs sont extraites et analysées par les méthodes classiques. De ce fait, des méthodes indirectes

mettant en jeu une étape d'hydrolyse alcaline ont été développées afin de libérer ces formes complexées et de pouvoir quantifier toutes les fumonisines à partir de cette matrice (Dall'Asta, *et al.*, 2008, De Girolamo, *et al.*, 2014, Oliveira, *et al.*, 2015).

Les ensilages de maïs pourraient favoriser l'occurrence de fumonisines complexées du fait de changements physico-chimiques au cours de la fermentation. Cette hypothèse demande à être vérifiée. Le deuxième mécanisme qui pourrait expliquer une diminution des teneurs en fumonisines au cours de l'ensilage grain repose sur la capacité éventuelle de certains microorganismes endogènes de l'ensilage à dégrader les toxines. Duvick, *et al.* (1994) et Blackwell, *et al.* (1999) sont les premiers à avoir isolé une levure, *Exophiala spinifera*, qui possède le potentiel enzymatique pour décarboxyler et désaminer la chaîne aliphatique de la fumonisine B1. Des mécanismes similaires de dégradation ont été associés aux deux souches bactériennes ATCC 55552 et *Sphingopyxis* sp. MTA 144 (Heinl, *et al.*, 2010, Hartinger & Moll, 2011, Heinl, *et al.*, 2011). D'autres agents microbiens ont également été isolés pour leur capacité de dégradation (Camilo, *et al.*, 2000, Benedetti, *et al.*, 2006), cependant les mécanismes impliqués ont été très peu élucidés. L'ensemble de ces études est cependant basé sur le potentiel d'un isolat et non sur la capacité d'un consortium microbien. Compte tenu de la complexité de la communauté microbienne des ensilages, il serait très pertinent de s'intéresser à l'intégralité de cette communauté et des interactions possibles entre les membres de cette communauté.

Les approches génomiques globales basées sur les analyses « omics » peuvent permettre l'analyse exhaustive et directe d'un écosystème complexe tel que l'ensilage de maïs (Eikmeyer, *et al.*, 2013). Leur mise en œuvre pourrait ouvrir de nouvelles pistes de recherche pour identifier les microorganismes responsables et élucider les mécanismes de dégradation mis en jeu dans la transformation des fumonisines dans les ensilages de maïs.

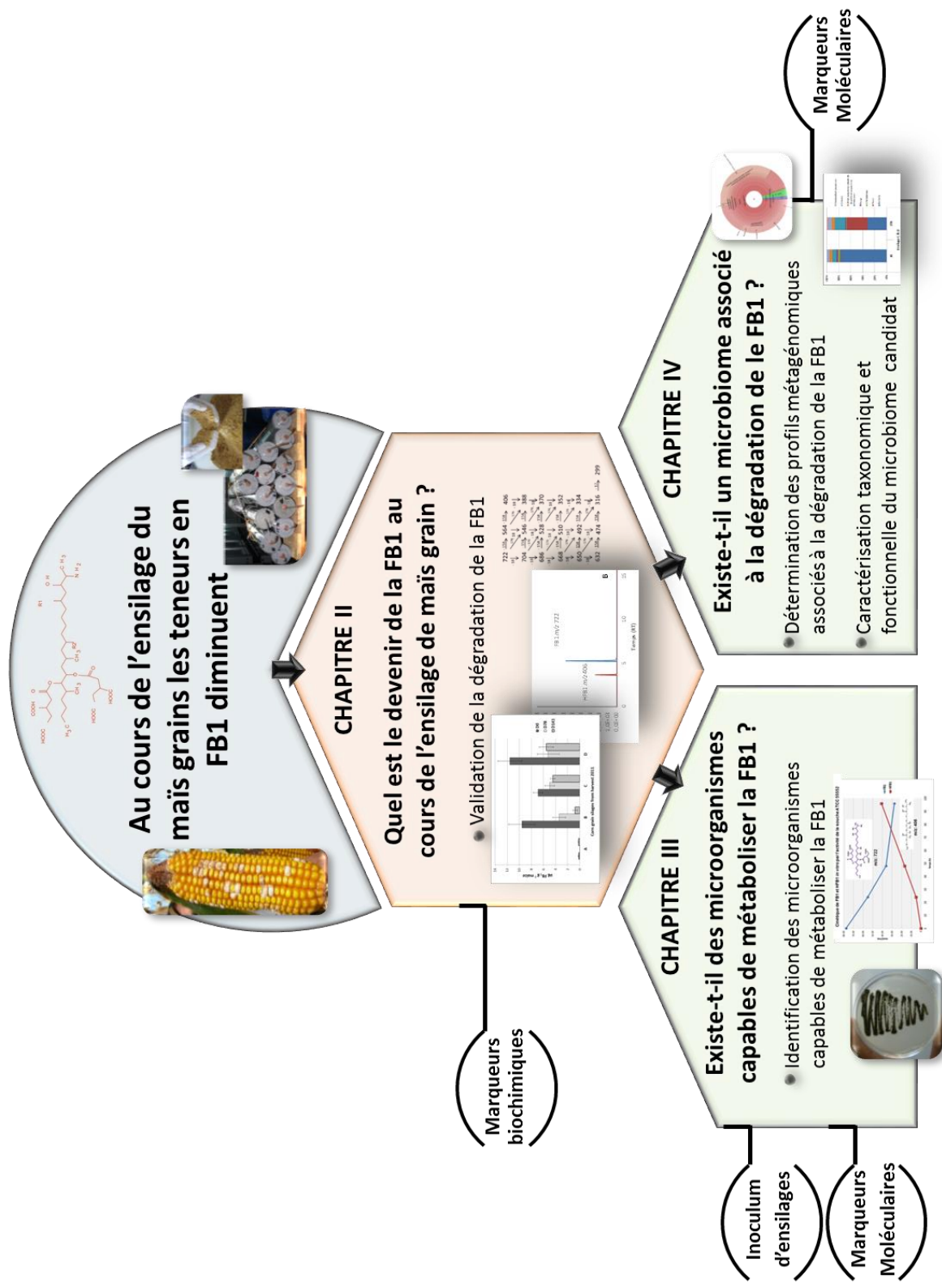


Figure 1 : Résumé des différentes questions posées englobant chaque chapitre de ce manuscrit.

L'objectif premier de ce travail (axe 1) est d'identifier les situations conduisant à une dégradation avérée des fumonisines au cours de l'ensilage maïs grain. Afin de répondre à cet objectif, nous définirons et appliquerons les protocoles adaptés pour rechercher les fumonisines dites libres et complexées dans les ensilages grains. Nous nous intéresserons aussi à identifier et repérer des métabolites issus de la dégradation des fumonisines. Ces résultats sont décrits dans le chapitre **II** de ce manuscrit.

Le second objectif de ce travail (axe 2) consistera en la recherche et l'identification des agents microbiens responsables de la dégradation des fumonisines. Cette recherche se fera par la mise en œuvre de deux axes complémentaires. D'une part une analyse ciblée avec criblage des microorganismes capables de métaboliser la FB1 et l'identification de gènes connus codant des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de la toxine à l'aide des outils qPCR. D'autre part, une analyse métagénomique comparative de la communauté microbienne présente dans des ensilages caractérisés pour leur forte et faible capacité de dégradation de la FB1 au cours de la fermentation, sera réalisée. Ce deuxième axe fait l'objet des chapitres **III** et **IV** de ce travail.

Les résultats obtenus dans ces deux axes permettront d'identifier des microorganismes ou des consortia microbiens capables de dégrader la FB1. Ils apporteront également des éléments de réponse pour la compréhension des mécanismes impliqués dans cette dégradation, afin d'identifier des métabolites de dégradation et de nouveaux gènes codant des activités spécifiques. Dans la **Figure 1** sont résumées les différentes questions posées au cours de ce travail de thèse.

Chapitre I : Contexte bibliographique

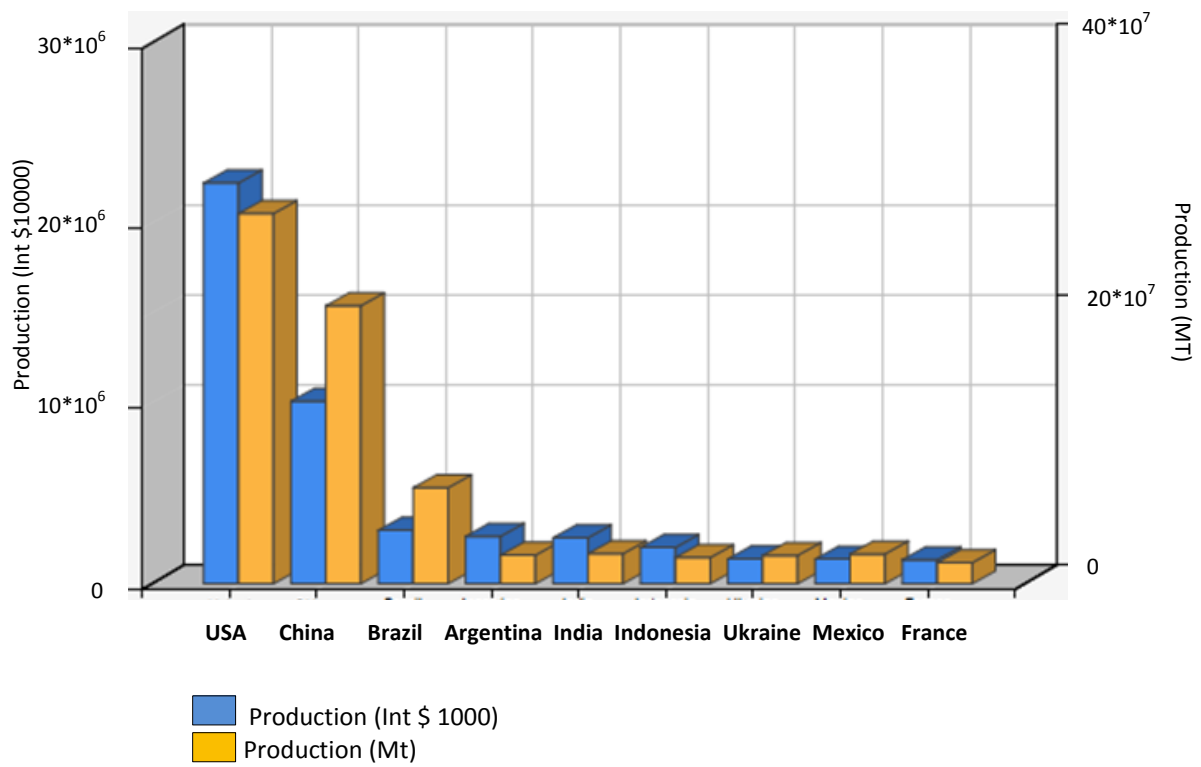


Figure I.1 : Production mondiale du maïs en 2012 (FAO, 2012).
<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>

1. Le maïs et l'ensilage de maïs

1.1 Le maïs en quelques chiffres

Le maïs, *Zea mays*, fait partie de la famille des graminées (ou poacées) et plus précisément de la sous-famille des *Panicoideae*. Les espèces *Zea* connues sous le nom de téosintes sont essentiellement des graminées sauvages du Mexique et d'Amérique centrale (Doebley, 1990). Il s'agit d'une plante annuelle, monoïque à fort développement végétatif. En Europe, la plupart des semis est réalisé entre avril et mai, pour une récolte entre octobre et novembre.

Le maïs peut s'adapter aussi bien aux climats des régions semi-arides d'Amérique Centrale, d'Europe de l'Est ou à des climats très humides tels ceux d'Asie du Sud-Est. Grâce à ces caractéristiques, le maïs est la plante la plus cultivée au monde avec une surface cultivée de 140 millions d'hectares (AGPM). Il représente 38% de la production mondiale de céréales, devant le blé (29%) et le riz (21%) (USDA, 2013). En 30 ans, la production de maïs a doublé avec un rendement moyen record de 105 Quintaux/ha enregistré en 2011 (ARVALIS). Une dizaine de pays seulement assurent la quasi-totalité de la production mondiale (**Figure I.1**). Les États-Unis et la Chine sont les deux plus gros producteurs, avec respectivement 41% (307 Mt) et 19% (166 Mt) de la production mondiale. En Europe, la France est le premier producteur et exportateur. Elle se place au huitième rang mondial avec une production de 16 millions de tonnes/an (données 2011). Le maïs occupe environ 9% de la surface agricole utile Française avec une prédominance dans certaines régions comme l'Alsace (44%) et les Landes (60%). Le maïs peut être utilisé comme céréale au sens strict, sous forme de grains ou en plante entière (maïs fourrager), ou encore sous forme d'ensilage.

Il représente un des piliers de l'alimentation animale avec plus de 70% de la production mondiale destinés à cette filière, sous forme de maïs grain (1,5 Mha en France en 2011) et de fourrage (1,45 Mha en France en 2013).

Vis-à-vis de ces besoins croissants, la maîtrise de la production est primordiale et plusieurs phénomènes peuvent l'affecter. Au-delà de l'incidence climatique, la production du maïs peut être impactée par la présence d'insectes ravageurs et des maladies d'origine fongique entraînant des baisses de rendement et donc des pertes économiques. Les moisissures qui peuvent infecter le maïs appartiennent principalement aux genres *Fusarium*, *Setosphaeria*, *Alternaria*, *Verticillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Ustilago* et *Penicillium*. L'infestation fongique se manifeste au champ durant la croissance, mais aussi, parfois, après la récolte lorsque les conditions de stockage sont inadéquates. Par ailleurs, lorsque les conditions sont favorables, certaines espèces fongiques peuvent produire des mycotoxines (Magan & Aldred, 2007).

1.2 Ensilage de maïs

L'ensilage est une des formes de conservation très fréquemment utilisée pour l'alimentation animale. Il se base sur une conservation humide associant l'anaérobiose, obtenue après tassement et la fermentation naturelle où la plante apporte de l'eau, des sucres solubles et des microorganismes épiphytes (Gollop, *et al.*, 2005). Dans de bonnes conditions, le maïs peut être conservé ainsi plus de quatorze mois (Pahlow, *et al.*, 2003, Storm, *et al.*, 2010). Ce type de conservation est utilisé de façon routinière et permet aux éleveurs de disposer d'aliments à forte valeur énergétique et nutritionnelle pouvant être consommés par les ruminants tout au long de l'année, ce qui améliore ainsi la durabilité économique et environnementale des systèmes d'élevage (Niderkorn, 2007). De ce fait, l'ensilage de maïs est une pratique en constante augmentation dans le monde (Cheli, *et al.*, 2013).

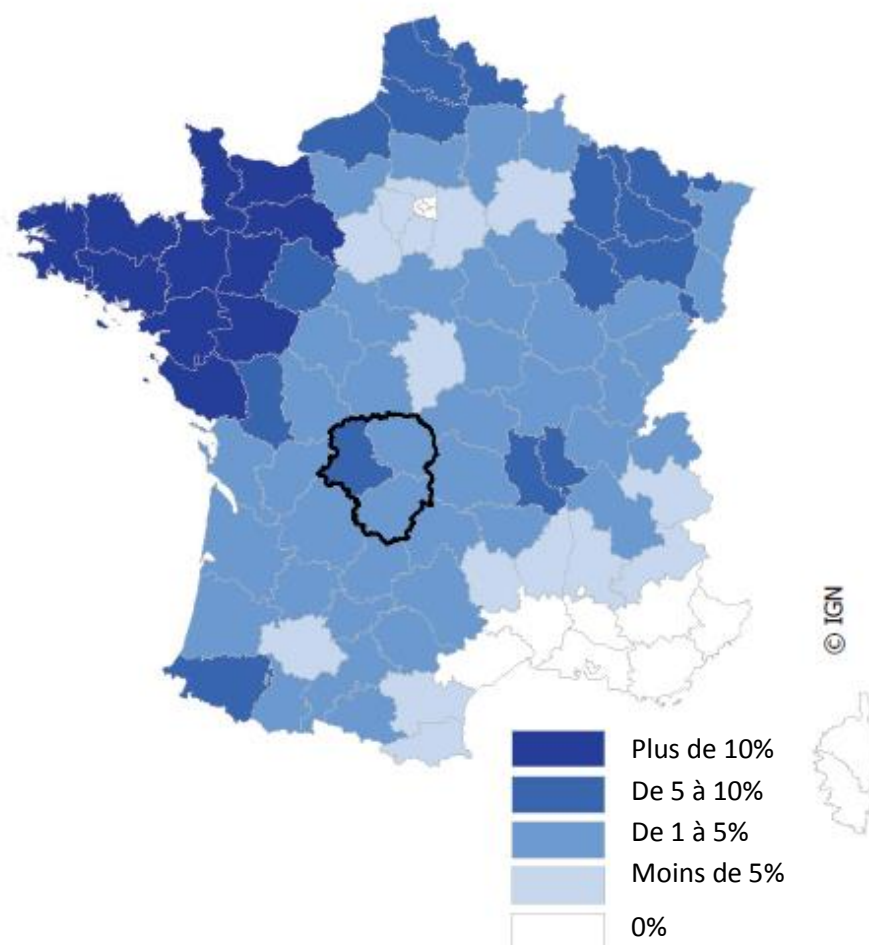


Figure I.2 : Production de l'ensilage de maïs plante entière en France (Agreste 2014).
 Part des surfaces en maïs fourrage et ensilage dans la Surface Agricole Utile (SAU)
<http://agreste.agriculture.gouv.fr/>

Il représente entre 50% et 75% de l'alimentation animale, notamment celle des ruminants (Driehuis, *et al.*, 2008).

En France, les surfaces consacrées aux cultures de maïs pour l'ensilage ont augmenté de 1,15 millions d'hectares en 1980 à 1,4 millions d'hectares en 2008 (Données, Agreste 2008). Généralement, cette pratique est réalisée sur l'exploitation agricole d'une façon non standardisée. Au-delà des conditions climatiques, la qualité des ensilages dépendra notamment du matériel végétal de départ, du type de silo et du matériel utilisé pour la mise en silo (Boudra & Morgavi, 2008).

1.2.1 Ensilage de maïs plante entière

Parmi les végétaux ensilés, l'ensilage de maïs plante entière est l'un des plus répandus au monde. Il est réalisé notamment dans les régions de production intensive de lait et de viande bovine. Les variétés de maïs fourrager à ensiler sont souvent plus précoces que celles de maïs grain, avec une maturité à partir du quatrième mois de croissance (Masurel, 2007). Chaque année, en France 1,6 millions d'hectares de maïs sur pied sont ensilés en plante entière (AGPM) (**Figure I.2**), représentant plus de 60% de la matière sèche de la ration pour l'élevage des bovins (Boudra & Morgavi, 2008). Par conséquent, la qualité de ce processus peut impacter les performances de l'élevage.

1.2.2 Ensilage de maïs grain humide

L'utilisation du maïs grain conservé humide pour l'alimentation animale est en progression constante en Europe depuis une dizaine d'années. En France, autour de 400.000 tonnes sont utilisées principalement dans les élevages porcins. De plus, il peut être destiné à l'alimentation des bovins en complément du maïs fourrager (AGPM).

L'ensilage peut être fait sous deux formes :

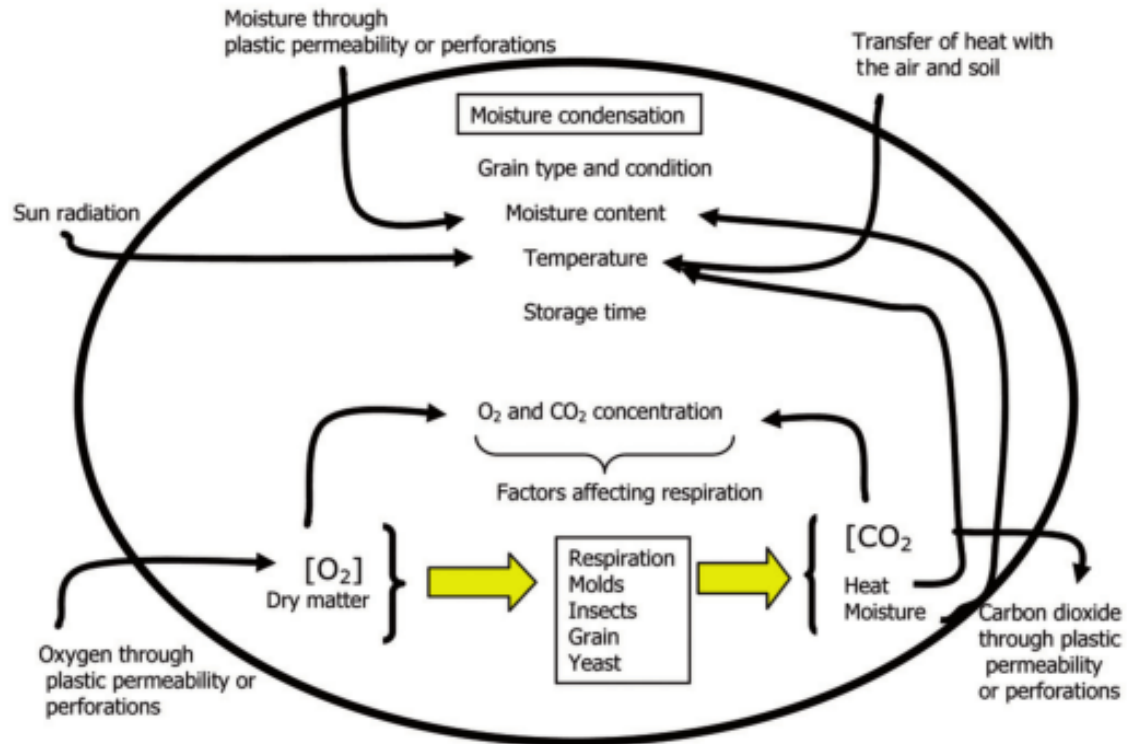


Figure I.3 : Facteurs environnementaux influant sur le développement d'un silo-boudin, qui est fréquemment utilisé pour l'ensilage de maïs grain en France (Chulze, 2010).

- ⇒ grains entiers au moment de la mise en silo appelé maïs grain humide entier inerté (M.G.H.E).
- ⇒ grains broyés avant la mise en silo appelé maïs grain humide broyé ensilé (M.G.H).

Dans les deux cas, l'étanchéité à l'air et la maîtrise des échanges gazeux doivent être assurés dans les silos. L'intérêt zootechnique repose sur l'apport énergétique élevé et la forte teneur en amidon par rapport au volume de biomasse récoltée. Par ailleurs, du point de vue économique, cette pratique se révèle très stable et avantageuse (AGPM).

1.2.3 Facteurs environnementaux affectant l'ensilage

Le développement d'un ensilage comporte plusieurs étapes et dépend de plusieurs facteurs environnementaux (**Figure I.3**). Ces étapes, caractérisées principalement par des changements physico-chimiques et microbiologiques, peuvent être regroupées en quatre phases : une phase aérobie, une phase de fermentation, une phase de stockage et une phase de désilage (Ashbell & Weinberg 2006).

La phase aérobie, caractérisée par une respiration résiduelle, est le résultat principal de l'activité enzymatique des cellules végétales capables d'utiliser des sucres solubles (glucose et fructose) et l'oxygène piégé au cours du compactage de l'ensilage. Durant cette phase, le pH du milieu reste élevé (6-6,5), de faibles niveaux d'acide acétique et de production de chaleur peuvent être observés (Pahlow, *et al.* 2003, Dunière, 2012).

Ensuite, la phase fermentaire est caractérisée par l'acidification progressive de l'ensilage jusqu'à l'anaérobiose, prenant souvent plusieurs semaines pour s'achever. Les sucres sont alors convertis en acide lactique et en acides gras volatils qui permettent de stabiliser l'ensilage. Dans des conditions optimales, l'ensilage de maïs atteint des niveaux

d'oxygène de 0 à 2%, de dioxyde de carbone de 15 à 90% et un pH autour de 3,8 (Storm, *et al.*, 2010).

Durant le stockage, les silos sont scellés et maintenus en anaérobiose et à pH acide pendant plusieurs mois. Peu de changements physico-chimiques ont été reportés durant cette phase (Dunière, 2012).

Finalement, la phase de désilage est caractérisée par l'ouverture des silos pour l'alimentation des animaux. La pénétration de l'air peut entraîner une augmentation du pH, ainsi que la réactivation et la prolifération des agents microbiens aérobies initialement présents dans la matrice (Driehuis & Oude Elferink, 2000, Storm, *et al.*, 2008).

Au cours de ces différentes phases, plusieurs paramètres et facteurs environnementaux sont déterminants pour assurer la qualité des ensilages. Parmi ceux-ci, le niveau d'anaérobiose achevé durant la fermentation est considéré comme étant primordial (Woolford, 1990, Uegaki, *et al.*, 2013). Cependant, il est difficile d'avoir des niveaux optimaux du fait des pratiques agricoles durant la mise en silo. Par exemple, le manque d'étanchéité du silo peut conduire à la détérioration de l'ensilage en surface (Borreani, *et al.*, 2007). Le pourcentage de matière sèche (MS) du maïs à ensiler est également un paramètre important et doit être autour de 25 à 35% (Rossi & Dellaglio, 2007). Les conditions d'anaérobiose et les faibles niveaux de MS permettent de réduire le risque de développement des microorganismes d'altération et par conséquent, la production de mycotoxines (Boudra & Morgavi, 2008). Finalement, plusieurs auteurs ont identifié d'autres facteurs favorisant le bon développement des ensilages tels que: le type de silo, leur porosité, l'humidité et la densité des silos ainsi que l'ajout d'additifs de fermentation et la composition du microbiote naturel présent au moment de l'ensilage (Garon, *et al.*, 2006, Driehuis, 2013).

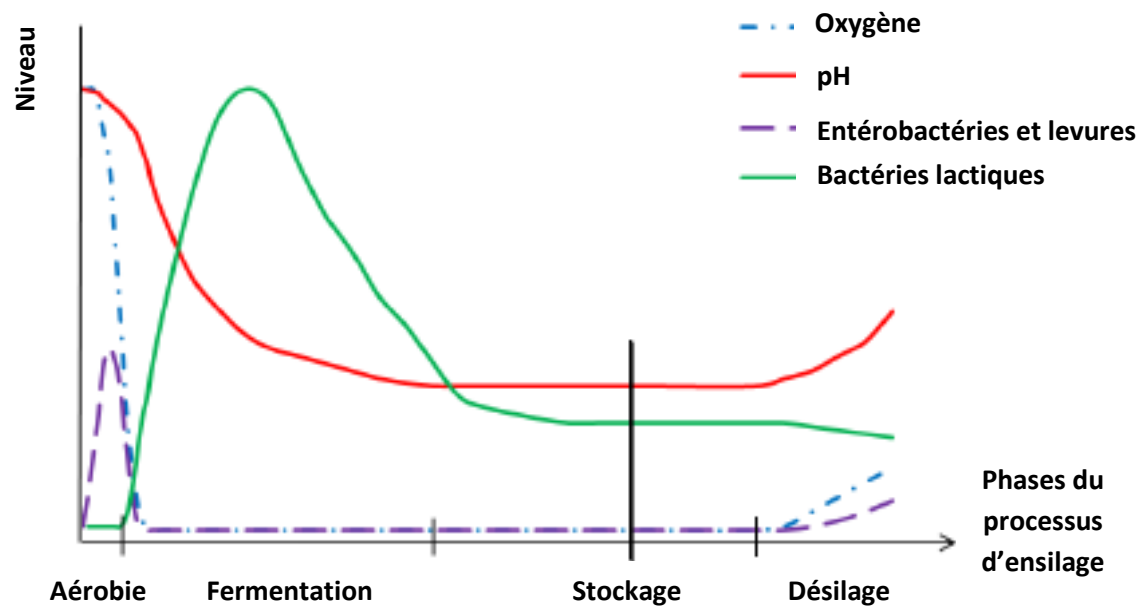


Figure I.4 : Evolution théorique de la teneur en oxygène, du pH, et des communautés microbiennes présentes au cours du développement de l'ensilage (Dunière, 2012)

González Pereyra *et al.* (2011) ont montré que la conservation sous forme de silo-boudin, fréquemment utilisée pour l'ensilage maïs grain en France, pourrait éviter la contamination en mycotoxines.

2. La complexité microbienne présente dans les ensilages de maïs

Actuellement, la composition et l'évolution de la communauté microbienne durant cette fermentation est uniquement connue pour les ensilages de maïs plante entière et montre qu'elle est étroitement liée aux phases du développement de l'ensilage de maïs décrites précédemment (**Figure I.4**). Les bactéries lactiques demeurent cependant majoritaires tout au long de la fermentation de l'ensilage (McDonald, *et al.*, 1991, Brusetti, *et al.*, 2006).

Durant la phase aérobie, la communauté microbienne présente dans l'ensilage est composée notamment par des microorganismes épiphytes naturellement présents dans les parties aériennes de la plante récoltée (McDonald, *et al.*, 1991) tels que : *Paenibacillus* spp., *Flavobacteriaceae* spp., *Sphingomonas* spp., *Rhizobiaceae* spp., *Acinetobacter* spp., d'entérobactéries *e.g.* *Rahnella* sp. *Erwinia* sp. et de certaines bactéries lactiques (LAB) aérotolérantes qui protègent la plante des microorganismes pathogènes par la production d'acides organiques et de bactériocines (Holzer, *et al.*, 2003, Kadivar & Stapleton, 2003, Li & Nishino, 2011). Les entérobactéries sont en compétition avec les LAB pour l'utilisation des nutriments disponibles (Pahlow, *et al.*, 2003). Holzer, *et al.* (2003) ont également reporté la présence et l'activité de certains microorganismes aérotolérants et anaérobies (*Streptocoques* et *Leuconostoc*) durant cette phase pendant l'ensilage. Ce microbiote épiphyte se développe jusqu'à épuisement de l'oxygène ou jusqu'à ce que l'acidification du milieu soit suffisamment importante pour limiter leur métabolisme.

Ensuite, la phase fermentaire est caractérisée par la disparition des entérobactéries et le développement de bactéries lactiques acidotolérantes telles que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus buchneri* (Holzer, *et al.*, 2003, Rossi & Dellaglio, 2007). Ces microorganismes convertissent les sucres solubles en acide lactique principalement, diminuant rapidement le pH du milieu. Parvin, *et al.* (2010) ont observé le remplacement d'Entérobactéries par les espèces de LAB *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* après 30 jours de fermentation dans les ensilages de maïs plante entière. Une autre étude réalisée par Brusetti, *et al.* (2006) sur la dynamique et l'évolution de la communauté bactérienne dans l'ensilage maïs plante entière montre la prédominance de *Pediococcus* sp. et *Weissella* sp. au cours des premiers jours de fermentation, rapidement supplantées par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *Lactobacillus brevis* après 6 jours de fermentation.

La phase de stockage est caractérisée principalement par le changement de la diversité au sein des *Lactobacillus*. En effet, les lactobacilles homofermentaires (*L. plantarum*, *L. curvatus*) sont remplacées par des espèces hétérofermentaires telles que *L. brevis* et *L. buchneri* (Driehuis, *et al.*, 1999). Ce phénomène est probablement dû à la capacité d'adaptation et la forte tolérance des espèces hétérofermentaires aux produits de fermentation tels que l'acétate (Beck, 1972).

Une étude réalisée par Li & Nishino (2011) montre également la présence d'autres bactéries lactiques moins courantes telles que : *L. panis*, *L. reuteri*, *L. acetotolerans*. Leur fonction n'a cependant pas été élucidée. Vissers, *et al.* (2006) et Storm, *et al.* (2010) ont identifié des bactéries butyriques, sous forme de spores et certaines levures, ayant des capacités d'acido-tolérance leur permettant de survivre à cette période de stockage. Enfin, lorsque l'ensilage est ouvert, l'aérobiose est rétablie et les microorganismes acido-tolérants sont capables de métaboliser les acides organiques présents (Higginbotham, *et al.*, 1998).

L'ensilage peut aussi être vecteur de nombreux microorganismes indésirables ou d'altération (Driehuis, 2013). Ces microorganismes qui sont majoritairement aérobies ou aérobies facultatifs, peuvent nuire à la conservation de l'ensilage, affecter les performances des animaux ainsi que la santé animale ou la santé humaine et induire des pertes économiques (Driehuis, *et al.*, 1999). Leur développement peut être lié à une réduction inefficace et lente du pH au cours de la fermentation (Krooneman, *et al.*, 2002). Dans ce contexte, une étude multi-approche basée sur des méthodes d'étude culture-dépendante et culture-indépendante, utilisant les techniques DGGE et RT-DGGE a permis de suivre le développement du microbiote d'altération suite à une exposition aérobie au cours de l'ensilage de maïs (Dolci, *et al.*, 2011). Ces résultats montrent notamment la présence d'*Acetobacter pasteurianus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus amylovorus*, *Kazachstania exigua*, *Pichia kudriavzevii* et *Aureobasidium pullulans* après 14 jours d'exposition à l'air. Pahlow *et al.* (2003) ont également reporté que *Saccharomyces* sp., *Candida* sp. et *Pichia* sp. étaient les principaux agents d'altération de l'ensilage après une exposition aérobie. En effet, les levures capables de métaboliser le lactate sont particulièrement impliquées dans la dégradation aérobie de l'ensilage de maïs (Driehuis & Oude Elferink, 2000). De la même façon Rossi & Dellaglio (2007) ont montré par RFLP et RAPD-PCR, la présence des différentes *Clostridia* (*C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. perfringes*, *C. saccharolyticum*, *C. tyrobutyricum*) impliqués dans la dégradation ou la détérioration des ensilages de maïs. Il apparaît ainsi que l'occurrence de microorganismes responsables de la détérioration des ensilages est un phénomène relativement fréquent, soulevant le problème de la contamination des ensilages par des agents pathogènes. Des études ont également reporté la capacité de certains champignons filamenteux à se développer dans un milieu limitant comme l'ensilage *i.e.* avec des niveaux réduits d'O₂, un pH acide et des concentrations élevées en CO₂ et acides organiques (Pahlow, *et al.*, 2003, AFSSA, 2004).

Ces microorganismes, se retrouvant généralement dans les zones proches de sources d'oxygénation, sont souvent impliqués dans la production de mycotoxines (Storm, *et al.*, 2008). Parmi les champignons filamenteux les plus fréquemment retrouvés dans les ensilages de maïs se trouvent les genres: *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* (Roige, *et al.*, 2009). D'après Storm, *et al.* (2010), le risque de contamination par des champignons filamenteux dans les ensilages, est le plus élevé après 5 mois et le moins élevé après 11 mois d'ensilage. Certaines espèces fongiques ont été associées à des troubles alimentaires chez les ruminants. Garon, *et al.* (2006) ont identifié les espèces *Paecilomyces variotii*, *Trichoderma* sp., *Byssoschlamys nivea*, comme étant responsables de troubles de la fermentation ruminale et *Monascus purpureus* et *Monascus ruber* comme responsables de refus alimentaire et de la coloration rougeâtre des ensilages (AFSSA, 2004).

En conclusion, toutes ces études mettent en évidence la forte évolution et la dynamique du microbiote tout au long de l'ensilage de maïs. Les espèces les plus rencontrées dans l'ensilage et leur rôle sont détaillés ci-après.

2.1 Les bactéries des ensilages

Les bactéries colonisent naturellement plusieurs matrices alimentaires telles que la viande, le lait, les végétaux et les céréales (Dalié, 2009). Parmi ces microorganismes, les plus typiquement associés au microbiote des ensilages de maïs appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*. Ces bactéries sont capables de se développer à des pH compris entre 3,2 et 6,5 (Mc Donald, *et al.*, 1991) et jouent un rôle essentiel dans la fermentation spontanée de l'ensilage (Pahlow, *et al.*, 2003).

Les LAB sont classées selon leur profil fermentaire. Certaines sont dites homofermentaires, utilisant la voie de la glycolyse pour produire plus de 90% d'acide lactique à partir des sucres solubles.

En revanche les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives utilisent la voie du 6-phosphogluconate, produisant de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol et du dioxyde de carbone. Finalement les espèces hétérofermentaires obligatoires métabolisent à la fois les hexoses et les pentoses avec les mêmes produits de fermentation que les hétérofermentaires facultatives (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Les bactéries homofermentaires initialement présentes dans cette fermentation, sont capables de réduire le pH de l'ensilage, inhibant ainsi le développement de plusieurs microorganismes de détérioration. Cependant, l'acide lactique produit par celles-ci peut parfois être rapidement métabolisé par certaines levures et moisissures d'altération conduisant ainsi à une instabilité du milieu (Holzer, *et al.*, 2003). De ce fait, les bactéries hétérofermentaires jouent un rôle essentiel dans le développement optimal des ensilages de maïs. En effet, Weinberg & Muck (1996) et Driehuis, *et al.* (1999) ont démontré l'aptitude de *L. buchneri* à stabiliser ce milieu, transformant l'acide lactique en acide acétique, 1-propanol, acide propionique et 1,2-propanediol. Ce dernier métabolite ne peut pas être métabolisé par *L. buchneri*. Par la suite, (Krooneman, *et al.*, 2002) ont isolé pour la première fois une autre bactérie hétérofermentaire, *Lactobacillus diolivorans* sp. nov, phylogénétiquement proche du *L. buchneri*, capable de dégrader le 1,2-propanediol en 1-propanol et en acide propionique dans l'ensilage de maïs.

Bien que les bactéries lactiques (LAB) soient naturellement présentes au sein du microbiote indigène des ensilages de maïs, leur inoculation comme agents de biopréservation présente un grand potentiel grâce à leur capacité de stabilisation de l'ensilage. En effet, comme déjà précisé précédemment, elles permettent de limiter ou d'inhiber la croissance de microorganismes indésirables et ainsi l'initiation de certaines voies métaboliques non désirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, au cours de la fermentation

(Driehuis, *et al.*, 1999, Danner, *et al.*, 2003, Brusetti, *et al.*, 2006, Rossi & Dellaglio, 2007, Dolci, *et al.*, 2011, Li & Nishino, 2011). Une étude réalisée par Danner, *et al.* (2003) a permis de comparer les effets de l'inoculation de bactéries homofermentaires et hétérofermentaires dans l'ensilage maïs plante entière. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus après inoculation par des bactéries hétérofermentaires telles que *L. brevis* et *L. buchneri*. Ces résultats s'expliquent notamment par la production d'acide acétique, considéré comme une substance clé dans la stabilisation de l'ensilage.

En ce qui concerne les bactéries autres que les LAB présentes dans cet écosystème, Rossi & Dellaglio (2007) ont identifié les bactéries anaérobies, *Paenibacillus macerans* et *Propionibacterium acidipropionici* à partir des ensilages de maïs plante entière. *P. acidipropionici* peut favoriser la stabilisation aérobie des ensilages par la production d'acide propionique et d'acide acétique (Filya, *et al.*, 2004). Cependant sa colonisation et son développement sont relativement instables dans l'ensilage de maïs (Rossi, *et al.*, 1998).

Des études précédentes sur les entérobactéries présentes sur la phyllosphère du maïs et tout au début de la fermentation, décrivent l'implication de ces microorganismes dans la réduction du nitrate en nitrite et oxyde d'azote ainsi que dans la production d'acide acétique, toutefois à des niveaux moins importants que les LAB (Pahlow, *et al.*, 2003). De plus, Brusetti, *et al.* (2006) et Silla Santos (1996) ont identifié la présence d'*Enterococcus* sp., d'*Enterobacter* sp. et de *Klebsiella* sp. dans l'ensilage, suite à l'utilisation de maïs fané ainsi qu'à une exposition aérobie au cours de la fermentation.

Visser, *et al.* (2007) ont reporté la présence de bactéries butyriques telles que : *Clostridium* spp. et *Bacillus* spp., connues comme des microorganismes de détérioration de l'ensilage, capables de convertir l'acide lactique en acide butyrique, en hydrogène et en

dioxyde de carbone. La croissance importante de ces microorganismes, autour de $5 \log_{10}/g$ de maïs, peut induire une augmentation du pH et le développement d'autres microorganismes d'altération comme par exemple des moisissures et des levures. Ces bactéries proviennent en général de l'incorporation accidentelle de sol dans le matériel végétal au cours du remplissage du silo ainsi que de la pénétration de l'oxygène durant la fermentation. Vilar, *et al.* (2007) ont observé la présence de *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène aérobie ou anaérobie facultative, dans certains échantillons d'ensilage de maïs Irlandais lorsque le pH était supérieur à 4,5. Finalement, des souches d'*E. coli* ont été détectées dans des ensilages de maïs en décomposition subissant une détérioration aérobie (Chen, *et al.*, 2005).

2.2 Les levures des ensilages

Dans les ensilages l'activité amylasique des levures leur permet de transformer les sucres simples (essentiellement glucose) en alcools et CO_2 . L'oxygénation de l'ensilage, soit par la détérioration aérobie soit par la réoxygénation pendant le désilage crée des conditions favorables à l'activité de métabolisation des acides organiques tels que les acides succinique et citrique par les levures (Driehuis, *et al.*, 1999). Il n'existe pas de règle générale à l'évolution de la communauté de levures au sein de l'ensilage qui peut être variée, particulièrement au cours de la phase de stockage (Jonsson & Pahlow, 1984). Le genre *Candida* dont notamment *Candida mesenterica* et *Candida apicola* est le plus fréquemment retrouvé à l'intérieur ou à la périphérie de cette matrice (Rossi & Dellaglio, 2007). D'autres genres tels que *Saccharomyces*, *Pichia*, *Geotrichum*, *Trichosporon* ont été également reportés (Middelhoven & van Baalen, 1988, Orsi, *et al.*, 2000, Garon, *et al.*, 2006)

2.3 Méthodes globales pour l'étude de la communauté microbienne dans les ensilages de maïs

La plupart des études sur la diversité et la composition du microbiote des ensilages jusqu'à maintenant, ont été basées sur des approches classiques avec l'isolement de souches cultivables. Ces approches ont permis d'identifier les microorganismes les plus abondants et de suivre leur dynamique au cours de la fermentation. Cependant, elles ne permettent pas d'étudier les microorganismes viables non cultivables (VNC) qui peuvent aussi avoir un rôle clé au cours de cette fermentation. La prise en compte des microorganismes VNC peut être donc réalisée par la mise en œuvre d'approches globales incluant les approches métagénomiques.

Les approches globales reposent sur l'analyse exhaustive et directe de l'ADN de la communauté microbienne au sein de différents écosystèmes, sans le biais de la culture *in vitro* (Marco, 2010). Ces approches comportent des méthodes d'empreinte moléculaire et de séquençage nouvelle génération ou à haut débit (NGS), qui ont été décrites dans l'article de synthèse bibliographique (voir partie 4 de ce chapitre). En ce qui concerne l'analyse du microbiote présent dans l'ensilage de maïs plante entière, plusieurs méthodes d'analyse d'empreinte moléculaire telles que la RFLP, la DGGE, la RT-DGGE et la LH-PCR, basées sur l'amplification des régions ribosomiques conservées, 16S rRNA (bactéries et archées) et 18S rRNA (eucaryotes) ont été appliquées (May, *et al.*, 2001, Brusetti, *et al.*, 2006, Li & Nishino, 2011). Ce type d'analyse a également permis d'étudier l'effet de la température environnementale sur le profil bactérien des ensilages ainsi que la dynamique du microbiote d'altération produite par l'exposition aérobie ou par de mauvaises pratiques dans la mise en place de l'ensilage (Dolci, *et al.*, 2011). Ces approches ont permis une observation qualitative et rapide de l'ensemble du microbiote par l'identification des profils de certains groupes microbiens et de calculer des indices écologiques (richesse, abondance). Cependant,

ces méthodes ne permettent pas un suivi exhaustif des populations microbiennes et bien souvent seuls les microorganismes majoritaires sont détectés. De même, l'identification de ces espèces peut-être rendue difficile par la présence de plusieurs bandes pour une même espèce ou par la présence de profils communs à différentes espèces.

Les NGS englobent l'analyse par amplification des régions conservées, connue comme la métagénomique monogénique et des analyses sans *a priori* du métagénome entier. Ces approches « omic » sont considérées plus performantes que les approches d'empreinte moléculaire, permettant d'identifier les microorganismes minoritaires ou rares au sein d'un écosystème. De plus, leur principal atout est l'analyse taxonomique et fonctionnelle du microbiote (Sharpton, 2014). Les approches « omic » sont très adaptées pour l'analyse de matrices complexes telles que le microbiote du système digestif des êtres vivants, du sol, de la mer. De ce fait, elles peuvent être une option prometteuse pour l'élucidation et la compréhension des agents et mécanismes microbiens durant la fermentation de l'ensilage. A notre connaissance très peu d'études basées sur le NGS ont été réalisées sur ce type de matrice. Eikmeyer, *et al.* (2013) ont évalué l'impact de l'inoculation de *L. buchneri* CD034 sur le développement du microbiote bactérien des ensilages maïs plante entière par séquençage total du gène 16S rDNA et par une analyse du métagénome total. Leurs résultats montrent de fortes différences du profil bactérien entre un ensilage inoculé et un ensilage non inoculé durant la fermentation. Les traitements inoculés se caractérisaient par la prédominance des *Lactobacilli* tels que *L. plantarum*, *L. brevis* et *L. lactis* sur le groupe de *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*. Plus récemment, une autre étude a décrit la diversité fonctionnelle du métagénome impliqué dans la fermentation afin d'optimiser la production de biogaz au cours de l'ensilage de maïs plante entière (Grumaz, *et al.*, 2015).

La caractérisation taxonomique et fonctionnelle du microbiote des ensilages est un champ de recherche ouvert, en particulier pour l'ensilage de maïs grain humide qui n'a que très peu été étudié.

3. Les mycotoxines dans les ensilages de maïs : un problème récurrent

Le maïs peut être contaminé par plusieurs champignons toxigènes du genre *Fusarium*, *Aspergillus* ou *Alternaria*. L'occurrence de ces champignons est influencée par des facteurs environnementaux (température, humidité) et des pratiques agricoles (rotation des cultures, variété cultivée, type de fertilisation) (Storm, *et al.*, 2008). De plus, certaines de ces espèces sont capables de produire des mycotoxines dans des conditions climatiques spécifiques. Par exemple, *Fusarium* qui est le principal champignon ravageur du maïs, est capable de produire plus de 20 mycotoxines, notamment du deoxynivalénol (DON), de la zéaralénone (ZEN) et des fumonisines (FB).

La maîtrise du risque de contamination par les mycotoxines dans les ensilages reste principalement liée à la prévention en pré-récolte (Uegaki, *et al.*, 2013). Cependant, des accidents au cours de la fermentation (comme par exemple le manque d'anaérobiose), peuvent déclencher le développement fongique et la production des mycotoxines dans les ensilages de maïs (Magan & Aldred, 2007). Ces mycotoxines sont très stables et demeurent dans les ensilages de maïs même après que le champignon ait disparu (Roige, *et al.*, 2009). De plus, la concentration de ces toxines peut fortement varier dans un même lot d'ensilage, notamment entre l'intérieur et la superficie du silo (Richard, *et al.*, 2007). Il est donc recommandé d'effectuer de multiples prélèvements à divers endroits du silo afin d'obtenir un échantillon représentatif (Niderkorn, 2007). Ainsi, la détermination de la contamination ou non en mycotoxines dans les ensilages de maïs peut s'avérer compliquée du fait du volume à

Tableau I.1 : Occurrence des fusariotoxines dans les ensilages de maïs plante entière, relevées dans différentes études, d'après Gallo, *et al.* (2015)

Mycotoxins	Number of samples	Incidence (%)	Mean	Range or maximal detected value	Nation
<i>Fusarium</i> spp. Derived toxin Trichothecenes type B					
15-acetyl DON	140	<1%	901 µg/kg	max 1013 µg/kg	Netherlands
15-acetyl DON	5	100%	59 µg/kg	max 127 µg/kg	Germany
3-acetyl DON	20	0%	-	-	Denmark
3-&5-acetyl DON	19	21%	217 µg/kg	135-300 µg/kg	Switzerland
DON	20	100%	1056 µg/kg	160-5094 µg/kg	Denmark
DON	140	72%	854 µg/kg	max 3142 µg/kg	Netherlands
DON	82	6%	1629 µg/kg	max 2974 µg/kg	Denmark
DON	1	-	146 µg/kg	-	France
DON	196	8%	280 µg/kg	max 560 µg/kg	Italy
DON	9	-	-	100-213 µg/kg	France
DON	5	100%	2919 µg/kg	max 3944 µg/kg	Germany
DON	19	100%	1356 µg/kg	780-2990 µg/kg	Switzerland
DON	116	24%	1610 µg/kg	150-3420 µg/kg	Brazil
DON	196	59%	1290 µg/kg DM	240-12,890 µg/kg DM	Germany
DON	182	89%	2100 µg/kg DM	260-14,290 µg/kg DM	Germany
DON	32	86%	800 µg/kg	max 3700 µg/kg	PA, US
DON	39	66%	1100 µg/kg	max 5100 µg/kg	PA, US
Fusarenon X	20	20%	4 µg/kg	8-14 µg/kg	Denmark
Nivalenol	5	100%	1612 µg/kg	max 2809 µg/kg	Germany
Nivalenol	19	42%	521 µg/kg	190-760 µg/kg	Switzerland
Nivalenol	82	13%	266 µg/kg	max 758 µg/kg	Denmark
<i>Fusarium</i> spp. Derived toxin Trichothecenes type A					
15 monoacetoxyscirpenol	5	60%	30µg/kg	max 49 µg/kg	Germany
HT-2 toxin	20	60%	104 µg/kg	2-327 µg/kg	Denmark
HT-2 toxin	5	100%	18 µg/kg	max 26 µg/kg	Germany
HT-2 toxin	19	26%	95 µg/kg	76-120 µg/kg	Switzerland
T-2 toxin	20	5%	2 µg/kg	-	Denmark
T-2 toxin	19	42%	36 µg/kg	18-84 µg/kg	Switzerland
<i>Fusarium</i> spp. Derived toxin: Fumonisin					
FB ₁	140	1%	17,000 µg/kg	max 26,200 µg/kg	Netherlands
FB ₁	86	97%	615 µg/kg	21-1824 µg/kg	IL, US
FB ₁	60	~75%	2020 µg/kg	200-10,100 µg/kg	PA, US
FB ₁	116	15%	5440 µg/kg	300-3400 µg/kg	Brazil
FB ₁	100	88%	-	900->10,000 µg/kg	Italy
FB ₂	64	72%	93 µg/kg	21-276 µg/kg	IL, US
FB ₂	60	~40%	980 µg/kg	200-20,300 µg/kg	PA, US
FB ₃	51	57%	51 µg/kg	16-161 µg/kg	IL, US
<i>Fusarium</i> spp. Derived toxin: other fusarium toxins					
Enniatin A1	6	-	~120 µg/kg DM	-	Ireland
Enniatin B	82	24%	53 µg/kg	max 152 µg/kg	Denmark
Enniatin B1	6	-	~160 µg/kg DM	-	Ireland
<i>Fusarium</i> spp. Derived toxin: Zearalenone					
α-ZOL	5	20%	15 µg/kg	-	Germany
β-ZOL	5	20%	116 µg/kg	-	Germany
ZEA	140	49%	174 µg/kg	max 943 µg/kg	Netherlands
ZEA	82	28%	66 µg/kg	max 311 µg/kg	Denmark
ZEA	9	-	-	23-41 µg/kg	France
ZEA	5	100%	432 µg/kg	max 1790 µg/kg	Germany
ZEA	19	79%	180 µg/kg	83-430 µg/kg	Switzerland
ZEA	85	15%	-	>50 µg/kg	Italy
ZEA	100	60%	-	30->300 µg/kg	Italy

traiter et des caractéristiques physico-chimiques particulières de cette matrice (Scudamore & Livesey, 1998).

Plusieurs études ont largement reporté la présence des mycotoxines telles que le DON, la ZEN, les fumonisines et les aflatoxines à différents niveaux dans les ensilages de maïs plante entière (Kim, *et al.*, 2004, Storm, *et al.*, 2008, Eckard, *et al.*, 2011, Alonso, *et al.*, 2013, Cheli, *et al.*, 2013). Des enquêtes réalisées en Europe et aux Etats-Unis ces vingt dernières années, ont montré la forte incidence principalement du DON et de la ZEN dans les ensilages de maïs (**Tableau I.1**) avec, pour la plupart des cas, plus de 50% d'échantillons contaminés (Driehuis, 2013) et même dans certains cas, jusqu'au 91% des échantillons contaminés avec le DON et la ZEN (Schmidt, *et al.*, 2015).

La multi contamination des ensilages est aussi fréquemment décrite. En effet, Keller, *et al.* (2013) ont reporté la présence conjointe de FB1 et DON dans les ensilages de maïs à de faibles niveaux de 50 $\mu\text{g.g}^{-1}$ et 12 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivement. La présence de ZEN (34%), du Nivalénol ou NIV (16%) et de certaines fusariotoxines dites émergentes telles que : les enniatines, la beauvericine et la monoliformine a aussi été observée sur certains lots d'ensilage de maïs danois (Sorensen, *et al.*, 2008). Les travaux de Storm, *et al.* (2014) ont récemment confirmé la présence récurrente d'une contamination simultanée par plusieurs mycotoxines dans cette matrice avec des concentrations individuelles fréquemment au-dessous des seuils recommandés (EU 2006) (**Figure I.5**). Ces contaminations pourraient cependant se révéler problématiques compte tenu des événements de synergie susceptibles de se produire entre les effets toxiques des différentes mycotoxines (Storm, *et al.*, 2014).

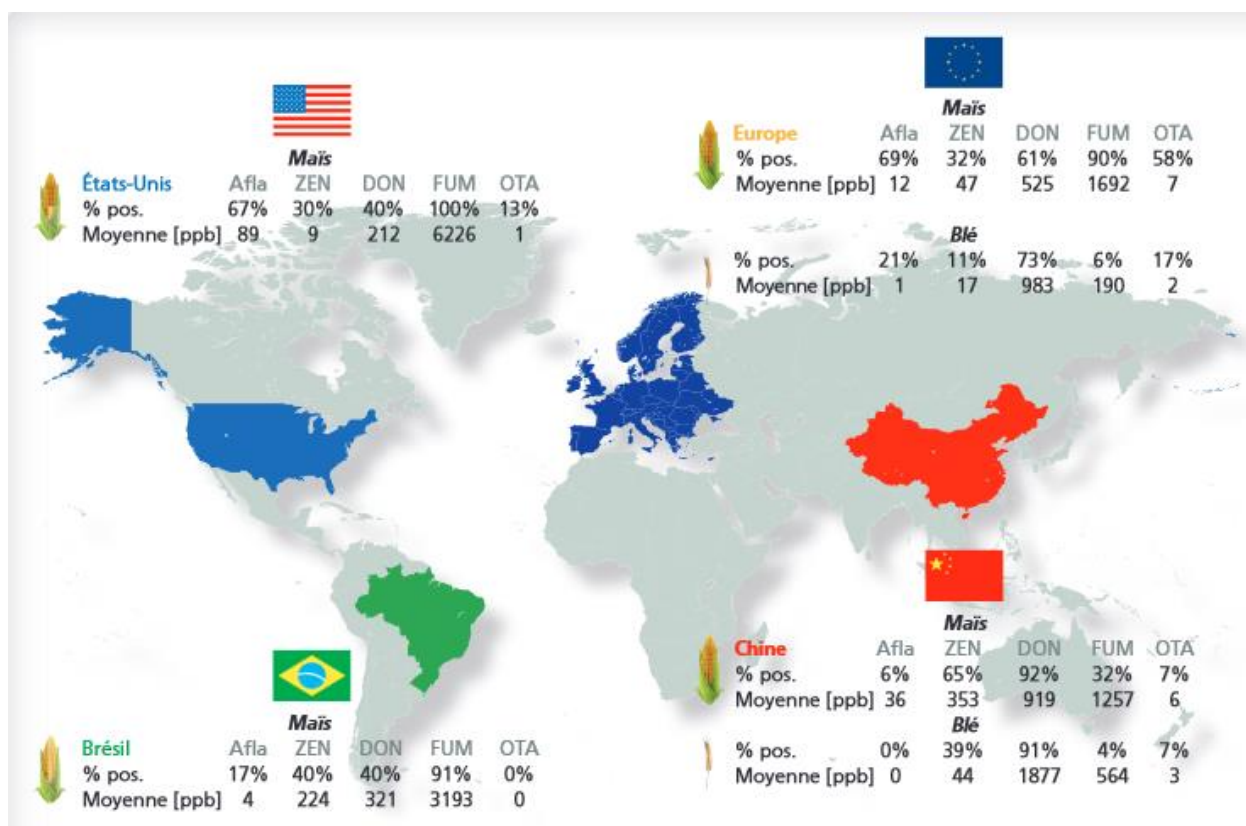


Figure I.5 : La contamination mondiale en mycotoxines dans le maïs destiné à l'alimentation animale (BIOMIN, 2013).

La maîtrise des niveaux de mycotoxines dans les ensilages de maïs représente donc un enjeu majeur pour la santé animale. Il est absolument nécessaire de mettre en œuvre des stratégies adaptées à cette matrice, stratégies qui démarrent par l'optimisation de procédures permettant le suivi et la réduction des mycotoxines au cours de la fermentation. Toutes les études décrites récemment ont été réalisées à partir de l'ensilage maïs plante entière. En ce qui concerne, les ensilages maïs grain humide, aucune étude sur la contamination en mycotoxines n'a été publiée à notre connaissance à ce jour.

3.1 Les fumonisines, un problème fréquent pour les ensilages

La contamination des ensilages de maïs par les fumonisines est un phénomène mondial. Une étude réalisée aux Etats-Unis pendant deux ans consécutifs montre la présence de 70% d'échantillons contaminés par des fumonisines (FB1+FB2+FB3) avec des niveaux modérés allant jusqu'à 2261 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Kim, *et al.*, 2004). De la même façon, en Argentine 100% des lots de maïs grain destiné à l'alimentation porcine présentait des teneurs de FB1 entre 340-2490 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (González Pereyra, *et al.*, 2008). Au Pays-Bas, Driehuis, *et al.* (2008) ont reporté des teneurs en fumonisines (FB1+FB2) de 3400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans des ensilages de maïs plante entière. L'incidence des fumonisines dans l'ensilage de maïs peut varier selon les régions géographiques et les années de récolte (Whitlow, *et al.*, 1998). Elle peut aussi être associée à une hausse de la température durant la fermentation (Driehuis, 2013).

En France, des enquêtes réalisées par FranceAgriMer et Arvalis-Institut du végétal sur le maïs, ont montré que les années défavorables jusqu'à 90% des échantillons récoltés analysés au cours des quinze dernières années, contiennent entre 100 et 4000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ et les 10% restant dépassent largement cette limite (Arvalis, communication personnelle). Le risque d'avoir des lots non conformes n'est donc pas négligeable et peut induire des répercussions économiques considérables.

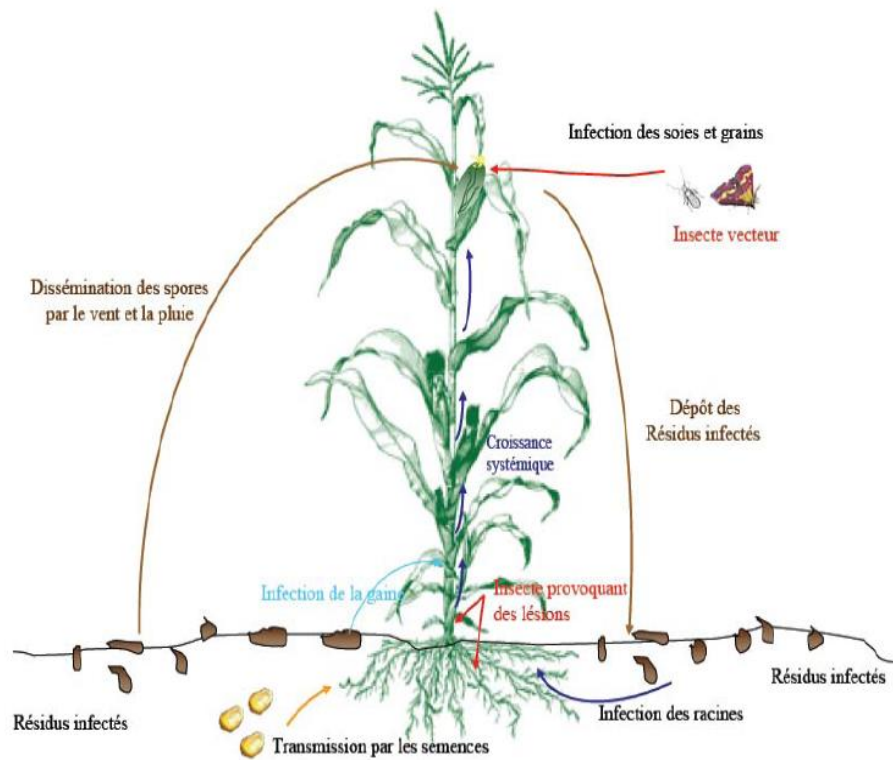


Figure I.6. : Cycle d'infection du maïs par *Fusarium verticillioides* (Sobek & Munkvold, 1999).



Figure I.7 : Symptômes classiques d'épis fusarié par *F. verticillioides* (Photo : Christian Barreau)

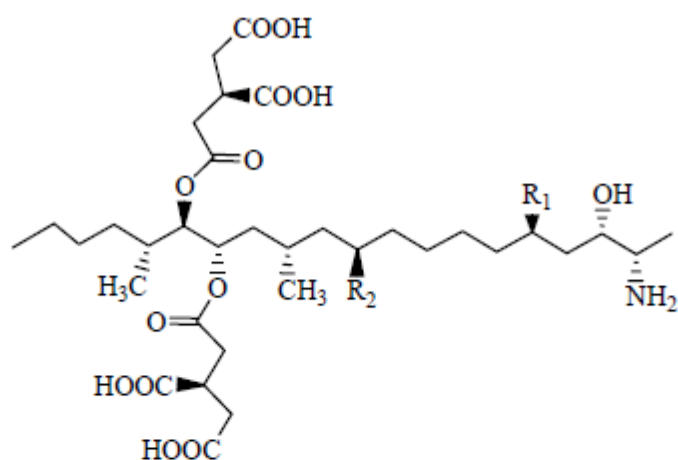
Du fait de la fréquence importante d'évènements de contamination par les fumonisines au niveau mondial, il est impératif de maîtriser le risque de cette toxine dans les ensilages de maïs. L'analyse bibliographique qui suit porte sur les connaissances biologiques et biochimiques liées à la synthèse de ces toxines, leur toxicité, leur structure chimique et les moyens d'analyse, dont on dispose à ce jour.

3.1.1 Les agents producteurs de fumonisines

Les fumonisines du groupe B sont des mycotoxines produites principalement par des ascomycètes du genre *Fusarium* dont notamment les espèces *F. proliferatum* et *F. verticillioides*. Ces deux espèces sont considérées comme des champignons endophytes du maïs qui partagent le même cycle d'infection dans la plante (**Figure I.6**), se développant à la fois dans la partie végétative et la partie reproductive de la plante. Ces champignons sont ainsi considérés comme les principaux agents pathogènes du maïs (Sobek & Munkvold, 1999) (**Figure I.7**). Leur présence a été reportée sur tous les continents (Kedera, *et al.*, 1999), notamment dans les régions chaudes (*F. verticillioides*) et tempérées (*F. proliferatum*) du monde (Doohan, *et al.*, 2003).

3.1.2 Structure chimique des fumonisines

La structure chimique des fumonisines a été identifiée pour la première fois en 1988 (Bezuidenhout, *et al.*, 1988). Les fumonisines sont composées d'une structure linéaire de 20 atomes de carbone portant des groupements méthyl, hydroxyle et deux molécules d'acide tricarballoylique (acide 1, 2, 3 propane tricarboxylique) estérifiées en positions 14 et 15 de la chaîne aliphatique.



Dénomination	R1	R2	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)
Fumonisine B1	OH	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721,8
Fumonisine B2	OH	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705,8
Fumonisine B3	H	OH	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705,8
Fumonisine B4	H	H	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃	689,8

Figure I.8 : Structure chimique des fumonisines du groupe B

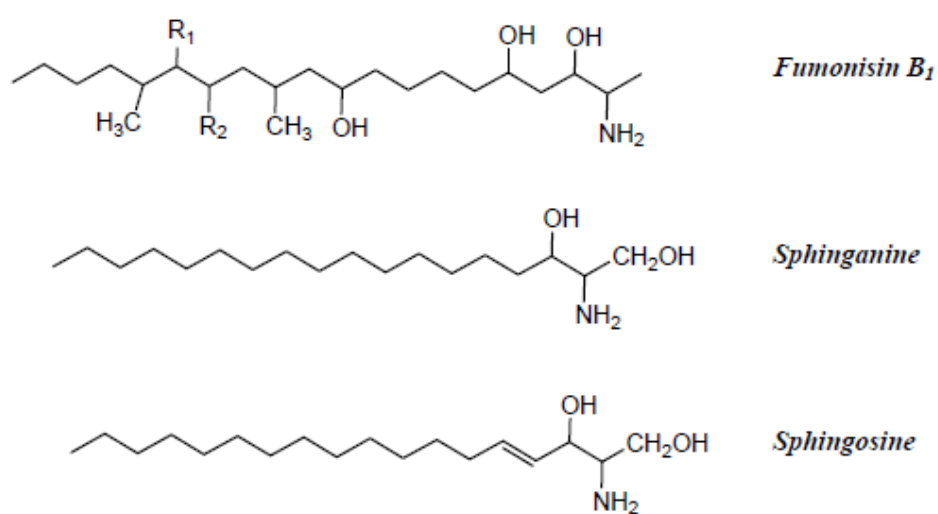


Figure I.9 : Comparaison entre la structure chimique de la FB1 et les bases sphingoïdes : sphinganine, sphingosine.

Plus d'une soixantaine de fumonisines ont été décrites jusqu'à présent (Bartók, *et al.*, 2006). Elles peuvent être classées en quatre familles (A, B, C, P) (Dalié, 2009). Cependant parmi ces quatre groupes, les fumonisines B (FB1, FB2, FB3 et FB4) et notamment la FB1, sont considérées comme les plus importantes du fait de leur toxicité et de leur occurrence fréquente (Picot, 2010). Les fumonisines sont des molécules chimiquement et thermiquement stables. La structure chimique des fumonisines du groupe B, varie selon le nombre et la position des groupements hydroxyles (**Figure I.8**).

Les groupements tricarballics de la FB1 peuvent être hydrolysés biologiquement ou chimiquement par chauffage en milieu acide (6M HCl) ou basique (0,05 à 2M KOH) en transformant ainsi la FB1 en fumonisine hydrolysée ou HFB1 (Dall'Asta, *et al.*, 2008).

3.1.3 Mécanisme d'action des fumonisines

Les fumonisines (FB) sont des analogues structuraux de la sphinganine et de la sphingosine (**Figure I.9**) qui constituent le squelette hydrocarboné des sphingolipides. Ces molécules assurent dans l'organisme plusieurs fonctions dont la croissance, la différenciation et la mort cellulaire (Wang, *et al.*, 1991, Merrill, *et al.*, 1996, Merrill, *et al.*, 2001).

La toxicité des fumonisines résulte principalement de l'inhibition de la sphingosine N-acétyl-transférase ou céramide synthétase, qui est une enzyme clé dans la biosynthèse des sphingolipides. Ce mécanisme peut s'expliquer par une double compétition entre les fumonisines et les substrats de la N-acyltransférase pour les sites de fixation ; sphinganine et Acyl-Coenzyme A (Merrill, *et al.*, 2001) **Figure I.10**. L'inhibition de la synthèse des sphingolipides conduit à l'accumulation des sphinganines libres et à la diminution des céramides et sphingolipides (Wang, *et al.*, 1991, Merrill, *et al.*, 1996, Merrill, *et al.*, 2001), entraînant ainsi l'augmentation du rapport sphinganine/sphingosine (Sa/So) dans le sang et

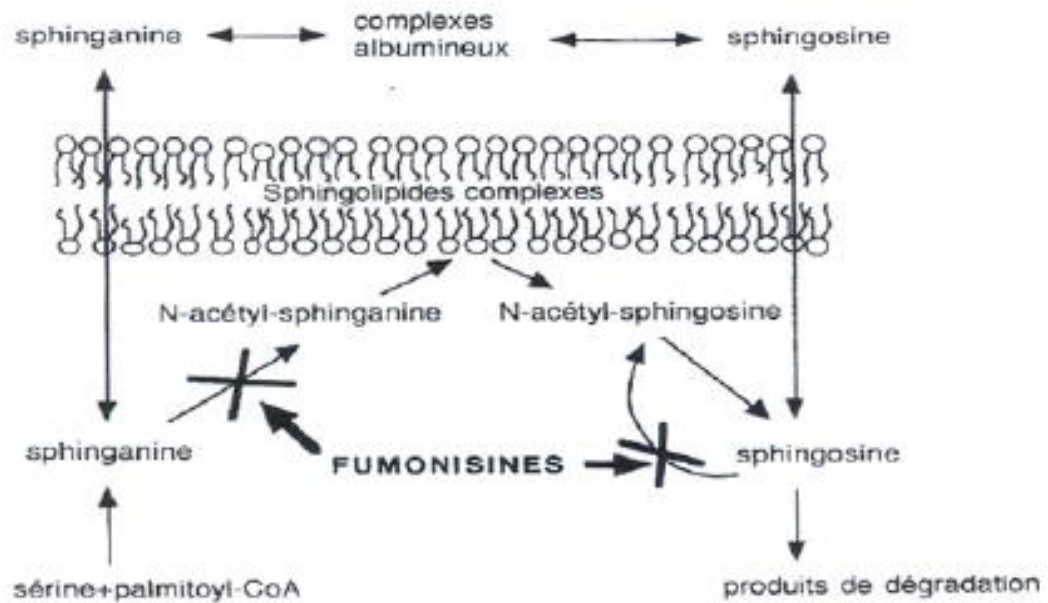


Figure I.10 : Représentation schématique du mode d'action de la FB1 sur le métabolisme des sphingolipides. Inhibition de la céramide synthase (x) (Bailly, *et al.*, 1996).

les urines chez plusieurs espèces animales. De ce fait, le rapport Sa/So est utilisé comme un marqueur d'expositions aux fumonisines du type B (Riley, *et al.*, 1994).

3.1.4 Toxicité des fumonisines

Plusieurs études démontrent que la toxicité des fumonisines, est principalement liée à la fraction amino-terminale de sa structure (Blackwell, *et al.*, 1999, Lemke, *et al.*, 2001). La capacité cytotoxique des FB a été démontrée, à des niveaux variables, sur différents types de cultures cellulaires. Les analogues hydrolysées (hydrolyse des deux groupes acides tricarballyliques) tels que la HFB1 et la HFB2, qui présentent une structure encore plus proche de la sphinganine et de la sphingosine, sont considérées au moins autant cytotoxiques que les molécules mères (Humpf, *et al.*, 1998). Parmi les fumonisines du groupe B, la FB1 est considérée comme étant la plus toxique (Thibault, *et al.*, 1997).

Plusieurs équipes ont aussi étudié l'effet phytotoxique de FB1 sur différents végétaux. Les fumonisines peuvent provoquer des anomalies telles que des flétrissements, chloroses et nécroses cellulaires chez un grand nombre d'espèces végétales (Lamprecht, *et al.*, 1994, Mirocha, *et al.*, 1996).

En ce qui concerne sa toxicité vis-à-vis des hommes et animaux, la FB1 présente principalement des effets immunotoxiques, neurotoxiques, embryotoxiques ou encore des effets toxiques sur le système cardiovasculaire. Cette toxicité se manifeste de façon variable selon l'espèce animale, les équidés (cheval, mulet, âne) étant les animaux les plus sensibles aux effets de la FB1. Des concentrations de l'ordre de 5mg.kg^{-1} chez ces animaux peuvent déclencher la leucoencéphalomalacie équine, caractérisée par des liquéfactions localisées de la substance blanche de l'encéphale (Marasas, *et al.*, 1988). Les porcins sont également sensibles à cette toxine, présentant notamment des œdèmes pulmonaires et des lésions

hépatiques après l'ingestion d'aliments contaminés en FB1 (Colvin & Harrison, 1992, Rotter, *et al.*, 1996).

Des effets néphrotoxiques et/ou hépatotoxiques ont été décrits chez d'autres espèces animales telles que le lapin, le singe, l'agneau et le poulet, mais à un niveau de toxicité inférieur (Thibault, *et al.*, 1997, van der Westhuizen, *et al.*, 2001). Salawu, *et al.* (2001) ont montré également une baisse de poids des volailles après l'ingestion d'une ration contenant entre 10 à 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de FB1. En revanche, les ruminants sont très peu sensibles aux fumonisines, probablement en raison de la capacité de biotransformation de certains microorganismes du rumen (Dunière, 2012).

En ce qui concerne l'homme, aucun exemple confirmé de toxicité aigüe des fumonisines n'a été reporté à ce jour (Dalié, 2009). Cependant, quelques études se sont intéressées aux conséquences de la toxicité chronique de la FB1. Leurs résultats montrent une corrélation positive entre l'ingestion de FB1 et l'incidence de cancer de l'œsophage (Yang, 1980, Li, *et al.*, 1980 Gelderblom, *et al.*, 1988). Une exposition chronique à des faibles niveaux de mycotoxines peut aussi induire des symptômes non spécifiques tels qu'un affaiblissement du système immunitaire ou des déséquilibres métaboliques et hormonaux (Morgavi & Riley, 2007). La FB1 est considérée donc comme un cancérigène possible pour l'homme (classe 2B) par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 1993).

3.1.5 Réglementation des fumonisines

En 1995, les Etats-Unis ont été l'un des premiers pays à établir une législation concernant les teneurs en fumonisines dans certaines denrées alimentaires. Puis, en 2002 six autres pays ont également fixé des niveaux maximaux compris entre 1000-3000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Magan & Olsen, 2004). En Europe, la directive 2005/38/CE de la commission européenne

Tableau I.2 : Teneurs maximales recommandées en fumonisines pour les produits destinés à l'alimentation animale (CE/576/2006)

Mycotoxine	Produits destinés à l'alimentation animale	Teneur maximale recommandée en mg/kg (ppm) pour un aliment pour animaux ayant un taux d'humidité de 12 %
Fumonisine B1 + B2	Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux (*)	
	— le maïs et les produits à base de maïs (**)	60
	Aliments complémentaires et complets pour:	
	— les porcs, les équidés, les lapins et les animaux familiers	5
	— les poissons	10
	— la volaille, les veaux (< 4 mois), les agneaux et les chevaux	20
	— les ruminants adultes (> 4 mois) et les visons	50

(*) Il faut veiller en particulier, s'agissant des céréales et des produits à base de céréales directement utilisés pour nourrir les animaux, à ce que leur utilisation en ration journalière n'entraîne pas une exposition de l'animal à ces mycotoxines supérieure à ce qu'elle serait si la ration journalière se composait uniquement d'aliments complets.

(**) L'expression «céréales et produits à base de céréales» couvre non seulement les matières premières énumérées sous la rubrique 1 («grains de céréales, leurs produits et sous-produits») de la «liste non exclusive des principales matières premières pour aliments des animaux» figurant à la partie B de l'annexe de la directive 96/25/CE du Conseil du 29 avril 1996 concernant la circulation et l'utilisation des matières premières pour aliments des animaux (JO L 125 du 23.5.1996, p. 35), mais également les autres matières premières dérivées de céréales entrant dans la composition des produits pour animaux, notamment les fourrages et les fibres de céréales.

(***) L'expression «maïs et produits à base de maïs» couvre non seulement les matières premières à base de maïs énumérées sous la rubrique 1 («grains de céréales, leurs produits et sous-produits») de la «liste non exclusive des principales matières premières pour aliments des animaux» figurant à la partie B de l'annexe de la directive 96/25/CE du Conseil, mais également les autres matières premières dérivées du maïs entrant dans la composition des aliments pour animaux, notamment les fourrages et les fibres de maïs.

définit les niveaux maximaux de divers mycotoxines telles que le DON, la ZEN, la OTA, les fumonisines, et les toxines T-2 et HT-2, dans les denrées alimentaires commercialisées.

Actuellement, une nouvelle réglementation de la commission européenne a été établie concernant les teneurs maximales en mycotoxines dont notamment les fusariotoxines présentes dans le maïs et ses produits dérivés destinés à l'alimentation humaine (1126/2007/CE du 28 septembre 2007, modifiant le règlement 1881/2006/CE). Une recommandation a également été publiée pour les produits à base de céréales dont le maïs destinés à l'alimentation animale (CE/576/2006 du 17 août 2006) (**Tableau I.2**). Ces teneurs maximales varient selon la toxine considérée, le type d'aliment et la sensibilité des différentes espèces animales. Par exemple concernant les fumonisines, des teneurs maximales de 4000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de FB1+FB2 ont été fixées dans le maïs brut adressé pour l'alimentation humaine. En revanche pour l'alimentation animale, il est recommandé le taux maximal de 60 mg.kg^{-1} pour FB1+FB2.

Compte tenu de ces données, il est impératif de maîtriser le contenu en fumonisines dans le maïs et ses produits dérivés.

3.1.6 Méthodes d'analyse des fumonisines

Les fumonisines peuvent contaminer différents tissus végétaux du maïs et se retrouver ainsi dans des produits dérivés destinés à l'alimentation humaine et animale. Face à cette diversité de produits potentiellement contaminés, de nombreuses méthodes d'extraction et de quantification de ces toxines, ont été mises au point (Mangia, 2009). Plusieurs auteurs se sont attachés à répertorier toutes les méthodes disponibles (Krska, *et al.*, 2008, Berthiller, *et al.*, 2009, Berthiller, *et al.*, 2012).

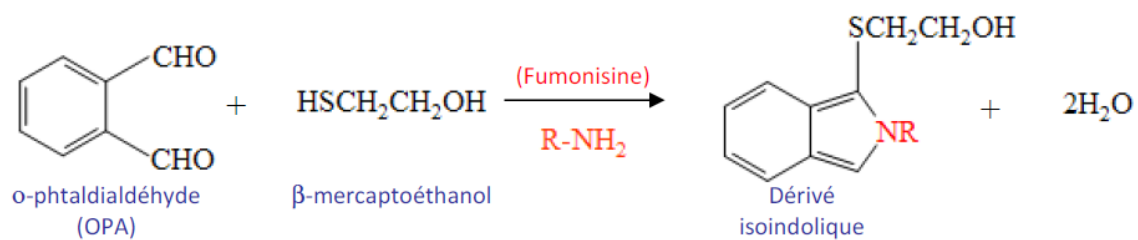


Figure I.11 : Dérivatisation des fumonisines

La plupart des méthodes reposent sur une extraction solide-liquide, le plus souvent à l'aide d'un mélange, méthanol/eau (3:1, v : v) ou acétonitrile/eau (1:1, v : v). Cette étape est parfois suivie d'une purification qui repose sur une adsorption sélective sur une phase solide (SPE), utilisant principalement des colonnes d'échange d'anions (SAX), de phase inverse (C18) ou d'immuno-affinité (IAC). Les méthodes de dosage les plus employées sont la chromatographie liquide (LC) couplée à une détection par fluorescence, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la chromatographie sur couche mince (TLC) et des immuno-essais (ELISA). Ces deux dernières méthodes ont été souvent mises en place par le passé, lors de tests de criblage rapides du fait de la facilité de leur mise en œuvre et leur faible sensibilité (Krska, *et al.*, 2008). En effet, la méthode de dosage choisie conditionnera la sensibilité et la précision de la quantification.

Les fumonisines sont des molécules qui ne fluorescent pas naturellement et sont incapables d'absorber la lumière dans les ultraviolets et le visible. Leur quantification par chromatographie liquide couplée à un fluorimètre (HPLC-FLD) nécessite donc une réaction de dérivation (**Figure I.11**), qui consiste en la modification du groupement amine pour le rendre fluorescent. A l'inverse, l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), ne requiert pas de traitements supplémentaires pour l'analyse des fumonisines et permet la quantification des fumonisines à des seuils très bas de concentration de l'ordre de 20-50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Son utilisation pour la détection des mycotoxines a augmenté ces dix dernières années (Krska, *et al.*, 2008).

L'extraction par des méthodes classiques permet d'avoir accès aux fumonisines libres, mais n'est pas toujours suffisante pour doser toutes les molécules de fumonisines présentes car certaines peuvent être fortement liées aux matrices végétales (fumonisines complexées). Ainsi plusieurs études ont mis en place des méthodes indirectes d'extraction basées sur l'altération de la structure du maïs par une hydrolyse alcaline

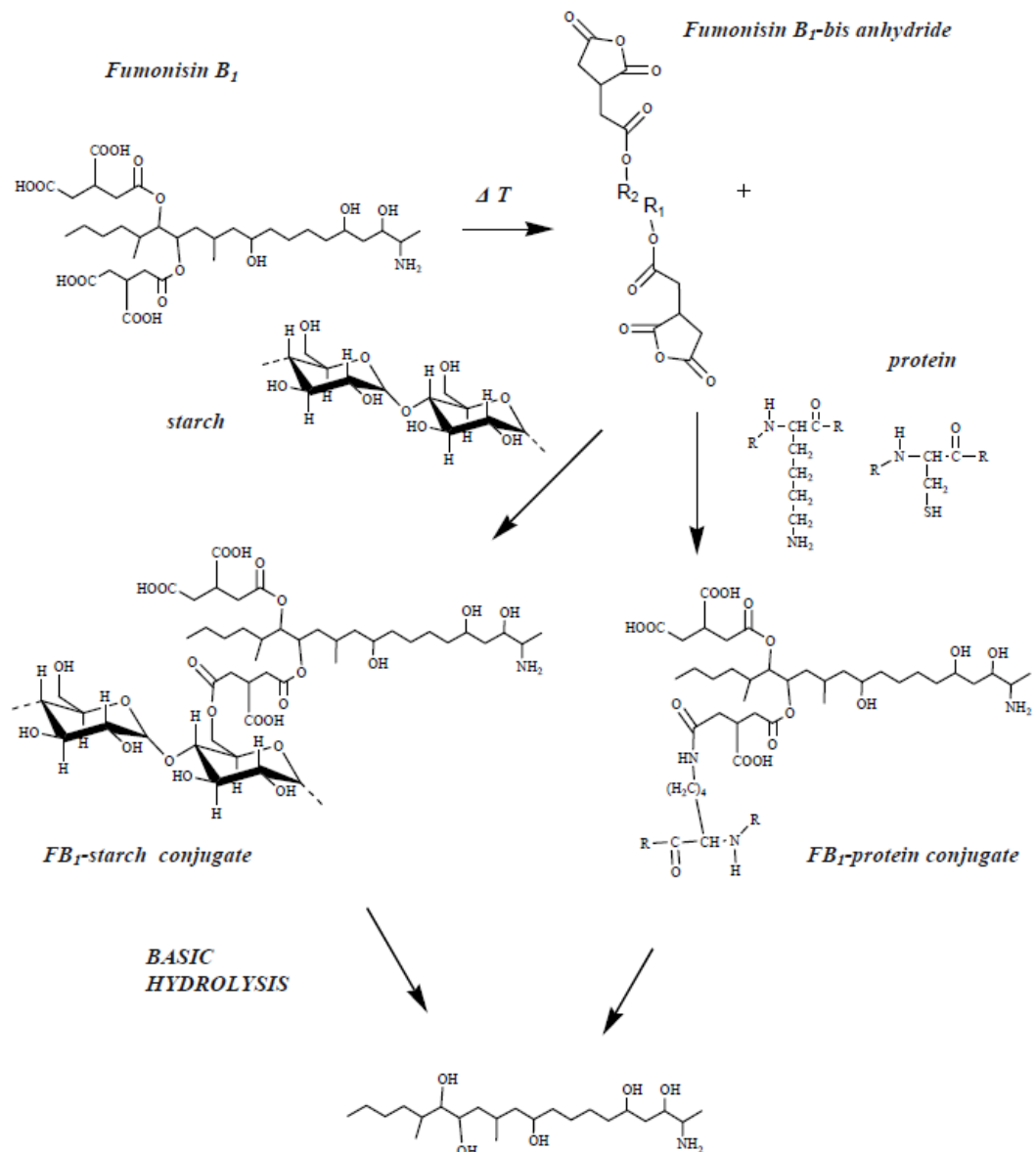


Figure I.12 : Représentation schématisée de la complexation de la FB1 avec des protéines et l'amidon, ainsi que leur libération après hydrolyse alcaline (Mangia, 2009).

(Kim, *et al.*, 2004, Park, *et al.*, 2004, Dall'Asta, *et al.*, 2008, Dall'Asta, *et al.*, 2010, De Girolamo, *et al.*, 2014, Latorre, *et al.*, 2015). L'hydrolyse alcaline permet de casser les liaisons à l'origine d'une complexation d'une fraction des fumonisines avec la matrice maïs à l'aide des solutions basiques très concentrées (*e.g.* KOH 2M, NaOH 2M), en éliminant ainsi un ou deux groupes TCA des fumonisines qui seront dosées comme des fumonisines hydrolysées telles que HFB1, HFB2 et partiellement hydrolysées telles que pHFB1, pHFB2 (Dall'Asta, *et al.*, 2009, De Girolamo, *et al.*, 2014) (**Figure I.12**).

Dall'Asta, *et al.* (2009) ont comparé cinq méthodes d'analyse des fumonisines libres et totales (FB libres + FB complexées) à partir d'échantillons de maïs naturellement contaminés. Ces méthodes comprenaient différents protocoles d'extraction et de dosage. Leurs résultats montrent que le dosage des toxines totales est fonction de la méthode d'analyse choisie et du type d'échantillon traité (*e.g.* maïs brut, produits dérivés). Cependant de façon générale, la capacité réelle à doser la totalité des fumonisines dans le maïs par les méthodes classiques (extraction avec un mélange eau/solvant) varie entre 37-68% des fumonisines totales. Ces données corroborent l'étude d'Oliveira, *et al.* (2015) qui reporte des niveaux de fumonisines masquées (FB1+FB2) jusqu'à 2 fois supérieurs à ceux des formes libres. L'hydrolyse alcaline s'avère donc nécessaire pour la détermination des fumonisines totales à partir du maïs.

3.1.7 Fumonisines dites complexées ou masquées

Ces dernières années plusieurs équipes ont mis en évidence l'existence d'une fraction parfois importante de fumonisines qui échappent aux analyses classiques (Dall'Asta, *et al.*, 2010, McCormick, 2013). Ces fumonisines dites masquées correspondent aux toxines piégées dans la matrice ou aux formes conjuguées de ces toxines, caractérisées par la présence d'un groupe glycosyl sur le groupe amine des fumonisines *e.g.* N-(carboxyméthyl)-FB1

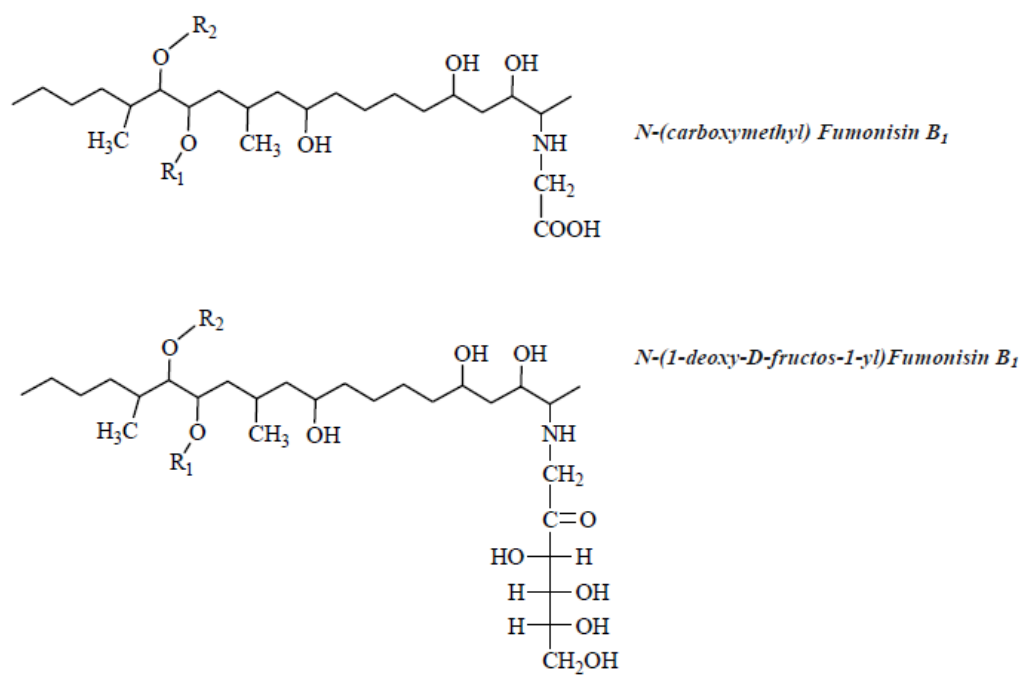


Figure I.13 : Structure chimique des formes conjuguées de la FB1 après traitement thermique (Bryła, *et al.*, 2016).

et N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-FB1 (**Figure I.12** et **I.13**). Ces derniers composés sont considérés comme moins toxiques que la FB1 car le groupe amine, responsable de sa toxicité, est modifié (Mangia, 2009, Seefelder, *et al.*, 2003). L'occurrence de ces formes masquées dans le maïs peut être expliquée soit par la formation de liaisons covalentes entre les groupes tricarballyliques (TCA) des fumonisines et les groupes sulfidryl et amine des protéines du maïs (*e.g.* la zéïne et la prolamine) ou entre les TCA des fumonisines et les groupes hydroxyl de l'amidon (**Figure I.13**). Les deux groupes TCA jouent ainsi un rôle essentiel dans la complexation des fumonisines. De plus, un léger changement dans la structure chimique des fumonisines tel que l'absence d'un ou de plusieurs groupes hydroxyles, peut entraîner une complexation de la toxine sur différentes molécules du maïs. Les fumonisines masquées peuvent apparaître aux différents stades de la contamination (Berthiller, *et al.*, 2009). Des études précédentes ont souligné que sous certaines conditions, *F. verticillioides* est capable de produire jusqu'au vingt analogues structuraux des fumonisines qui ne seront pas détectés au cours des dosages conventionnels (Leonard & Bushnell, 2004). La complexation des toxines peut aussi se produire au cours du processus infectieux : la plante active des mécanismes de défense contre les mycotoxines pour stocker ces composés dans les vacuoles ou les complexer avec différentes molécules de la paroi cellulaire de la plante (Poppenberger, *et al.*, 2003). Finalement, les fumonisines masquées peuvent apparaître durant la transformation du maïs au cours des procédés alimentaires (*e.g.* nixtamalisation, fermentation), en trouvant ainsi des toxines dans le produit final (Park, *et al.*, 2004, Berthiller, *et al.*, 2009, Dall'Asta, *et al.*, 2009, Dall'Asta, *et al.*, 2010, Falavigna, *et al.*, 2012). Les formes conjuguées peuvent se produire également après traitement par des températures élevées au cours de la transformation alimentaire (Bryła, *et al.*, 2016).

En ce qui concerne les produits fermentés dont l'ensilage de maïs, ils peuvent être considérés comme des substrats propices à la présence des fumonisines masquées dû aux

changements des caractéristiques physico-chimiques du maïs au cours de la fermentation favorisant ainsi la complexation des fumonisines. Cependant très peu d'études ont abordé cette problématique. Dernièrement, Latorre *et al.* (2015) ont mené une étude sur l'occurrence des fumonisines complexées dans les ensilages de maïs plante entière. Ces résultats reportent notamment la présence de 65% de FB1 complexée et la présence d'une corrélation positive entre le temps de fermentation et le niveau de complexation de la toxine soulignant ainsi, la présence des fumonisines masquées en conditions d'anaérobiose.

De plus, l'inoculation de *L. buchneri* semble avoir un effet important dans la stabilisation des niveaux de fumonisines libres et masquées tout au long de la fermentation. Ainsi, de nombreux travaux ont démontré la présence importante des fumonisines dites masquées dans le maïs et ses produits dérivés (Berthiller, *et al.*, 2012). Il est alors impératif de suivre l'ensemble des formes de fumonisines (libres et masquées). Ceci est d'autant plus important que plusieurs auteurs ont souligné la possibilité d'une décomplexation de ces structures dans le tube digestif après ingestion (Shier, 2000, Falavigna, *et al.*, 2012).

3.2 Devenir des mycotoxines dans les processus fermentaires des ensilages

Plusieurs études ont été menées afin de suivre l'évolution des teneurs en mycotoxines au cours de cette fermentation. Les travaux ont majoritairement concerné l'ensilage plante entière. Garon, *et al.* (2006) ont suivi l'évolution de plusieurs toxines dans des ensilages français naturellement contaminés. Leurs résultats ont montré une réduction du niveau initial d'AFB1 par un facteur 3 (de 30 à 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) et des teneurs relativement stables de DON et ZEN, après neuf mois de fermentation. Dans d'autres conditions d'ensilage, Boudra & Morgavi (2008) ont reporté une réduction de 100% du DON, 92% de la FB1 et de 53% de la ZEN dans des mini-silos artificiellement contaminés. Ces données corroborent l'étude de Mansfield, *et al.* (2005) qui indique une dégradation de 57% du DON après 3 mois de

fermentation et de Sorensen, *et al.* (2008) qui décrit une diminution d'enniatines après 3 mois d'ensilage. Ainsi plusieurs études ont mis en évidence une diminution plus ou moins importante de plusieurs mycotoxines dont notamment le DON et la ZEN au cours de l'ensilage de maïs. Cette réduction peut s'expliquer par des phénomènes chimiques, physiques ou microbiologiques (Mansfield, *et al.*, 2005). Les mécanismes impliqués sont actuellement très peu élucidés.

Quelques travaux ont été réalisés sur le devenir des fumonisines dans les ensilages de maïs. Mokoena, *et al.* (2005) ont inoculé des bactéries lactiques sur du maïs fermenté. Ils ont mis en évidence une diminution significative de FB1 (67%) après inoculation de LAB dans le maïs fermenté. Plus récemment, Latorre, *et al.* (2015) ont comparé l'évolution des teneurs en fumonisines (FB1+FB2) sur des ensilages maïs plante entière, inoculés par *L. buchneri* et des ensilages non inoculés. Leurs résultats reportent des niveaux similaires des fumonisines entre un ensilage inoculé et non inoculé. En ce qui concerne, l'ensilage maïs grain humide, aucune étude sur l'évolution des teneurs en mycotoxines au cours de ce processus n'a été publiée à notre connaissance. Cependant, depuis plusieurs années, les ingénieurs d'Arvalis observent une réduction très significative des concentrations en fumonisines avec des niveaux de réduction pouvant atteindre 80%, (Régis Coudure, communication personnelle) dans certains lots d'ensilage.

4. Méthodes biologiques de détoxification des mycotoxines dans les produits céréaliers

Actuellement, différentes méthodes appliquées pour la réduction des concentrations en mycotoxines dans les grains et autres matrices alimentaires sont connues (Doyle, *et al.*, 1982). Elles peuvent être regroupées dans trois catégories : physiques, chimiques et biologiques. Leur utilisation dépend de plusieurs facteurs tels que le niveau de contamination,

le volume du produit à traiter et l'utilisation finale. Selon Niderkorn (2007) une méthode de détoxification des mycotoxines est considérée efficace lorsque i) elle dégrade ou désactive les groupes toxiques de la toxine ii) ne produit pas de métabolites ou de résidus toxiques iii) ne modifie pas les propriétés organoleptiques et nutritionnelles du produit iv) elle est économiquement et industriellement applicable.

Les méthodes biologiques de décontamination se basent sur certaines propriétés des microorganismes capables de piéger les mycotoxines dans leurs parois microbiennes ou de biodégrader les mycotoxines par leurs activités enzymatiques, produisant ainsi des métabolites moins ou non toxiques. Ces deux stratégies, qui semblent adaptées aux matrices alimentaires fermentées, ont été largement traitées par plusieurs auteurs (Niderkorn, *et al.*, 2006, Shetty & Jespersen, 2006, Dalié, *et al.*, 2010).

Le piégeage ou séquestration correspond à l'interaction entre les groupements fonctionnels de la toxine (*e.g.* TCA) et des composants de la paroi microbienne (*e.g.* peptidoglycanes), donnant ainsi lieu à la formation d'un complexe microorganisme-mycotoxine. Certains mécanismes ont été partiellement décryptés comme celui du rôle des peptidoglycanes bactériens (PG) dans l'adsorption des fumonisines (Niderkorn, *et al.*, 2009). Ce phénomène est fréquemment retrouvé chez les bactéries lactiques et certaines levures, qui possèdent dans leur paroi microbienne de nombreux sites clé pour l'adsorption des toxines (El-Nezami, *et al.*, 2002, Niderkorn, *et al.*, 2009). Compte tenu de leur abondance dans les ensilages de maïs, ces microorganismes peuvent être intéressants pour la détoxification des mycotoxines. En effet, plusieurs additifs ont été développés pour l'alimentation animale (Mycosorb®, Mycoguard®, LEC®) qui permettent de piéger les mycotoxines libres provenant des aliments tels que l'ensilage.

Concernant les fumonisines, Niderkorn, *et al.* (2006) ont évalué le potentiel *in vitro* de 29 souches de bactéries lactiques et propioniques. Leurs résultats montrent des niveaux de séquestration de 82% et 100% de la FB1 et FB2 respectivement, dans un milieu acide (pH 4) après 24 heures d'incubation. L'efficacité de cette séquestration est modifiée par l'augmentation du pH et est plus importante chez les bactéries lactiques. Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans ce piégeage, Niderkorn, *et al.* (2009) ont appliqué différents traitements physico-chimiques, enzymatiques et génétiques à la paroi microbienne. Ils ont observé une augmentation du piégeage après modification des polysaccharides, lipides et protéines et une diminution significative lorsque la structure des peptidoglycanes était affectée, confirmant ainsi l'importance de ces composants des parois cellulaires. Du côté des fumonisines, ils ont montré que les groupes TCA jouaient un rôle essentiel pour la mise en place de ce mécanisme. Ainsi l'utilisation du piégeage des fumonisines dans l'ensilage de maïs par ajout de bactéries lactiques ou levures doit prendre en compte certains facteurs tels que la charge microbienne nécessaire au piégeage, la stabilité du complexe bactérie-mycotoxine et la capacité réelle à diminuer la biodisponibilité. Le piégeage par les bactéries, comme par les levures, est rapide, il ne nécessite pas que les cellules soient viables, mais c'est un processus réversible (Pizzolitto, *et al.*, 2012). Il ne garantit pas cependant une décontamination de mycotoxines du fait de la possibilité du relargage des toxines après l'ingestion (Mokoena, *et al.*, 2005).

Par conséquent, la biodégradation des mycotoxines par l'activité microbienne semble être l'alternative la plus prometteuse et durable du fait de l'efficacité et de l'irréversibilité du processus. Selon Kolosova & Stroka (2011) et Niderkorn (2007), la biodégradation microbienne des mycotoxines est très adaptée à l'industrie alimentaire et aux produits fermentés comme l'ensilage de maïs.

La biotransformation microbienne des mycotoxines dans des procédés fermentaires ou dans le tractus animal est un processus important qui est influencé par divers facteurs environnementaux. Elle peut impliquer plusieurs activités enzymatiques telles que l'acétylation, la glycosylation, la dé-époxydation, l'hydrolyse, la désamination et la décarboxylation (McCormick, 2013). Ces questions sont traitées dans la revue bibliographique présentée ci-dessous sous forme d'article.

« Contamination of food and feed with mycotoxins: uncovering detoxifying organisms from microbial communities by global genomic approaches »

**Contamination of food and feed with mycotoxins: uncovering detoxifying organisms
from microbial communities by global genomic approaches**

Ccori Martinez Tupia^{1,2}, Christian Barreau³, Vessela Atanasova-Penichon¹, Nadia Ponts¹,
Florence Richard-Forget¹ and Jean-Michel Savoie¹

Abstract

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungi under certain conditions. They are a threat for human and animal health and cause substantial economic losses. Clearly, pre- or post-harvest prevention of mycotoxin contamination would be the perfect strategy to minimize their occurrence in food and feed. Nonetheless, the current prediction tools and control strategies are not effective enough to guarantee full control for most mycotoxin thresholds defined by the different established regulations. Among all strategies aiming at reducing mycotoxin contents, microbial degradation based on enzymatic degradation to transform mycotoxins into nontoxic metabolites is certainly a promising efficient and environmental friendly strategy. A considerable number of microbes and microbial consortia isolated from different niches capable of degrading or detoxifying several mycotoxins have been described. Some genes involved in this biotransformation capacity have been identified during the past decade. However, little is known about the ecology and the microbial consortia responsible of these microbial detoxifications. Hence, from culture dependent microorganisms toward the global microbiome comprehension, this review gives an overview of the current knowledge of microbial degradation of mycotoxins. This will lead to a better understanding of the global interactions and the role of several microbial consortia.

Keywords: Mycotoxins, detoxification, biodegradation, microbiome, microbial consortia.

4.1. Introduction

Mycotoxins are chemically diverse secondary metabolites produced by fungi that are frequently found in food and feed worldwide (He & Zhou, 2010). The Food and Agriculture Organization (FAO) estimates that 25% of the world's agricultural commodities are contaminated with mycotoxins (Jard, *et al.*, 2011). Considering their demonstrated toxicity for human and animal health and their frequent occurrence, the mycotoxins produced by fungi belonging to the genera *Fusarium* (*e.g.* trichothecenes including the vomitoxin deoxynivalenol – DON, zearalenone – ZEA, and type B fumonisins – FB), *Alternaria* (*e.g.* alternariol), *Aspergillus* and *Penicillium* (*e.g.* aflatoxins – AF and ochratoxin – OTA) are of particular concern. Therefore, many countries have set regulations for mycotoxin content in food and feedstuff that often differ between countries. For example, the European Commission has set maximum levels of 2 µg of AFB1 per kilogram of cereals and derived products for human consumption (EC Regulation (EU) No 1881/2006), and 1,750 µg of DON and 4,000 µg of the sum of FB1 and FB2 per kilogram of unprocessed durum wheat and maize, respectively (EC Regulation (EU) No 1126/2007). Depending on the considered fungus, contamination of agricultural products with toxins can occur in the field, before harvest, and/or during handling and storage (Varga & Tóth, 2005, Magan, *et al.*, 2011, Torres, *et al.*, 2014). Once produced, mycotoxins are highly stable compounds that are found along the entire food chain to end-up in final products, potentially causing substantial economic losses (Kolosova & Stroka, 2011). Accordingly, preventing contaminations with mycotoxins would be the ideal strategy to minimize its occurrence in food and feed. Current prediction tools and control strategies are however insufficient to fully guarantee the safety of cereals and derived products. The next alternative would be to rescue contaminated harvests by detoxification.

Strategies to decontaminate feeds and foods include physical, chemical (authorized only for products intended for animal consumption, EC Regulation No 466/2001), and biological methods, some of them being patented (He & Zhou, 2010). The use of physical and chemical treatments, mostly applied to aflatoxins, are however limited due to partial efficiency, the alteration and sometimes destruction of the matrix (*e.g.* reduction of the nutrient content), and elevated costs. On the contrary, biological methods of decontamination have aroused growing interest in a context of encouraged efforts to develop safe and durable anti-mycotoxin strategies (Kolosova & Stroka, 2011), provided non-toxic or at least less toxic metabolites than the parent toxin molecule are produced. Since fungal toxins are frequently encountered in Nature, the occurrence of microorganisms that can catabolize these metabolites, and therefore detoxify the environment they encounter, is logically expected (Karlovsky, 1999). Indeed, there are many examples of mycotoxin biotransformation reported in the literature (McCormick, 2013). Such reactions were found to be performed by a wide range of microorganisms (bacteria, yeast, fungi, protozoa) and include acetylation, glucosylation, de-epoxidation, ring cleavage, hydrolysis, deamination and decarboxylation (McCormick, 2013).

Microorganisms with degrading abilities were isolated from complex populations issued from different sources by screening and enrichment culture techniques as reported by various authors (Shima, *et al.*, 1997, Duvick, *et al.*, 1998, Camilo, *et al.*, 2000, Fuchs, *et al.*, 2002, Hormisch, *et al.*, 2004, Molnar, *et al.*, 2004, Benedetti, *et al.*, 2006, Schatzmayr, *et al.*, 2006, Guan, *et al.*, 2009, Yu, *et al.*, 2010, Upadhaya, *et al.*, 2012). Moreover, some of the genes coding for the involved enzymatic activities have been cloned and expressed in heterologous hosts (Duvick, 2001, Takahashi-Ando, *et al.*, 2002, Higa, *et al.*, 2003, Takahashi-Ando, *et al.*, 2004, Igawa, *et al.*, 2007, Karlovsky, 2011). Despite of these significant insights, practical application of microorganisms in detoxifying animal feed is still limited. This may be due to

a lack of information about mechanisms of transformation, activity and toxicity of intermediate and by-products, adaptation to the matrix and effects of the transformation reactions on nutritional values of feeds (Cserhádi, *et al.*, 2013).

To increase the possibility of identifying efficient biological strategies, global approaches based on molecular fingerprinting or next generation sequencing (NGS) methods could be implemented to address microbial communities directly in their natural environments, bypassing the need for *in vitro* isolation (Marco, 2010). Up to now, these approaches have been mainly applied to researches within complex matrixes and environmental conditions *e.g.* animals and human guts microbiota, seabed microbiota associated to hydrocarbon decontamination (Hormisch, *et al.*, 2004, Molnar, *et al.*, 2004, Teniola, *et al.*, 2005, Guan, *et al.*, 2009, Sangare, *et al.*, 2014) and recently associated to mycotoxin exposure and degradation (Boguhn, *et al.*, 2010; Guo, *et al.*, 2014; Kosawang, *et al.*, 2014). As a consequence, a number of bacterial *phyla* have been discovered by culture- independent methods (Rappe & Giovannoni, 2003, Ley, *et al.*, 2006). Compared to pure active strains, microbial consortia may serve as an inexhaustible supply of genes for detoxifying enzymes.

Ultimately, identification of microbes and their specific mechanism involved in mycotoxins degradation have been comprehensively reviewed (Karlovsky, 1999, Varga & Tóth, 2005, Zhou, *et al.*, 2008, Wu, *et al.*, 2009, Awad, *et al.*, 2010, Upadhaya, *et al.*, 2010, Jard, *et al.*, 2011, Karlovsky, 2011, Kolosova & Stroka, 2011, McCormick, 2013). However, little is known about the microbiome involved in consortia responsible for these transformations. Hence, this review gives an overview of the current knowledge of microbial degradation of mycotoxins underlying the powerful opportunities of new global approaches based on “omics” and next generation sequencing (NGS) technologies can offer for identification of new agents and enzymatic activities responsible for the degradation.

Table I.3: Microorganisms involved in mycotoxins degradation

Biotransforming agent		Target mycotoxin	Origin	Reference
Category	Microorganism			
Bacteria	<i>Corynebacterium rubrum</i> <i>Flavobacterium aurantiacum</i> NRRL B-184	Aflatoxins	soil	(Ciegler, <i>et al.</i> , 1966); (Wu, <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		tapir feces	(Guan, <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Mycobacterium fluoranthenorans</i> sp. Nov. DSM44556, <i>Rhodococcus erythropolis</i> .		contaminated soils by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)	(Hormisch, <i>et al.</i> , 2004); (Teniola, <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Bacillus subtilis</i>		animal guts and soil	(Gao, <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N17- 1		soils and contaminated grain kernels	(Sangare, <i>et al.</i> , 2014)
	NCB1492 (<i>Delftia/ Comamonas</i> group)		soil	(Benedetti, <i>et al.</i> , 2006)
	ATCC 55552 or 2412.1	Fumonisin	field grown maize stalk	Duvick <i>et al.</i> , 1998; (Heinl, <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Sphingopyxis</i> sp. MTA144		soil	Täubel, 2005; (Heinl, <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Bacillus</i> spp.		maize silage	(Camilo, <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Eubacterium bifforme</i>		swine gut microbiota	(Upadhaya, <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Lactobacillus vitilinus</i> , <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Stenophomona</i> spp., <i>Eubacterium</i> spp.	Ochratoxin	rumen fluid and swine intestines	(Schatzmayer, <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Bacillus licheniformis</i>		soybean	(Petchkongkaew, <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Pediococcus parvulus</i>	Zearalenone	wine	(Abrunhosa, <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Lactobacillus</i> spp. and <i>Leuconostoc</i> spp.		collection	(Niderkorn, <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Eubacterium</i> sp. BBSH 797		bovine rumen fluid of cattle	(Fuchs, <i>et al.</i> , 2002)
	E3- 39 (<i>Agrobacterium/ Rhizobium</i> group)		soil	(Shima, <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Clostridiales</i> , <i>Anaerofilum</i> sp., <i>Collinsella</i> sp., and <i>Bacillus</i> spp.	Trichothecenes	chicken intestines	(Yu, <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Devosia nanyangense</i>		mycotoxin contaminated soils	(Onyango, <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Nocardioide</i> sp. WSN05- 2	Patulin	wheat field (leaves and soil)	(Ikunaga, <i>et al.</i> , 2011) ; (Sato, <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>		fermented animal feeds	(Hawar, <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Gluconobacter oxydans</i>		apples	(Ricelli, <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Nocardia globulera</i> , <i>Rhodococcus fascians</i> and <i>Bacillus sphaericus</i>	Beauvericin	wheat	Duvick, 1998
	<i>Rhodococcus</i> spp.	Multi-mycotoxins	collection	(Cserháti, <i>et al.</i> , 2013)

4.2 Screening for mycotoxin degrading microorganisms

Mycotoxin-degrading microorganisms are expected to occur in environments containing mycotoxins. Screening strategies consist to randomly test selected cultures for their abilities to transform toxins (Karlovsky, 1999). The enrichment strategies are based on the positive selection of microorganisms resistant to a toxin, or able to growth in a minimal media supplied with the toxin as the sole carbon and nitrogen source (McCormick, 2013). The drawback of this strategy is the capacity of the analytical procedure, resulting difficult to reveal a microbial degrading activities. In the experiment reported by Fuch et al. (2002) a minimal medium was enriched with type A trichothecenes to assess if mycotoxin degradation is independent from bacterial growth. They however observed an incomplete transformation of toxins that they ascribed to the lack of nutrients in the applied buffer solution. Similarly, using phosphate buffer supplied with fumonisins as the sole carbon and nitrogen source, a mixed microbial culture related to the *Delftia/ Comamonas* group was identified as able to decrease FB1 (Benedetti, et al., 2006).

Degrading microorganisms have been isolated from different environmental reservoirs including principally soil, plant tissues, animal gut microbiota, mycotoxin contaminated crops and fermented processes (Table 1). These microorganisms were shown to be active most of time under specific conditions close to the environment where they have been isolated. Microorganisms present in these environments certainly possess enzymatic activities that can protect them from mycotoxins or that allow them to compete with mycotoxin producing fungi (McCormick, 2013). It is therefore assumed that endogenous microorganisms with mycotoxin degradation abilities could show a better adaptation, thus ensuring an efficient mycotoxin degradation yield during the time. Interestingly, Kriszt et al.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		commercial origin	(Moss & Long, 2002)
	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>		hindgut of the termite <i>Mastotermes darwiniensis</i>	(Molnar, <i>et al.</i> , 2004); (Schatzmayr, <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Geotrichum spp.</i> , <i>Metschnikowia spp.</i> , <i>Kluyveromyces spp.</i> , <i>Saccharomyces spp.</i>	Multi- mycotoxins	not specified	(Repedkiene, <i>et al.</i> , 2013)
Filamentous fungi	<i>Pleurotus ostreatus</i> and <i>Peniophora</i> sp.	Aflatoxins	collection	(Motomura, <i>et al.</i> , 2003); (Alberts, <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999 and NRRL 3000		soil	(Wu, <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Aspergillus niger</i>		not specified	(Dobritzsch, <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Rhizopus stolonifer</i> Rh5, <i>Rhizopus microsporus</i> Rh31,	Ochratoxin	collection	(Varga, <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus wentii</i>		grapes	(Abrunhosa, <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Rhizopus</i> <i>spp.</i>		collection	(Brodehl, <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Clonostachys rosea</i>	Zearalenone	collection	(Takeya, <i>et al.</i> , 2002)
Yeast	<i>Exophiala spinifera</i> and <i>Rhinocladiella atrovirens</i>	Fumonisin	maize tissue and kernels	Duvick, 1998 ; (Blackwell, <i>et al.</i> , 1999, Duvick, 2001)
	<i>Phaffia rhodozyma</i> CBS5905, <i>Xanthophyllomyces</i> <i>dendrorhous</i>	Ochratoxin	collection	(Peteri, <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Rhodospiridium</i> <i>Kratochvilovae</i>	Patulin	not specified	(Castoria, <i>et al.</i> , 2011)

(2012) developed a bacterial based detoxification system using a non-pathogen *Rhodococcus pyridinovorans* K408 strain. Their results were further supported by a bioluminescent version of a yeast estrogen screening system (BLYES) which was constructed to detect biological defects caused by endocrine disrupting chemicals (Sanseverino, *et al.*, 2009). Similarly Krifaton *et al.* (2013) proposed a method involving combined biological, analytical and immunochemical techniques for screening ZEN degrading microorganisms. This method also is based on the BLYES reporter system able to detect traces of ZEN after microbial activity. Their results underlined the potential of such bioassays in evaluating bio-detoxification methods.

Concerning aflatoxins, Hormisch, *et al.* (2004) isolated a strain of *Mycobacterium fluoranthenorans* from a coal gas contaminated soils able to use a polyaromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene as sole substrate. Then when tested on aflatoxins, this microorganism was capable to reduce AFB1 concentration by 20-30% within 36 hours and to fully eliminate it after 72h. These microorganisms may likely recruit enzymes to detoxify pollutants structurally similar to PAH such as cyclic mycotoxins (McCormick, 2013). In addition, based on the fact that AFB1 is a furanocoumarin, Guan *et al.* (2008) isolated several microbes with the ability to degrade AFB1 using as substrate another coumarin or a furanocoumarin analog structure. Later, Wu *et al.* (2009) referred to several microorganisms such as *Corynebacterium rubrum* and *Nocardia asteroides* for their high efficacy to remove aflatoxin B, G and M1 from a variety of food products, including milk, oil, peanut butter, peanuts and maize. Recently, Sangare *et al.* (2014), characterized a strain of *Pseudomonas aeruginosa* N17- 1 (KJ188250) for its ability to particularly degrade 83% of AFB1, and 47% of AFB2 *in vitro*.

In the case of fumonisins, Duvick (1998) was the first of our knowledge, who described the presence of microorganisms capable to degrade either partially or fully FB1 to CO₂ and other

compounds in liquid culture (Blackwell, *et al.*, 1999). These microorganisms include black yeast strains of *Exophiala spinifera* and *Rhinochladiella* sp. (Blackwell, *et al.*, 1999) and bacterial strains such as *Caulobacter* spp., *Sphingopyxis* sp. MTA144 and a bacterial strain designated as ATCC 55552 (Benedetti, *et al.*, 2006, Heintz, *et al.*, 2010).

Various researches reported the occurrence of microorganisms belonging to different genus including *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, and *Trichosporon*, with the ability to hydrolyze OTA. In the case of *Trichosporon mycotoxinivorans* a full transformation of OTA and also of ZEN was obtained after 2.5 hours and 24 hours of incubation, respectively (Molnar, *et al.*, 2004, Vekiru, *et al.*, 2010). These results evidenced the ability of some microorganisms to degrade several mycotoxins simultaneously.

Furthermore, several authors demonstrated that fungi, predominantly *Aspergillus* and *Rhizopus* species, as well as *Bacillus licheniformis*, one yeast *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 and one anaerobic strain close to *Eubacterium biforme*, were able to degrade more than 80%, 95%, 92%, 90% and 75% of OTA, respectively (Abrunhosa, *et al.*, 2002, Peteri, *et al.*, 2007, Petchkongkaew, *et al.*, 2008, Upadhaya, *et al.*, 2012). Unfortunately, the enzymes and the genes responsible of this degradation still require to be deciphered. Recently, in the publication of Onyango *et al.* (2014) a bacterial strain designated as *Devosia nanyangense* DDB001 was isolated for its capability of completely remove DON from culture medium, showing further the same efficacy after 10 consequent subcultures. Likewise, Roig *et al.* (2013) evidenced the capacity of several *B. subtilis* strains to degrade Enniatins A, A1, B, B1 *in vitro* with reduction values ranging from 64 to 99%. These toxins are considered as emerging *Fusarium* mycotoxins because of their low levels of characterization. However, the evidence of their incidence is in constant increase (Jestoi, 2008, Vaclavikova, *et al.*, 2013).

In addition, several authors focused on the ability of some environmental microbiota to detoxify mycotoxins. Beeton and Bull (1989) have conducted some experiments aiming at comparing monocultures over bacterial communities for their capacities to detoxify and degrade trichothecenes, particularly T-2 toxin. They showed that global consortia samples were more active in T-2 degradation than any single bacterial strain. These results suggested a co-metabolic interaction between species as a determinant factor involved in T-2 toxin degradation. He *et al.* (1992) have tested microbial inocula from soil, rumen fluid and intestines fluid of broilers for their ability to transform DON *in vitro*, observing a complete transformation of DON by intestines fluid microorganisms whereas rumen and soil microorganisms showed 35% and 50% of DON degradation, respectively. Similarly, Fodor *et al.* (2008) demonstrated that endogenous swine caecal microbiota, which mainly contained *Escherichia coli* (1.6×10^6 UFC/g) and *Bacteroides spp.* (5.8×10^8 UFC/g) were able to transform about 50% of FB1 into HFB1. Later Guan *et al.* (2009) isolated a microbial consortium (C133) from the gut microbiota of *Ameiurus nebulosus* for its ability to completely transform DON into DOM-1 *in vitro*. Besides, no reduction of DON levels was detected for any other fish gut samples screened under the same conditions. All these results can be explained by the fact that inside microbial consortia, interactions can occur leading to a cooperative mechanism toward a substance supplied for degradation, *i.e.* enzymes involved in degradation are induced by metabolites of another microbe (Karlovsy, 1999).

4.2.1 Microorganisms with multi-mycotoxin degradation abilities

Based on the fact that multi-mycotoxins co-contamination frequently occur in food and feed (Grenier & Oswald, 2011), identification and characterization of microorganisms with the ability to simultaneously degrade several mycotoxins emerge as an interesting strategy.

Molnar *et al.* (2004) isolated a *Trichosporon mycotoxinivorans* strain with a strong ability to degrade both OTA and ZEN and that had no negative influence on performance and wellbeing of broilers when tested in a feeding trial (Schatzmayr, *et al.*, 2003). However, the lack of toxicity of *T. mycotoxinivorans* was not corroborated by the report of Hickey *et al.* (2009) who suggested this yeast as a pathogen that can contribute to human cystic fibrosis. In addition, Mortensen *et al.* (2006) studied ZEN and OTA degradation in endogenous microbiota from different agricultural soils. Their experiments indicated a rapid degradation for both toxins that they ascribed to the presence of two microbiota pools with different bioacapacities. Cserháti *et al.* (2013) have conducted experiments aiming at analyzing the multi-mycotoxin degrading ability of 32 *Rhodococcus* strains considering FB1, OTA, AFB1, ZEN, T-2 and also AFB1 + ZEN + T-2 toxin mixtures. They showed that the majority of *Rhodococcus* strains were able to degrade most toxins to some extent, except in the case of FB1 for which no degradation was observed. These data could be explained by the resistant alkyl chain moiety occurring in the FB1 chemical structure. Overall, *Rhodococcus spp.* presents a broad catabolic versatility and unique enzymatic capabilities such as large sets of oxidases along with other enzymes.

4.2.2 Microorganisms from environments: soil and plant tissues

Soil is considered as a well-known source of microbial enzymatic activities. As a consequence, most of microorganisms capable to transform mycotoxins are from soil, including agricultural and PAH contaminated soil (Hormisch, *et al.*, 2004, Teniola, *et al.*, 2005, Benedetti, *et al.*, 2006). Several examples corroborating this fact have been also cited in Table 1. Interestingly, Mortensen *et al.* (2006) revealed a stronger degradation of ZEN and OTA in barley planted soils compared to unplanted soils, suggesting that planted soil could induce a higher microbial activity toward mycotoxin degradation.

In addition plant tissues constitute another important reservoir of available degrading microorganisms. In these extent McCormick *et al.* (2012) reported 23 yeasts strains belonging to *Trichomonascus* clade able to glycosylate T-2 toxin. They were isolated from moss, rotted log, decaying fungal matter. In addition, a number of studies have focused on the identification of degrading microorganisms during ensiling and other fermentation processes (Karlovsy, 1999). Microorganisms that are able to degrade or bind fumonisins and zearalenone were isolated from contaminated wheat and corn, silage and compost (Niderkorn, *et al.*, 2007, Heintl, *et al.*, 2010). Likewise, Camilo *et al.* (2000) reported three strains belonging to *Bacillus spp.* and a yeast strain isolated from corn and silage that were able to partially degrade fumonisins.

4.2.3 Microorganisms of animal microbiota: ruminant and non-ruminants animals

Previous researches reported several microorganisms and consortia of microorganisms (Table 1) isolated from swine, termites, catfish and chicken intestinal microbiota able to convert mycotoxins to metabolites less or non-toxic (Molnar, *et al.*, 2004, Guan, *et al.*, 2009, Yu, *et al.*, 2010, Upadhaya, *et al.*, 2012). Occurrence of degrading microbes in their gut may help animals to a better mycotoxin tolerance (McCormick, 2013). Molnar *et al.* (2004) isolated the yeast *T. mycotoxinivorans sp.* from the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*. The capability of this basidiomycete to degrade OTA and ZEN was tested *in vitro*. Moreover, Fuchs *et al.* (2002), isolated an anaerobic gram-positive bacterium named BBSH 797 from rumen fluid. Their results suggested that rumen microbes possess high degrading activities conferring to ruminants a lower sensibility to mycotoxins compared to monogastric animals.

Table I.4. Microbial mechanisms involved in mycotoxin transformation

Target mycotoxin	Degradation mechanism/involved enzyme	Metabolites produced	Reference
Aflatoxin B1	Reduction	aflatoxicol	(Hormisch, <i>et al.</i> , 2004);(Teniola, <i>et al.</i> , 2005); (Wu, <i>et al.</i> , 2009).
	Enzymatic oxidation/laccase	not specified	(Motomura, <i>et al.</i> , 2003); (Alberts, <i>et al.</i> , 2009).
Ochratoxin A	Hydrolysis/carboxypeptidase	Ota, L- β -phenylalanine	(Upadhaya, <i>et al.</i> , 2012); (Schatzmayr, <i>et al.</i> , 2003); (Schatzmayr, <i>et al.</i> , 2006);(Petchkongkaew, <i>et al.</i> , 2008);(Peteri, <i>et al.</i> , 2007); (Abrunhosa, <i>et al.</i> , 2002); (Abrunhosa, <i>et al.</i> , 2010); (Molnar, <i>et al.</i> , 2004).
	Hydrolysis/ochratoxinase amidase	not specified	(Dobritsch, <i>et al.</i> , 2014).
Fumonisin B1	Decarboxylation/carboxylesterase	HFB1	(Duvick, <i>et al.</i> , 1998); (Blackwell, <i>et al.</i> , 1999);
	Transamination and oxidative deamination/aminotransferase and oxidase	N-acetyl HFB1, 2-Keto HFB1	(Duvick, 2001), Täubel, 2005; (Heinl, <i>et al.</i> , 2010), (Heinl, <i>et al.</i> , 2011).
Type A trichothecene T-2 toxin	Acetylation/acetyltransferase	3-acetyl T-2 toxin	(McCormick, <i>et al.</i> , 2012); (Yu, <i>et al.</i> , 2010).
	Glycosylation/glucosyltransferase	T-2 toxin 3-glucoside	(McCormick, <i>et al.</i> , 2012).
	Deacetylation/isovaleryl esterase	HT-2 toxin, T-2 triol, neosolaniol	(Zhou, <i>et al.</i> , 2008) ; (McCormick, <i>et al.</i> , 2012)
	Deepoxidation	De-epoxy HT-2 toxin, de-epoxy T-2 triol	(Zhou, <i>et al.</i> , 2008) ; (Fuchs, <i>et al.</i> , 2002).
Type B trichothecene DON	Deepoxidation	DOM-1	(Zhou, <i>et al.</i> , 2008); (McCormick, 2013).
	Isomerization	3-epi-DON	(Schatzmayr, <i>et al.</i> , 2006) ;(Ikunaga, <i>et al.</i> , 2011); (Sato, <i>et al.</i> , 2012)
	Glycosylation/UDP-glucosyltransferase	DON 3-glucoside	(McCormick, <i>et al.</i> , 2012)
	Oxidation	3-keto DON	(Zhou, <i>et al.</i> , 2008); (McCormick, 2013).
Zearalenone	Reduction/3 α -hydroxysteroid dehydrogenase	α -zearalenol, β -zearalenol	(Takahashi-Ando, <i>et al.</i> , 2004); (Niderkorn, <i>et al.</i> , 2007).
	Hydrolysis/lactonohydrolase	1-(3,5-dihydroxyphenyl)-10'-hydroxy-1'-undecen-6'-one	(Takahashi-Ando, <i>et al.</i> , 2002).
	Sulfation/sulfotransferase	Zearalenone-14-sulfate, α -zearalenol-sulfate, zearalenone-4-O-sulfate	(el-Sharkaway, <i>et al.</i> , 1991); (Brodehl, <i>et al.</i> , 2014).
	Glycosylation/glucosyltransferase	Zearalenone-14-O-glucoside, zearalenone-16-O-glucoside	(Brodehl, <i>et al.</i> , 2014).
Patulin	not specified	(E)-ascladiol, (Z)-ascladiol, hydroascladiol	(Ricelli, <i>et al.</i> , 2007); (Hawar, <i>et al.</i> , 2013).
	Hydrolysis	desoxypatulinic acid	(Castoria, <i>et al.</i> , 2011).

4.3 Mechanisms and environmental factors involved in mycotoxin transformation by microorganisms

4.3.1 Mechanisms of degradation

4.3.1.1 Aflatoxin transformation

Aflatoxin B contains a lactone-cyclopentanone structure which fluoresces blue while aflatoxin G presents two lactones that fluoresce green (Wu, *et al.*, 2009). As fluorescence can be easily used in screening procedures, most of microbial biotransformation were identified through the loss of fluorescence due to a cascade of enzymatic reactions over the time (Teniola, *et al.*, 2005). However Liu *et al.* (1998) reported extracellular enzymes from the basidiomycete *Armillaria tabascens* which converts aflatoxin B1 to a fluorescent degradation product, suggesting that some enzymes could also cause changes to the difuran rather than the lactone moieties of the molecule.

Most studies on biotransformation of aflatoxin have focused on aflatoxin B1 which is the most potent naturally known liver carcinogenic agent. Hence, Alberts *et al.* (2009) and Motomura *et al.* (2003) observed a high AFB1 degradation activity from *Pleurotus sp.* and *Peniophora sp.*, possibly linked to the enzymatic oxidation handled by laccases (Table 2). Conversely, Wu *et al.* (2009) reported the capability of *A. candidus* and *P. raistrickii* to convert AFB1 into a new compound similar to AFB2. Besides, Hormisch *et al.* (2004) and Teniola *et al.* (2005), reported *A. flavus* for converting AFB1 to aflatoxicol A and B (AFL-A, AFL-B) by reducing the cyclopentenone carbonyl of AFB1. These metabolites are considered less toxic than aflatoxin B1

In addition, Taylor *et al.* (2010) and Lapalikar *et al.* (2012), proposed a degradation mechanism of AFB1 and aflatoxin G1 by *Mycobacterium smegmatis* which include the

reduction of the α , β -unsaturated double bond between C-2 and C-6 by a dezaflavin cofactor F₄₂₀H₂-dependent reductase (FDR), followed by spontaneous hydrolysis to multiple degradation products.

4.3.1.2 Ochratoxin transformation

Ochratoxin A is a chloro-isocoumarin produced mainly by *A. ochraceus*, *A. ostianu*, *A. westerdijckiae* and *P. verrucosum*. Two pathways may be involved in OTA microbial degradation. First OTA is converted to OT α and L- β -phenylalanine (two non-toxic metabolites) through the hydrolysis of the amide bond. This reaction known as a carboxypeptidation has been extensively characterized by several authors (Table 2). Secondly, OTA may be degraded by the hydrolysis of the lactone ring producing an opened lactone form of OTA (Karlovsky, 1999, Abrunhosa, *et al.*, 2010). Unfortunately, this last structure reported a similar toxicity than OTA when administered to rats (Xiao, *et al.*, 1996).

Wegst and Lingens (1983) reported a strain of *Phenyllobacterium immobile* for its ability to convert OTA to OT α and three additional metabolites which resulted from the breakdown of the phenyl moiety of phenylalanine. Recently, Dobritsch *et al.* (2014) using a biotechnological approach based on the cloning and homologous expression of a putative amidase, identified and characterized a novel microbial enzyme they called “ochratoxinase”. This protein was considered more stable and efficient in OTA degradation than the carboxypeptidase A and Y, the two previously known enzymes capable of degrading this mycotoxin.

4.3.1.3 Trichothecenes transformation

Trichothecenes produced by *Fusarium spp.* are characterized by an oxygen function at carbon 3 (C3) and are grouped based on the oxygen function at carbon 8 (C8). They are divided into

type A trichothecenes that include Toxin T-2, HT-2 toxin, T-2 triol, T-2 tetraol, scirpentriol, diacetoxyscirpenol (DAS) composed by a hydroxyl or acyl group at C8 and type B trichothecenes as deoxynivalenol, nivalenol, fusarenol X, with a keto function at C8. The epoxide and the C3 hydroxyl group of trichothecenes is essential for their toxicity (Zhou, *et al.*, 2008).

Concerning degradation mechanisms, McCormick (2013) summarized most of microbial transformation reactions for trichothecenes, which includes acetylation, deacetylation, oxygenation, de-epoxidation, epimerization and glycosylation. Fuchs *et al.* (2002) reported the transformation of six different type A trichothecenes by a *Eubacterium* strain (Table 2). All these degradation metabolites were composed of de-epoxy structures considered as nontoxic forms. In addition, McCormick *et al.* (2012) described three potential pathways involved in T-2 toxin degradation: C3 acetylation, C8 isovaleryl group hydrolysis or C3 glycosylation.

Regarding microbial mechanism involved in transformation of type B trichothecenes, the presence of an acetyl group (3ADON, 15 ADON and FUS), was shown to greatly favor deacetylation over de-epoxidation reaction. Generally, the metabolic pathway depends upon the presence and position of acyl functionalities (CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01). Fuchs *et al.* (2002) studied several microbial mechanisms of DON degradation. They associated de-epoxidation mechanisms to the anaerobic bacterial activity, whereas oxidation and isomerization mechanisms were associated to aerobic bacteria. These results were in agreement with the work of Ikunaga *et al.* (2011) and Sato *et al.* (2012) who identified 3-epi-DON as the major initial metabolite of DON degradation using a strain of *Nocardioide* sp. and of *Devosia* sp. The conversion of DON to 3-epi-DON required two enzymatic activities of partially overlapping substrate specificity, occurring simultaneously. This may be a simple

reason why isomerization is rarely observed in screening for biological degradation of DON (Karlovsy, 2011).

4.3.1.4 Zearalenone transformation

Zearalenone is a phenolic resorcylic acid lactone. It is composed of a lactone ring and a C-4 hydroxyl group. Both are essential for its biological activity. Toxicity of ZEN results from its estrogenic activity (McCormick, 2013).

Karlovsy (1999) reviewed a variety of microorganisms such as bacteria, yeasts and fungi capable to convert zearalenone to α and β -zearalenol. However these transformations cannot be considered as detoxification since the estrogenic activity of these metabolites is similar to ZEN. Later, Takahashi-Ando *et al.* (2002) and Vekiru *et al.* (2010) have been identified the cleavage mechanism involved in ZEN degradation (table 2). This degradation was firstly characterized by the opening of the lactone ring of ZEN at the ketone group at C6, which resulted in the conversion of ZEN into ZOM-1. Then, the reaction was followed by a decarboxylation converting ZEN into far less estrogenic products that neither showed fluorescence nor did absorb UV-light (Molnar, *et al.*, 2004).

Recently, Brodehl *et al.* (2014) reported the potential of *Rhizopus spp.* and *Aspergillus spp.* to convert ZEN into various metabolites (Table 2) including α -ZEL sulfate, ZEN-O-14-glucoside and ZEN-O-16-glucoside which were described for the first time as fungal mycotoxin conjugates. They also showed that more than 50% of the initial ZEN might be modified, leading to a masking of the toxin, which can occur in different matrixes such as fermented food.

4.3.1.5 Fumonisin transformation

The first step of fumonisin catabolism is constituted of a decarboxylation, releasing the two tricarballic acid side moieties from C14 and C15 of the main chain of fumonisin B1 by hydrolytic cleavage, then converting FB1 to hydrolyzed FB1 (HFB1) as reported by various authors (Table 2). However, further detoxification of HFB1 is necessary to achieve a complete FB1 detoxification (Karlovsky, 1999). Several reports have addressed on the toxicity of hydrolyzed fumonisins, since they can also be generated from fumonisins by an established traditional method of maize processing called nixtamalisation or by enzymatic transformation (Hartinger & Moll, 2011). Humpf *et al.* (1998) reported that HFB1 functions also as a substrate of ceramide synthase but with a ten times weaker inhibitory efficiency than FB1. However their *in vitro* experiments showed that HFB1 and N-acetyl HFB1 (Table 2) could result ten times more toxic compounds than FB1 when tested into mammalian HT- 29 cells. In addition, Blackwell *et al.* (1999) reported that the 2-amino group of hydrolyzed fumonisins certainly plays a pivotal role for FB1 toxicity. Therefore its removal could be also considered as an important step for FB1 detoxification.

Presently, several mechanisms have been proposed to explain HFB1 transformation by yeast and bacteria. Concerning yeast, HFB1 was catabolized by an amine oxidase, oxygen dependent, which converts HFB1 into N acetyl HFB1 and 2-oxo-12, 16-dimethyl-3, 5, 10, 14, 15-icosanepentol hemiketal, also known as 2-keto-HFB1 (Blackwell, *et al.*, 1999); whereas bacteria used an aminotransferase to catalyze HFB1. This reaction required pyruvate and the coenzyme pyridoxal phosphate. In addition, a novel aminotransferase encoded by the bacterium ATCC55552 was reported as responsible for HFB1 deamination (Heinl, *et al.*, 2010, Heinl, *et al.*, 2011). Moreover, heterologous expression of the gene encoding this activity in *E. coli* confirmed that detoxification of HFB1 by this strain was mediated by an aminotransferase, rather than an amino oxidase. Further studies were carried out to elucidate the whole mechanism of FB1 degradation handled by bacterial strains

(Heinl, *et al.*, 2010, Heinl, *et al.*, 2011). They proposed a catabolic gene cluster composed of 11 putative genes of two bacterial strains (AR301774 and FJ426269) which encodes for the upstream and downstream catabolic pathway. The putative genes are organized in at least two operons, separated by a bidirectional promoter, which includes two palindromic sequences that may be involved in transcriptional control of the FB1 catabolic pathway. The consecutive action of two enzymes from this cluster (encoded by genes *fum D* and *fum I*) is sufficient for fumonisin B1 detoxification (Heinl, *et al.*, 2010). Similarly, Hartinger and Moll (2011) characterized an aminotransferase involved in FB1 deamination, using a purified recombinant His tagged *Fum I* produced in *E coli*. The analysis by NMR showed the 2-keto hydrolyzed fumonisin B1 as reaction product. Pyruvate was found to be the preferred co-substrate and amino group receptor of Fum I. Addition of the pyridoxal phosphate co-enzyme to the enzyme preparation enhanced activity. Besides, they showed that the enzyme is active with HFB1, the first intermediate in all known pathways of FB1 catabolism and not with FB1 itself, suggesting therefore the occurrence of a cascade mechanism. Therefore, bacterial enzymes could be considered for their high potential in technological applications in fumonisin detoxification since, contrary to amino oxidases from yeast, they are independent of molecular oxygen (Heinl, *et al.*, 2011).

4.3.1.6 Patulin transformation

Patulin is a polyketide lactone, composed by a hemiacetal moiety and a lactone ring which are considered as key structure components for the toxicity. Patulin can form covalent adducts with thiol containing compounds, such as cysteine or glutathione, and can disable enzymes that contain sulfhydryl groups in their active sites (Castoria, *et al.*, 2011), but may also disrupt membrane integrity, protein synthesis, RNA synthesis, and other cellular functions.

McCormick (2013) have reviewed several microbial mechanisms involved in patulin degradation such as those proposed by Moss and Long (2002), Ricelli *et al.* (2007) and Hawar *et al.* (2013) in which *Saccharomyces sp.*, *Gluconobacter sp.* and *Lactobacillus sp.* converted patulin into two major metabolites known as (*E*)-ascladiol and (*Z*)-ascladiol by the opening of the pyran ring (Table 2). Then, Hawar *et al.* (2013) described a further transformation of ascladiol isomers into a novel metabolite, known as hydroascladiol. Furthermore (*E*)-ascladiol is considered as four times less toxic than patulin (Sekiguchi, *et al.*, 1983). In addition, Castoria *et al.* (2011) described another yeast mechanism of patulin detoxification using ¹³C-labeled patulin and RMN analysis. Their results showed an enzymatic conversion of patulin into desoxypatulonic acid which was considered much less toxic than patulin when tested in human lymphocytes cells, probably due to the lack of both hemiacetal and lactone. This reaction could render desoxypatulonic acid unable to react *in vitro* with thiol groups. Hence, the formation of desoxypatulonic acid from patulin could represent a novel detoxification pathway.

4.3.1.7 “Emerging Fusarium mycotoxins” transformation

Emerging Fusarium mycotoxins such as beauvericin (BEA), enniatins (ENs) and fusaproliferin (FUS) present a common structure composed of a group of cyclic hexadepsipeptide with alternating methyl-phenylalanyl and hydroxy-iso-valeryl residues (Vaclavikova, *et al.*, 2013). Presently, little is known about the microbial detoxification mechanisms involved in Fusarium emerging mycotoxins transformation. However, Roig *et al.* (2013) studied the enniatins A, A1, B, B1 degradation by 9 probiotic bacterial strains *in vitro*. They identified three degradation metabolites which resulted from the loss of hydroxyvaleric acid (HyLv), valine and a methyl group. Moreover, Meca *et al.* (2013) investigated the degradation of BEA by intracellular raw enzymes of *S. cerevisiae* and they

identified the ion molecule 573.3 that correspond to a BEA compound without a HyLv group which is considered as a bioactive group involved in its toxicity.

4.3.2. Influence of environmental factors on mycotoxin degradation

Environmental parameters are essential factors that influence mycotoxins degradation through microbial activities. This influence varies greatly depending on the microorganism (He & Zhou, 2010). Environmental parameters include pH, temperature, nutritive components, microorganisms concentration and availability of oxygen and other substrates. Therefore the efficacy of mycotoxin transformation reaction can be significantly increased by improving culture conditions. Mycotoxins may be introduced into fermentation system prior to inoculation or at any time during the growth of the detoxifying microorganism. However, a better effectiveness of reaction can be achieved by a previous increase of cell concentration or exposure to cell- free enzymes (He & Zhou, 2010). Consistently, it was reported that DON transformation activity was associated with culture supernatants rather than with pelleted cells (Cheng, *et al.*, 2010), suggesting that active degrading enzymatic activities are secreted.

For example He *et al.* (1992), showed that biotransformation of DON by rumen and microbial inocula from intestines of broilers was independent from the initial concentration of DON (14 to 1400 ppm) and microbial inoculum (0.2 to 0.8 g/mL) in the medium, but the degradation activity was completely inhibited when the pH in the medium was lowered to 5.2. Thus, the decrease of pH produced by the accumulation of fermentation products, such as organic acids, may be a major factor which inhibits the complete transformation of DON. Likewise, sodium azide at 0.1% (wt/vol) in the medium blocked the transformation of DON, suggesting that the deepoxidation of DON is an energy- dependent process. Later, Guan *et al.* (2009) reported that the microbial culture C133 was able to degrade DON over a broad range of

temperatures (4°C to 25°C) and pH values (4.5 to 10.4) under aerobic conditions. Besides, the medium composition was a key factor on the efficacy of the trichothecene degrading activity. Several authors have established environmental conditions to favor the microbial degradation of aflatoxins. For example, Motomura *et al.* (2003) reported an optimal *Pleurotus* sp. activity in cultures at 25 °C and pH 4.0-5.0. Similarly, Teniola *et al.* (2005) showed that cell free extracts from different bacterial cultures successfully degraded AFB1 in a wide temperature scale ranging from 10°C to 40°C. Guan *et al.* (2008) reported that the highest rate of AFB1 transformation by *Stenotrophomonas* sp. was at pH 8 (85%) and the lowest at pH 4 (14%). Later, Sangare *et al.* (2014) reported that AFB1, AFB2 and AFM1 degradation was strongly affected by metals ion, Mg^{2+} and Cu^{2+} behaving as activators and Li^+ , Zn^{2+} , Se^{2+} , Fe^{3+} being strong inhibitors. Also treatments with proteinase K and SDS significantly reduced the degradation activity of the culture supernatant, confirming that proteins or enzymes are involved in the degradation process.

Regarding FB1, Hartinger and Moll (2011) reported that the bacterial aminotransferase encoded by the gene Fum I worked best at low salt concentrations with a wide range of pH (varying from 6 to 10) and temperature (6 to 50 °C). In addition, Peteri *et al.* (2007) reported different optimal temperatures between the enzymatic activity involved in OTA degradation (30°C) and the growth temperature of the enzyme producing microorganism, which is around 20 °C.

4.4. How the knowledge on mechanisms of mycotoxin degradation can be exploited?

4.4.1. Detoxification by specific microbial enzymes

The detoxification of mycotoxins by specific microbial enzymes can represent a suitable strategy to increase feed and food safety (Wu, *et al.*, 2009). However, microbial transformation of mycotoxins using living cells in food and feed industries is limited by

regulatory, toxicological and consumer concerns (He & Zhou, 2010). Industrial production of detoxifying microorganisms involves their growth in large batches with optimal conditions leading to specific enzymatic production, followed by extraction and purification (Upadhaya, *et al.*, 2010). A number of authors have discussed the potential of enzyme additives for mycotoxin detoxification or degradation in the gastrointestinal tract of animals, as well as their possible applications in processing of cereals to prevent and reduce mycotoxin production (Hartinger & Moll, 2011). For example, Heidl *et al.* (2010) provided a basis for the development of an enzymatic detoxification process for FB1 in food and animal feed, especially under oxygen limited conditions, as they are found in ensiled forages or in the intestinal tract of animals. However, part of this degradation process by microbial enzymes requires co-substrates and specific conditions that are not naturally present. Nevertheless, genetic engineering may allow tuning detoxification enzymes into more adapted activities (Hartinger & Moll, 2011, Dobritsch, *et al.*, 2014).

Takahashi-Ando *et al.* (2002) reported a lactonohydrolase encoded by gene *zhd101* from the fungus *Clonostachys sp.*, responsible for ZEN degradation. This enzyme was purified and the entire coding region of *zhd101* was cloned into the heterologous hosts *Schizosaccharomyces pombe* and *E. coli*. Therefore, their approach revealed an important ZEN degradation enzymatic activity. Later, Takahashi-Ando *et al.* (2004) expressed an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene fused to *zhd101* (*egfp::zhd101*) to visually monitor lactonohydrolase protein. While recombinant *E. coli* and transgenic rice calluses exhibited strong EGFP fluorescence and a complete ZEN degradation, recombinant *S. cerevisiae* exhibited poor fluorescence and removed only 75% of ZEN. Based on these results, Igawa *et al.* (2007) expressed *egfp::zhd101* in maize kernels showing a strong reduction in ZEN contamination. Lastly, Popiel *et al.* (2014) reported the first finding of functional ZEN

lactonohydrolase in a recombinant mycoparasite, *Trichoderma aggressivum*. Therefore, an appropriate combination of a candidate host organism and a codon-optimized synthetic gene strategy may contribute significantly to establish a mycotoxin detoxification system for food and feed (Takahashi-Ando, *et al.*, 2004).

In addition, the expression of suitable heterologous genes offers a practical approach for developing microorganisms with endogenous transgenic detoxifying activities. Therefore, the expression of some adapted microbial detoxification genes in plants may be a way to limit the pre-harvest mycotoxin accumulation and protect crop plants from the phytotoxic effects of mycotoxins (McCormick, 2013). From both economic and ecological points of view, the advantages of this strategy are obvious: no chemicals or inocula have to be introduced into agricultural systems. Nonetheless, the main problem with enzymatic inactivation of toxins in engineered crops may be the inaccessibility of the toxins to the degrading enzymes (Karlovsky, 1999). Various detoxifying genes from microorganisms have been expressed in different plants with more or less success as reviewed by Karlovsky (2011) and McCormick (2013). As this is not the objective of this review, they will not be detailed here.

4.4.2. Safe uses of detoxification microbial additives and legislation

A decisive part of the research and potential application of a product intended as food and feed additive is to ensure the control of degradation products and the effects of detoxification on the nutritive and organoleptic properties (Kolosova & Stroka, 2011). The use of microbial transformation to detoxify mycotoxins may overcome certain side-effects of chemical methods without affecting the nutritional value, taste or flavor of the foods and/or feeds (He & Zhou, 2010). In this regard, the European Commission Regulation (EC 386/2009) defined food and feed additives as new functional substances involved in reduction

of mycotoxin contamination by suppressing or decreasing their absorption as well as, promoting mycotoxin degradation and modifying their mode of action. He and Zhou (2010), extensively listed several patented methods for mycotoxin detoxification *e.g.* aflatoxins, fumonisins, beauvericin, trichothecenes, zearalenone, moniliformin, in feed and food matrices. These methods are mainly based on degrading microorganisms and their metabolism products are characterized by their toxicity for the consumers, for the users and for the environment (EFSA, 2005). However, to date few of those are considered suitable to be used as commercial products (Kolosova & Stroka, 2011).

Binder and Binder (2004) isolated and characterized the *Eubacterium* strain BBSH 797 for its capacity to detoxify trichothecenes. Based on these results, Biomin GmbH optimized the microbial growth and the biotransformation activity to develop a commercial product for detoxifying trichothecenes such as DON. Additionally, to enhance the stability of the product during storage and within the gastrointestinal tract, a three steps encapsulation process was implemented (CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01). Results showed that BBSH 797 used as a feed additive could significantly reduce the adverse effects of DON and T2-toxin on dairy cows and growing broilers, respectively.

Duvick et al. (1998a, 1998b, 2002a and 2002b) reported the development and application of fumonisin detoxifying microorganisms *e.g.* *Exophiala spinifera* (ATCC 74269), *Rhinocladiella atrovirens* (ATCC 74270) and the bacterium ATCC 55552. Recently, FUMzyme (BIOMIN GmbH), a fumonisin esterase enzyme-based product intended to degrade fumonisin in feeds for growing pigs has received a positive scientific opinion for its safety and efficiency to transform FB1 into HFB1 (EFSA, 2014). This feed additive is produced from a genetically modified strain of *Komagataella pastoris*. The viable strain and

its recombinant genes are not present in the final product, thus not raising any environmental safety concern deriving from the genetic modification of the production strain.

In conclusion, several researches presently evidenced the current microbial detoxification interest. Moreover, the most recent patents for biological mycotoxin degradation claimed mainly detoxification enzymes, genes and their applications (He & Zhou, 2010). Knowledge in this domain is still limited but new global methods to uncover detoxifying activities in microbial communities will boost the discovery of new microbial solutions. A markedly increased the number of new methods and microbial patents is then expected in the next decade.

4.5. New approaches for microbial screening: Molecular fingerprinting and omic methods

Environmental microorganisms may serve as a source of genes for the identification of mycotoxin degrading enzymes even if the corresponding pure active strains cannot be isolated, which is often the case. Therefore, global approaches based on molecular fingerprinting techniques and in particular high-throughput sequencing or next generation sequencing (NGS) technologies are revolutionizing community analyses, leading the comprehensive study of microbial communities directly in their natural environments. Consequently, the bottleneck linked to microorganism isolation and growing in pure culture is bypassed (Marco, 2010). Thus, allowing a better comprehension of the whole interactions in microbial consortia from diverse animal digestive systems, plant surfaces and agricultural products.

The first studies using such an approach were based on molecular fingerprinting techniques including T-RFLP, DGGE and TGGE (Anderson & Cairney, 2004). They are based on the

amplification of a specific gene with the ribosomal ribonucleic acid (rRNA) genes being the most selected. Hence microorganisms are clustered according to banding patterns and fragment similarities. However only the few most abundant members of the community could be observed and it was difficult to relate banding patterns to changes in particular species or lineages. Overall, fingerprinting methods provide limited information about the microbial community resulting as an approximate method. However they have proved useful for identifying and monitoring the evolution of dominant members from a microbial community (Hamady & Knight, 2009). Waché *et al.* (2009) and Boguhn *et al.* (2010) used the CE-SSCP molecular fingerprinting approach in order to study the impact of naturally DON-contaminated feed on the evolution and dynamic of culture-independent bacterial populations occurring in the intestinal microflora of pigs and ruminants, respectively. Their results suggested an impact of this toxin on the intestinal microbiota. However bacterial diversity and richness indexes were not accurately reported, due to the presence of artifacts and bias in the bacterial estimation which is considered as the main drawback of molecular fingerprinting methods. Using a different approach, Yu *et al.* (2010) monitored the effect of DON on the bacterial population dynamic in chicken intestinal microbiota through a process of selection of bacteria with the ability to transform DON, using PCR-DGGE for checking the simplification of the consortia until a final profile showing only one band. By this way, they successfully identified various DON de-epoxydizing bacteria belonging to *Clostridiales*, *Anaerofilum*, *Collinsella*, and *Bacillus*. More recently, global methods using high throughput sequencing technologies were used to study microbial communities, starting from total DNA (metagenomic) or RNA (transcriptomic) extraction followed by database libraries construction in which genes could be identified and expressed in host microorganisms (vectors) such as *E. coli* and *S. cerevisiae* for prokaryotic and eukaryotic microorganisms,

respectively (Karlovsy, 1999). The main advantage of sequencing studies over fingerprinting one is that sequences can be classified according to taxonomy and function. This can be especially useful for identifying species (or their genes) contributing to differences among communities. In relation to these metagenomic analyses, two main methods have been described for characterizing the microbiome: targeted or whole genome analysis. Targeted approaches are based mainly on the small-subunit ribosomal RNA (rRNA) studies, including the 16S rRNA gene sequences (for archaea and bacteria) and the 18S rRNA gene sequences (for eukaryotes). They are used as stable phylogenetic markers to profile and determine the abundance of each kind of microbe, leading to the analysis of a heterogeneous DNA sample. Therefore, they result in a very affordable strategy since only one gene of each genome is examined (Marco, 2010). Meanwhile, shotgun genome sequencing allow the analysis of the whole microbial community DNA resulting in a better understanding of functions encoded in those genomes (Hamady & Knight, 2009). Recently, Guo *et al.* (2014) researched the interactions between rat gut microbiome and OTA, using the combination of culture-based methods and the two 16S rRNA and whole genome sequencing metagenomic approaches. Using this approach, they comprehensively studied changes in the taxonomic and genetic composition of the gut microbiota at different time points after exposure to OTA. Their results indicated that OTA treatment decreased the gut microbiome diversity. Conversely, the relative abundance of *Lactobacillus* increased considerably. Thus, *Lactobacillus* could be a key genus in response to OTA *in vivo*. Moreover, measured OTA levels decreased during the time but genes involved in OTA were not observed. These results suggested that the main mechanism involved in OTA decrease was absorption rather than hydrolysis. Similarly, Eikmeyer *et al.* (2013) performed a 16S rDNA metagenomic analysis to follow up changes in bacterial taxonomic community profiles in the time course of the grass ensiling process. The relative abundance of *Lactococci* diminished in the course of

fermentations while the proportion of bacteria belonging to the phyla *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* increased. Previous studies based on metagenomic analyses showed that both mycotoxin contamination and microbial inoculants may change the microbiome during fermentation process, resulting conceivable to handle the microbiome for promoting the development of species with mycotoxin hydrolyzing activities.

In addition to its use in metagenomic approaches, the NGS strategy can allow progress in genomics and transcriptomics of isolated mycotoxin degrading microbial strains. Onyango et al. (2014) carried out a *de novo* sequence analysis using HighSeq2000, reporting for the first time the whole genome of the species *Devosia nanyangense* sp. isolated from a contaminated soil. This species was implicated in the complete degradation of DON. To date the elucidation of potential genes involved in DON degradation is still ongoing. In addition, based on a genome-wide transcriptomic approach, Kosawang *et al.* (2014) investigated the molecular basis of ZEN and DON degradation abilities of *Clonostachys* sp. Their results allow deciphering additional new activities implicated in the mechanism of ZEN detoxification. Therefore, they reported for the first time the implication of ABC transporters in ZEN detoxification, which probably transport ZEN or degradation products out from the fungal cell.

Actually, “omic” approaches based on direct total DNA community or target gene amplicon analyses lead to the exploration of species assemblages and ecosystem functions resulting probably in a determinant comprehension of microbiomes and providing new insights into the composition of the whole community of interest (Eikmeyer, *et al.*, 2013). However, according to Guo *et al.* (2014), whilst metagenomic analyses provide the target, the culture- based methods provide the proof. Thus combination of metagenomics and culture-based methods can be considered as two complementary approaches which combination can lead to efficient strategies to find applicable microorganisms for mycotoxin detoxification.

4.6 Conclusions and perspectives

Detoxification of contaminated feed and food is a challenging health issue. In this regard, microbial mycotoxin full detoxification or transformation into less toxic products can now be considered as a feasible approach and the broader source of genes and enzymes that can be used as feed additives or to decontaminate agricultural commodities (McCormick, 2013, Dobritzsch, *et al.*, 2014). In this regard, many enzymes from microbial system have been purified and applied in food and feed industries. Thus, new enzyme products for an effective mycotoxin detoxification can be developed through isolation of the microorganisms from different sources (Zhou, *et al.*, 2008). Moreover, these specific enzymes can be optimized and produced with high yield in microbial cell factories (Hartinger, *et al.*, 2010).

Finally, biotechnological alternatives seems promising tools to study enzymatic activities that detoxify mycotoxins by genetically engineered microorganisms or to create crops (GMOs) producing such enzymes during cultivation (Karlovsky, 2014). However public and scientific concerns related to the use of genetically modified plants as food or feed ingredients make this approach less suitable than others for mycotoxin control (Varga & Tóth, 2005).

Interestingly, the characterization of microbial degradation pathways and the knowledge of microbial genes involved in mycotoxin deactivation lead to evaluate by disrupting key genes, how changes in the ability of microbial candidates will impact their overall fitness (McCormick, 2013). Consequently, “omic” approaches could also provide a new strategy to the global understanding of the microbial detoxification ecology and the role of several microbial consortia in the degradation of mycotoxins.

Axe1 : Devenir de la FB1 au cours de l'ensilage de maïs grain

Chapitre II: *High moisture maize grain ensiling is a process conducive to fumonisin B1 degradation.*

Dans le contexte bibliographique, nous avons cité plusieurs études sur l'occurrence des fumonisines ainsi que l'évolution de leur teneur au cours de procédés fermentaires comme l'ensilage de maïs plante entière (Boudra & Morgavi, 2008, Keller, *et al.*, 2013, Uegaki, *et al.*, 2013, Latorre, *et al.*, 2015). Au-delà de cette présence, plusieurs auteurs ont souligné que la détermination de la quantité totale de fumonisines au sein de cette matrice (maïs et ses produits dérivés) est difficile à cause de la présence de fumonisines dites « masquées » (Park, *et al.*, 2004, Dall'Asta, *et al.*, 2008, Berthiller, *et al.*, 2009, Dall'Asta, *et al.*, 2010, Falavigna, *et al.*, 2012, Bryła, *et al.*, 2016).

Le devenir des fumonisines dans les ensilages de maïs grain est très peu documenté mais selon les observations réalisées par Arvalis Institut Végétal ces dernières années, de forts niveaux de réduction de FB1 (allant jusqu'à 80%) ont été reportés. Ces données soulèvent donc des questions sur la teneur réelle des fumonisines et sur leur évolution au cours de la fermentation du maïs grain.

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à caractériser le devenir des fumonisines et particulièrement de la fumonisine B1 dans les ensilages de maïs grain. Pour cela une approche biochimique a été développée afin de quantifier la FB1 libre et liée au cours de la fermentation. En parallèle, en se basant sur une carte théorique de fragmentation de la FB1, nous avons cherché à caractériser de potentiels métabolites intermédiaires issus de la transformation de la FB1 afin de mieux expliquer la diminution de la FB1 et de pouvoir identifier un métabolite marqueur de la dégradation de la FB1 autre que la HFB1.

Ces analyses ont été réalisées à partir des mini silos préparés au laboratoire avec du maïs grain naturellement contaminé ou non issus de différentes parcelles agricoles et répétées sur deux années de récolte (2011 et 2013).

Cette étude a permis de mettre en évidence une forte réduction de la concentration en FB1 au cours de l'ensilage mais aussi de montrer que cette diminution n'est pas liée à une complexation de la FB1 dans la matrice (fumonisines complexées). Pour examiner ainsi l'hypothèse d'une dégradation par une potentielle activité microbienne, nous avons cherché premièrement des métabolites intermédiaires de dégradation de la FB1 par une souche de levure (ATCC 74269) connue pour sa capacité de dégrader la FB1. Cette analyse a permis d'identifier le métabolite pHFB1 (m/z 564) issu d'une activité microbienne. Finalement, afin d'identifier si des mécanismes similaires peuvent avoir lieu dans les ensilages, nous avons recherché ce métabolite dans les ensilages de maïs. Nos résultats suggèrent la présence des traces de pHFB1 dans les ensilages après quatre mois de fermentation.

En conclusion,

- ⇒ Nous avons confirmé la dégradation de la FB1 au cours de l'ensilage de maïs grain allant jusqu'à 20,9 nmol, cette diminution n'est pas expliquée par la présence de la fumonisine complexée, dosée sous la forme de HFB1 après hydrolyse. En effet, quel que soit l'ensilage nous observons des niveaux plus ou moins stables de HFB1 pendant quatre mois de fermentation. Ces résultats suggèrent donc que la fumonisine présente dans les ensilages de maïs grain est dégradée produisant ainsi des métabolites intermédiaires tels que le pHFB1. Cependant des études supplémentaires sont nécessaires pour l'élucidation de ces métabolites afin d'optimiser le mode d'extraction et d'analyse de ces molécules car l'ensilage de maïs est une matrice complexe dont l'effet matrice sur l'analyse est considéré comme non négligeable.
- ⇒ Nous avons observé des traces du métabolite partiellement dégradé pHFB1 de façon préliminaire. Cette approche est une première base pour la mise en évidence d'un métabolite marqueur de la dégradation de la toxine dans les ensilages de maïs grain autre

que la HFB1. Il est pertinent de mettre en place une extraction et une purification ciblée de cette molécule.

⇒ Finalement, nous avons pu caractériser différents lots d'ensilage pour leur niveau de dégradation de la FB1, ce qui nous a permis de choisir des ensilages plus ou moins dégradants afin de décrypter les agents microbiens qui peuvent expliquer cette dégradation.

Les résultats et discussions englobant ce premier chapitre sont présentés dans l'article « HIGH MOISTURE MAIZE GRAIN ENSILING IS A PROCESS CONDUCTIVE TO FUMONISIN B1 DEGRADATION » soumis dans le journal Toxins, reproduit ci-dessous.

Toxins **2015**, 7, 1-x manuscripts; doi:10.3390/toxins70x000x

toxins

ISSN 2072-6651

www.mdpi.com/journal/toxins

Article

High moisture maize grain ensiling is a process conducive to fumonisin B1 degradation

Ccori Martinez Tuppia^{1,2}, Vessela Atanasova-Penichon², Sylvain Chéreau², Nathalie Ferrer², Gisèle Marchegay², Mathieu Castex¹, Jean-Michel Savoie², Florence Richard-Forget^{2*}

¹ Lallemand S.A.S, 19 rue des Briquetiers, B.P. 59, F-31702 Blagnac, France; E-Mail: ccori.martinez@bordeaux.inra.fr (C.M.T.); mcastex@lallemand.com (M.C.)

² INRA UR1264 MycSA, 71 avenue Edouard Bourleaux, CS20032, 33882 Villenave d'Ornon, France; E-Mails: vatanaso@bordeaux.inra.fr (V.A.-P.); sylvain.chereau@bordeaux.inra.fr (S.C.) ; nathalie.ferrer@bordeaux.inra.fr (N.F.) ; marchega@bordeaux.inra.fr (G.M.) ; savoie@bordeaux.inra.fr (J.-M.S)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: fforget@bordeaux.inra.fr;

Tel.: +33-557-12-24-83; Fax: +33-557-122-500

Academic Editor:

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: Use of high moisture maize grain silages in diets of ruminants and monogastric animals has significantly increased in Europe during the past decade. What happens to field mycotoxins accumulated in grains during ensiling has however never been documented. Laboratory scale silos were used to study the fate of fumonisin B1

(FB1) during fermentation of high moisture maize grain silages, assessing both free and associated to the matrix FB1 forms. Our results showed that, whatever the initial amount of FB1 in maize grains, the concentration of matrix-associated FB1 did not change significantly while a significant decrease in free FB1 content occurred. It reached as much as 93% after 4 months of fermentation in certain silages. The stability of matrix-associated FB1 together with the detection of partially hydrolysed FB1 in some fermented samples indicated that the free FB1 decrease was mainly due to degradation processes. Overall, our data suggest that high moisture maize grain ensiling can be a way to reduce FB1 contamination in feed.

Keywords: mycotoxins, silage, biodegradation.

1. Introduction

Maize silage is a main source for monogastrics and cattle feeding in Europe. Ensiling process is based on the fermentation of whole crop plant or maize grains. During the last decade, the ensiling of high moisture maize grains has become more ubiquitous in Europe. This ensiling process requires the use of maize grains harvested shortly after the physiological maturity stage with a moisture content ranging between 27 to 32%. Harvested grains are ground and thoroughly stored compressed in sealed plastic containers. High moisture maize grain ensiling can be easily processed on farms and is an economical feed due to elimination of the cost of grain drying. Moreover, high moisture maize grain silages are characterized by a higher starch digestibility and nutritional value when compared to dry grain silages and are reported as an excellent feed for ruminants (Persichetti Júnior, *et al.*, 2014). In France, high moisture maize grain silage can reach as much as 50 to 75% of the daily feed ration in pork and poultry breeding (Arvalis Institut du Végétal, personal communication).

Maize is particularly prone to pre-harvest contamination with mycotoxins among which fumonisins are dramatically worrying in regards to feed safety and animal exposure (Marasas, 1995, Gonzalez Pereyra, *et al.*, 2008). Fumonisins are mainly produced by *Fusarium proliferatum* and *F. verticillioides* which are the two major fungal actors of *Fusarium* ear rot, one of the most common diseases of maize. There are at least 28 different forms of fumonisins, classified as belonging to class A, B, C, and P. Fumonisin B1 (FB1) is the most common and economically important form, followed by B2 (FB2) and B3 (FB3). FB1 is a polyhydroxy alkyl amine, esterified on C14 and C15 with 2 molecules of tricarballic acid. Fumonisins are mostly produced during pre-harvest (Picot, *et al.*, 2011) and contaminations should be addressed as early as possible in the supply chain, especially at the growing stage. However, FB1 can also be produced accidentally during post-harvest storage. To date, prediction tools, recommended agricultural practices and control strategies are not effective enough to guarantee full control of FB1 levels in growing crops and compliance of maize harvests with European official contamination thresholds (EC number 1126/2007).

Most of studies addressing the issue of silage contamination with mycotoxins have considered whole maize plant silage (Boudra & Morgavi, 2008, Uegaki, *et al.*, 2013, Latorre, *et al.*, 2015). In the recent review of Gallo *et al.* (2015) that evidences the risk of ruminant exposure to mycotoxins through feed, more than half of the references were on whole-crop forage maize silage. By gathering data issued from surveys published in the last decade, Gallo *et al.* (2015) also show the frequent contamination of maize silages with FB1, with maximum values of concentration that can reach as much as 26200 g/kg. To our knowledge, no data are available concerning high moisture maize grain silage. Well-controlled practices leading to

anaerobic conditions and acidity prevent the development of fungi and the production of mycotoxins during the ensiling of maize, but a poor management during silage procedures can result in excessive moisture and heating, two parameters conducive to the growth of toxigenic filamentous fungi (Richard, *et al.*, 2007, Keller, *et al.*, 2013, Uegaki, *et al.*, 2013). Moreover several authors have evidenced that maize ensiling process conditions can result in a decrease in the concentrations of some mycotoxins. Boudra and Morgavi (2008) demonstrated that ensiling maize with low dry matter and increased length of storage can lead to a significant decrease of deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone concentrations. These data were recently supported by the conclusions of Keller *et al.* (2013) who reported a decrease in fumonisins, deoxynivalenol and ochratoxin levels during maize fermentation. Decrease in the concentrations of some mycotoxins during the ensiling process can be ascribed to two major mechanisms, sorption and enzymatic degradation, both of which can involve biological systems. On one hand, sorption can result from the binding of mycotoxins with cell wall components of microorganisms, including lactic acid bacteria and yeast, which is largely documented in the literature (Niderkorn, *et al.*, 2006, Dalié, *et al.*, 2012). As regards to fumonisins, Niderkorn *et al.* (2009) have shown that peptidoglycans of lactic acid bacteria were the most likely carbohydrates involved in FB1 binding process. On the other hand, mycotoxin binding can involve the formation of covalent bonds with maize components or the physical entrapment of the toxin into maize macromolecules such as starch (Berthiller, *et al.*, 2012). Occurrence of these two types of interactions with the maize matrix has been strongly suggested for FB1. Several reports have indicated the possibility of covalent bond formation between the tricarballic groups of FB1 and hydroxyl groups of carbohydrates or amino acids (Kim, *et al.*, 2003, Dall'Asta, *et al.*, 2008, Oliveira, *et al.*, 2015, Bryła, *et al.*, 2016) and also the possibility of physical interactions between FB1 and matrix macromolecules (Dall'Asta, *et al.*, 2009). Since bound or entrapped into macromolecules forms of fumonisins elude to

conventional analytical procedures, they have been commonly designed as hidden or masked fumonisins (Berthiller, *et al.*, 2012). But, according to Rychlik *et al.* (2014), the term matrix-associated fumonisin can be more suitable to encompass all possible forms of interactions, both physical ones and covalent bonds. Fermentation during high moisture maize grain silages leads to physicochemical changes in the maize matrix and development of microorganisms that can favour the sequestration of mycotoxins and result in an underestimation of FB1 content. A specific procedure is therefore required when addressing the whole content of FB1 that includes both free and matrix-associated forms.

In addition to sorption, decrease of mycotoxin concentrations during maize ensiling can be the result of microbial degradation. The occurrence of microorganisms with a significant capacity of degrading mycotoxins has been the subject of several publications (Duvick, *et al.*, 1998, Karlovsky, 1999, Jard, *et al.*, 2011, McCormick, 2013). As regards to FB1, bacteria and fungi that have been so far reported as able to degrade the toxin have been mainly isolated from field grown maize stalk (Duvick, *et al.*, 1998, Blackwell, *et al.*, 1999), soil (Benedetti, *et al.*, 2006). According to Camilo *et al.* (2000), maize silage can also be an interesting source of FB1 degrading microorganisms. The first step of FB1 degradation through microbial activities is a decarboxylation reaction that cleaves the two tricarballic acid side moieties from C14 and C15 of the main chain and converts FB1 to hydrolyzed fumonisin B1 (HFB1) (Heinl, *et al.*, 2010, Heinl, *et al.*, 2011). Occurrence of partially hydrolyzed (pHFB1) and hydrolyzed metabolites of FB1 in some maize products was recently reported by De Girolamo *et al.* (2014), suggesting the possibility of FB1 degradation reactions in maize products.

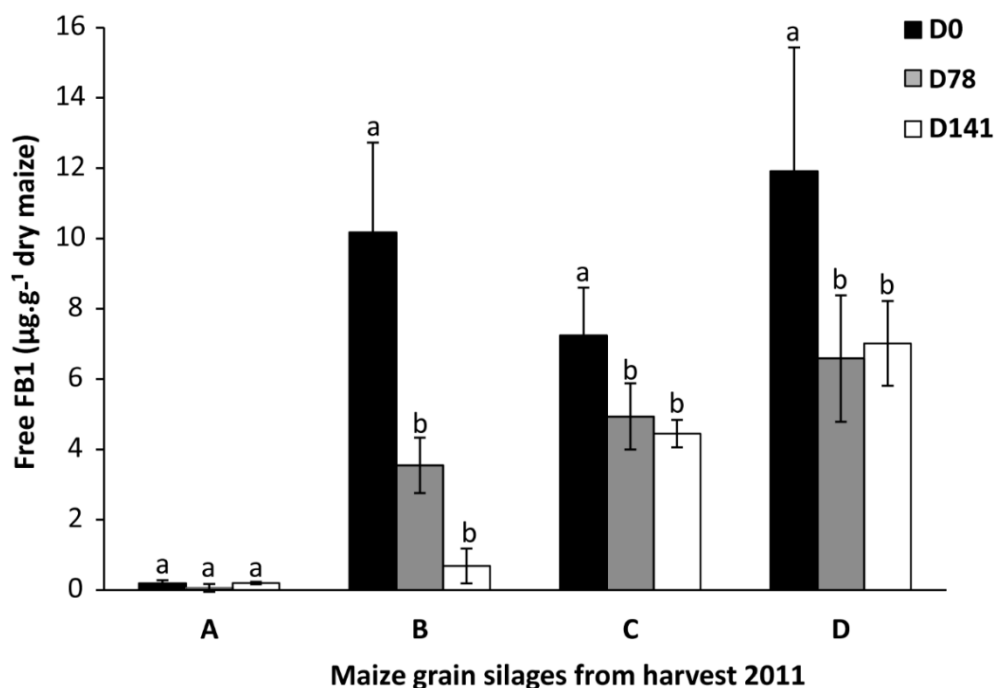


Figure II.1: Evolution of free FB1 concentration during maize grain ensiling (D0, D78, D141). Data are means $\pm$ standard deviation using three analytical replicates. Different letters designate statistically significant differences between data from a same silage ($\alpha = 0.05$).

Table II.1 : Evolution of free FB1 and matrix-associated FB1 in silages processed with maize harvested in 2013 and percentage of matrix-associated FB1 at day 0.

Silage	Free FB1, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		Matrix-associated FB1, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		% of matrix-associated FB1 at day 0 ^a
	Days after fermentation		Days after fermentation		
	0	141	0	141	
E	22.2 ± 2.0	7.8 ± 0.5	5.3 ± 0.1	5.0 ± 0.3	19.3
F	16.3 ± 0.8	7.5 ± 0.6	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1	5.2
G	20.3 ± 2.4	5.1 ± 2.0	8.9 ± 0.5	8.5 ± 0.3	30.5
H	9.9 ± 0.9	2.4 ± 0.5	3.4 ± 0.3	4.6 ± 0.3	25.6

^a Percentage of matrix-associated FB1 at day 0 calculated according to the formula : matrix-associated FB1/(matrix-associated FB1+ free FB1)*100. Data are means $\pm$ standard deviations using three analytical replicates.

In view of the scarcity of information concerning the issue of mycotoxins in maize grain silages, the aim of this study was to establish the dynamics of FB1 concentration during high moisture grain ensiling processes and investigate mechanisms potentially involved in FB1 instability.

2. Results

2.1 Dynamics of free FB1 in high moisture maize grain silages

Dynamics of free FB1 content in high moisture maize grain silages, processed in experimental mini-silos, are reported in Figure 1. Maize samples were harvested in 2011 in the southwest of France and selected according to their level of free FB1 contamination. At day 0, three of the four maize grain silages showed high levels of toxin, with contamination values ranging from 7 to 11.9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of maize. As expected, silage A, which was initially prepared with grains from non-contaminated plants, exhibited a low level of FB1, close to 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Contaminated silages B, C and D showed a significant decrease in free FB1 concentration after 78 days of ensiling. The decrease during the following 63 days was not significant. The rates of decrease in free FB1 concentrations were different, depending on the considered silage. During fermentation of silage B, a drastic decrease of free FB1 content was observed, attaining 93% after 141 days. The percentage of free FB1 loss at the end of the process reached 41% for silage D, it was close to 38% in silage C. The same experiment was repeated with maize grains harvested in 2013 from four different fields showing symptoms of *Fusarium* ear rot. Assessment of free FB1 in 2013 high moisture maize grain silages supports the occurrence of situations conducive to a consequent reduction of free FB1 during fermentation (Table1). In addition, it should be noted that, whatever the considered silage and

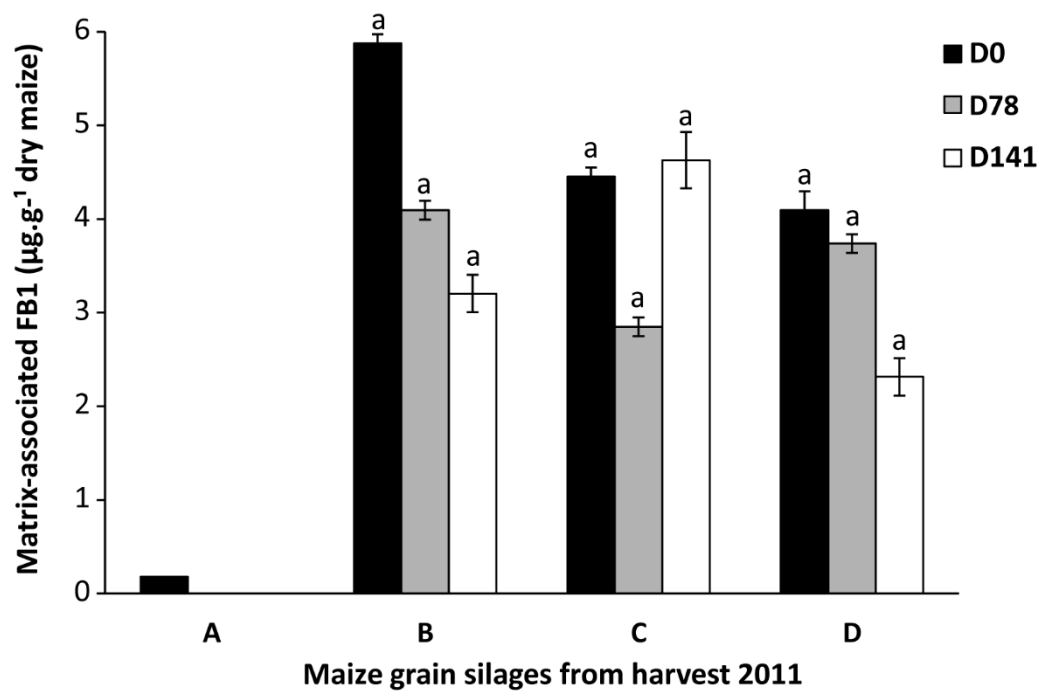


Figure II.2 : Evolution of matrix-associated FB1 concentration during maize grain ensiling (D0, D78, D141). Data are means $\pm$ standard deviation using three analytical replicates. Different letters designate statistically significant differences between data from a same silage ($\alpha = 0.05$).

day of fermentation, the occurrence of free HFB1 was never highlighted in the LC-MS chromatograms.

2.2 Dynamics of matrix-associated FB1 in high moisture maize grain silages

To investigate the mechanisms that could explain the previously observed decrease in free FB1, matrix-associated forms of FB1 were extracted and analysed using the procedure reported in material and methods part of this article (Figure 4). Data obtained for mini-silo silages achieved with maize harvested in 2011 are summarized on Figure 2.

Alkaline hydrolysis of the pellets issued from the extraction of free FB1 resulted in measurable amounts of HFB1, which indicated the occurrence of matrix-associated forms of FB1. HFB1 concentrations were used to estimate matrix-associated FB1 concentrations by applying a coefficient factor equal to the ratio of the molecular weights of FB1 and HFB1, close to 1.8. Using this method, the estimated amounts of matrix-associated FB1 in non-fermented grains ranged between 4 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for silage D and 6.3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of maize for silage B. When compared to total FB1 levels (free FB1 + matrix-associated FB1), the amounts of matrix-associated FB1 accounted for significant percentages: 25% in silage D and 40% in silages B and C. The concentrations of matrix-associated FB1 decreased weakly during the ensiling process, but the differences were not statistically significant. The same analyses were performed for the silages processed with maize grains harvested in 2013. As reported in Table 1, data on the dynamics of matrix-associated FB1 in two of the 2013 silages support the results obtained with 2011 silages, suggesting that the fermentation process did not favour the sequestration of FB1 within the maize matrix. However, opposite results were obtained with silages F and H that showed a weak but statistically significant increase in matrix-associated FB1 during the ensiling process.

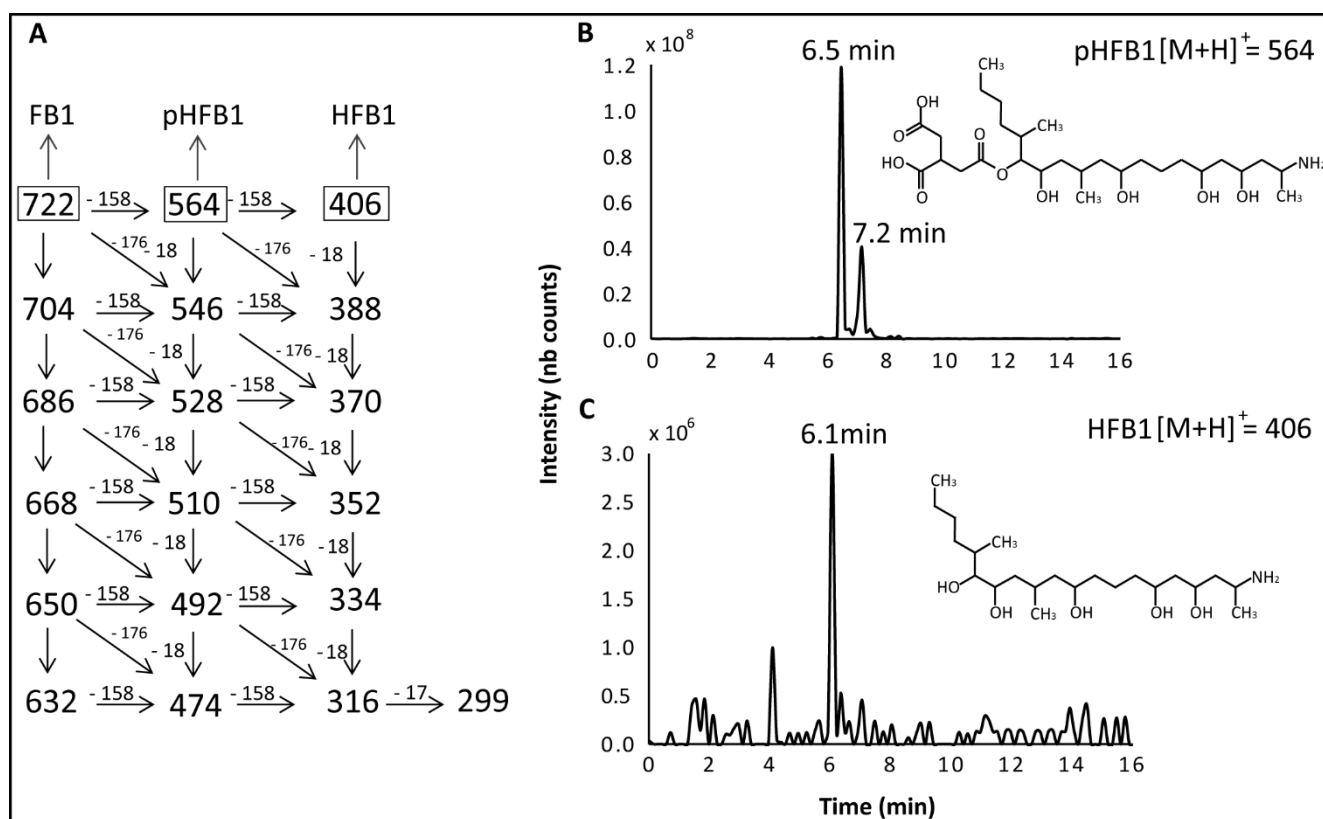


Figure II.3: Search of FB1 metabolites in ATCC 74269 broth supplemented with FB1. 3A: Theoretical fragmentation chart of [FB1+H]⁺ proposed by Bartók *et al.* (2006). 3B and 3C: Mass chromatograms extracted at *m/z* 406 and *m/z* 564 from the total ion current chromatogram corresponding to 48h old broths. X-axis: run time (min); Y-axis: signal intensity (counts).

Taken together, our results on the dynamics of free and matrix-associated FB1 in high moisture maize grain silages demonstrate that for most of the samples, the decrease in free FB1 during fermentation cannot be ascribed to sorption mechanisms since no increase in matrix-associated FB1 forms was highlighted. For two silage samples (F and H) which show an increase in matrix-associated FB1 concentration after 141 days of fermentation, this increase was close to $0.54 \mu\text{g.g}^{-1}$ of maize for silage F and $1.26 \mu\text{g.g}^{-1}$ for silage H and clearly does not wholly explain the decrease in free FB1 concentration (8.8 and $7.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ of maize for silages F and H, respectively). According to our data, we can conclude that the decrease of free FB1 concentrations occurring during the ensiling process of high moisture maize grains results from a degradation process.

2.3 Search for hydrolysed metabolites of FB1 in high moisture maize grain silages

Assuming the hypothesis that the measured FB1 disappearance in high moisture maize grain silages results from a degradation process that can involve biological activities, further analyses were performed to highlight the occurrence of FB1 metabolisation products in silages. LC-MS analyses were implemented and the theoretical FB1 fragmentation chart proposed by Bartók *et al.* (2006) (Figure 3A), used throughout these studies. To acquire references on FB1 metabolites, that with the exception of HFB1 are not commercially available, and be able to putatively assign the peaks observed on LC-MS chromatograms of silage extracts, a first step exploiting the ability of the patented ATCC 74269 yeast to degrade FB1 was completed. Broth composition of ATCC 74269 cultivated in the presence of FB1 was analysed and the presence of the 18 metabolites reported in the FB1 fragmentation chart (Figure 3A) was investigated by extraction of chromatogram from the total ion current of corresponding ions. Positive results were obtained for m/z 564 and m/z 406 in addition to m/z 722 that corresponds to FB1. When considering m/z 564, two major peaks eluted at 6.5 and

7.2 min were highlighted (Figure 3B). We putatively assigned these two peaks to isomers of pHFB1, which corresponds to a partially hydrolysed form of FB1 characterized by the loss of one tricarballic group. In m/z 406 ion extraction chromatogram, one peak was visualized and ascribed to HFB1, which was confirmed by the use of HFB1 standard. These data were further used to re-examine the LC-MS chromatograms associated with maize grain silage extraction. While no peak corresponding to HFB1 was detected for any of the eight considered silages whatever the time of fermentation, mass chromatograms extracted at m/z 564 from total ion current allowed us detecting the potential occurrence of pHFB1 in silages C and D after 141 days of fermentation. These data are in agreement with the possible presence of microbial activities able to degrade FB1 in C and D maize grain silages. For the other panel silages, the demonstrated degradation of FB1 and the impossibility to detect any FB1 metabolites using the procedure we developed can suggest that FB1 degradation was more efficient leading to products characterized by m/z values lower than 406, which were not highlighted in silage chromatograms, certainly due to the occurrence of a high background signal.

3. Discussion

The dynamic of mycotoxins during fermentation process in whole plant maize silages has been reported by several authors (Boudra & Morgavi, 2008, Gonzalez Pereyra, *et al.*, 2008, Keller, *et al.*, 2013, Uegaki, *et al.*, 2013, Latorre, *et al.*, 2015) leading to contradictory results. As regards FB1, while Boudra and Morgavi (2008) reported a significant decrease in free FB1 concentrations that could reach as much as 90% in three month-old whole plant silages, the results described by Uegaki *et al.* (2013) and Latorre *et al.* (2015) support the stability of free FB1 concentrations in well-managed whole plant silages even after eight

months of storage. Here, for the first time, the fate of FB1 during high moisture maize grain ensiling was addressed. The results evidence a significant reduction of free FB1 ranging from 38% to 93% after four months of fermentation.

According to literature data, two major processes can explain these significant rates of reduction: sorption and enzymatic degradation (Karlovsky, 1999, Niderkorn, *et al.*, 2006, Dalié, *et al.*, 2012, McCormick, 2013). While the enzymatic degradation of the mycotoxin can result in non-toxic molecules and give the guarantee of a lower risk to livestock, this is not the case with sorption processes. Indeed, mycotoxin complexes that can be formed with grain components before harvest through both the activity of the producing toxigenic fungus or the plant metabolism (Bryła, *et al.*, 2016) or during silage fermentation with the grain matrix or bacterial peptidoglycans (Niderkorn, *et al.*, 2009), are not necessary stable after ingestion and the mycotoxin can be released in the gastrointestinal tract of livestock (Jard, *et al.*, 2011). Several reports describe the occurrence of matrix-associated forms of FB1 in maize. These matrix-associated forms can result either from covalent interactions between the FB1 tricarballic moieties and hydroxyl groups of maize carbohydrates or amino-acids, esterification with fatty acids, or from physical entrapment of FB1 in maize macromolecules such as starch and proteins (Seefelder, *et al.*, 2003, Park, *et al.*, 2004, Berthiller, *et al.*, 2012, Bryła, *et al.*, 2016). Due to this presence of both covalently and non-covalently bound FB1, the conventional toxin extraction methods are often inefficient to estimate the total FB1 content in maize and an alkaline hydrolysis step was proposed by several authors (Dall'Asta, *et al.*, 2008, Dall'Asta, *et al.*, 2010, De Girolamo, *et al.*, 2014, Latorre, *et al.*, 2015, Oliveira, *et al.*, 2015, Bryła, *et al.*, 2016) for taking into account the amount of matrix-associated forms of FB1. When performing alkaline hydrolysis, several effects are expected, including disruption of the secondary and primary structure of maize macromolecules involved in the

toxin complexation and release of the sequestered toxin, and cleavage of the FB1 side chains and elimination of carboxylic groups that are potential sites of covalent modification (Bryła, *et al.*, 2016). The cleavage of FB1 side chains gives rise to HFB1, the amount of which is used to quantify the whole FB1 content (Dall'Asta, *et al.*, 2008).

In the present work, the procedure defined for FB1 assessment in whole plant maize silage (Latorre, *et al.*, 2015) was slightly modified and an analytical strategy was implemented for investigating the dynamics of whole FB1 forms (free and matrix-associated forms) during ensiling of high moisture maize grains. Significant amounts of matrix-associated FB1 were detected for any of the considered silages and any of the fermentation times. At day 0 before the ensiling process, the rates of matrix-associated FB1 forms in high moisture grains were similar to those reported by Oliveira *et al.* (2015) and Latorre *et al.* (2015) in raw maize and whole-crop forage maize silages, respectively. In the present work, ratios of matrix-associated FB1 to free FB1 varied from 0.05 to 0.7 in non-fermented maize grains and never reached values higher than one. Such high values were however reported by Bryła *et al.* (2016) for different maize products and mainly for thermally processed products. According to our data, matrix-associated FB1 quantities exhibited a relative stability during ensiling of high moisture maize grains, corroborating the previous results of Latorre *et al.* (2015) for whole-crop forage maize silage. This observation suggests that maize fermentation is not a process conducive to significant formation of FB1 complexes with the maize matrix and microorganisms developing during the process. Nevertheless, this stability indicates that the decrease in free FB1 concentration observed in high moisture grain maize silage cannot be ascribed to a sorption mechanism or generation of covalently matrix associated forms.

Eliminating matrix association as an explanation of the decrease in FB1 quantities measured after 4 months of ensiling, our observations strongly suggest the occurrence of microbial activities able to degrade FB1. Indeed, during the two last decades, numerous reports have demonstrated that some microorganisms produce enzymes that could alter the structure of mycotoxins (Karlovsky, 1999). Few of these microorganisms were isolated from maize products and fermented products (Duvick, *et al.*, 1998, Blackwell, *et al.*, 1999, Camilo, *et al.*, 2000). For confirming the hypothesis of a decrease of FB1 concentration due to a biodegradation process, FB1 metabolites were searched in the high moisture maize grain silage samples. The potential occurrence of a partially hydrolysed form of FB1 (pHFB1) in some silage samples was highlighted, while no silages were shown to contain detectable HFB1. This lack of free HFB1 in fermented maize grains, also reported by Latorre *et al.* (2015) for whole plant silages, could indicate an uncomplete hydrolysis of FB1 (corroborated by the presence of pHFB1) or a more advanced degradation of FB1 that does not end after completion of hydrolysis. Even though further developments are still required to advance in the detection and quantification of FB1 metabolites in silage samples, our results support the occurrence of microorganisms able to degrade FB1 in maize grain silages. Thus, this kind of matrix could represent a reservoir for identification of new candidates able to biotransform FB1. Up to now, while several authors have identified some bacterial or yeast strains that, when cultivated in the presence of FB1, induce a decrease in FB1 amounts (Camilo, *et al.*, 2000, Mokoena, *et al.*, 2005, Niderkorn, *et al.*, 2007), few studies have evidenced their ability to degrade FB1 in less toxic compounds. A black yeast *Exophiala spinifera* (ATCC74269) isolated from maize tissues and grains (Duvick, *et al.*, 1998, Blackwell, *et al.*, 1999) and a bacterial strain ATCC 55552 isolated from field grown maize stalk (Heinl, *et al.*, 2010, Heinl, *et al.*, 2011) are certainly the microorganisms most studied for their ability to degrade FB1, which involves a two-step procedure: hydrolysis of FB1 to HFB1 by a carboxylesterase and

deamination of HFB1 by an amino oxidase or an aminotransferase (Duvick, *et al.*, 1998, Blackwell, *et al.*, 1999, Heintl, *et al.*, 2010, Heintl, *et al.*, 2011). Unfortunately, these strains are not adapted to the ensiling conditions and there is still a need to identify new sources of FB1-metabolizing strains. Maize grain silages could be one of these new sources.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and reagents

FB1 and HFB1 standard solutions were purchased from Biopure (Tulln, Austria). All chemicals salts and solvents used (LC grade) were purchased from VWR. Bidistilled water was produced in our laboratory utilizing an Alpha-Q system (Milipore, Marlborough, Ma, USA).

4.2 Maize samples and mini-silos preparation

Fusarium contaminated (presenting ear rot symptoms) and sound (with no ear rot symptoms) maize cobs were collected from different fields located in the southwest of France during two years of harvest (2011 and 2013). Maize grains were separated from cobs and coarsely ground.

Experimental mini-silos were prepared using different proportions of contaminated and sound maize in 2011, and using contaminated grains supplied by four different growers in 2013. Three kg of each mixture were ensiled in hermetically closed PVC tubes (10 cm diameter, 50 cm high), leading to mini-silos A, B, C, D (harvest 2011) and E, F, G, H (harvest 2013). The silos were placed in a room with temperatures varying from 18 to 25 °C

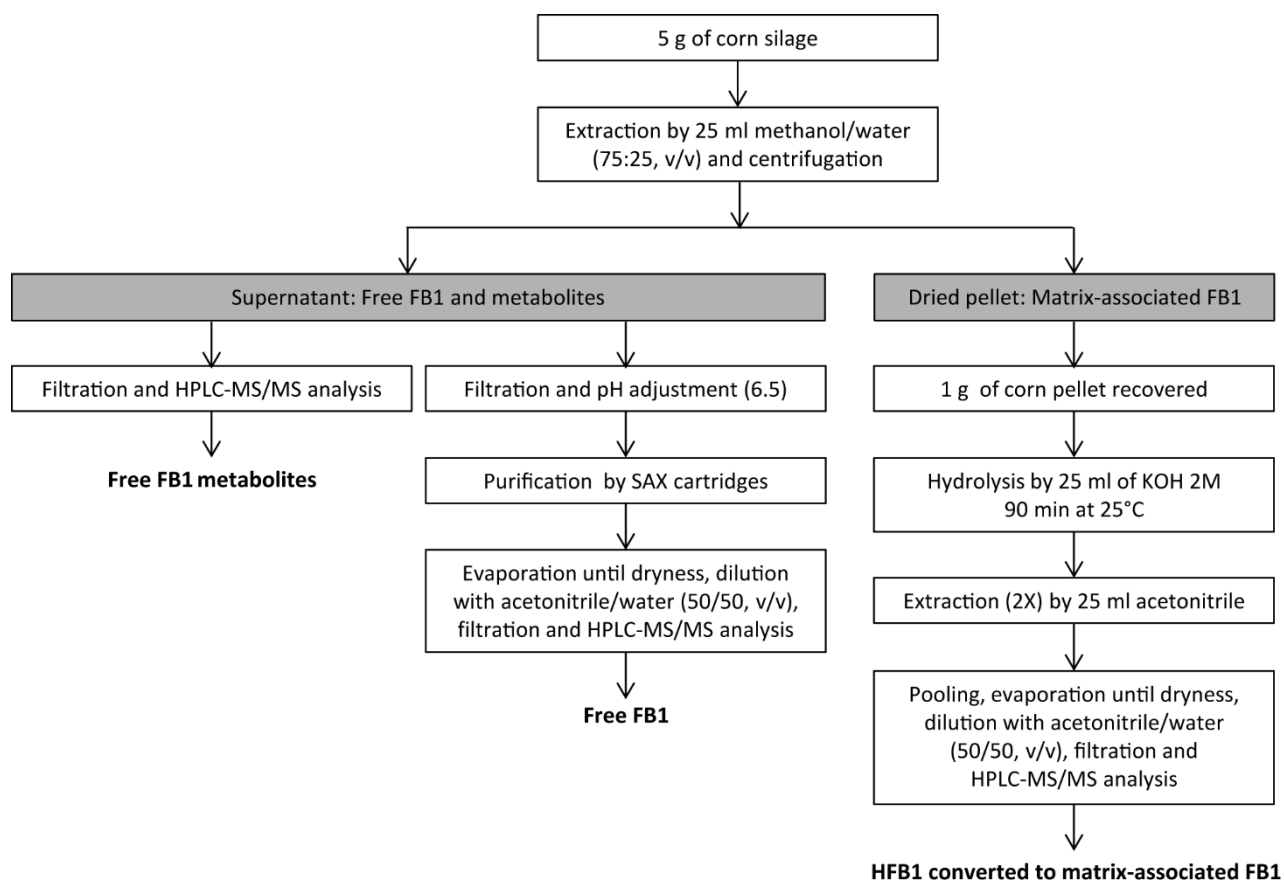


Figure II.4 : Flow chart of the analytical procedure used to quantify free and matrix-associated FB1 in maize silage

throughout the silage process. Mean moisture content in mini-silos was 33% and 30% from maize harvested in 2011 and 2013, respectively. A, B, C and D silages were analysed at three fermentation time points: day 0, day 78 and day 141 (D0, D78 and D141). The dates were chosen to be at the end of the fermentation phase (D78) and during the storage phase (D141). E, F, G and H silages were analysed at day 0 and day 141. At each sampling time, one mini-silo per type of silage was collected. Once silos were opened, three samples of 200 g from different silage sections were milled, lyophilized and stored until fumonisin analysis. The mini-silo devices gave rise to homogeneous fermentation processes with decreased values of pH from 5.5-6.2 at D0 to 4.3-4.5 at D78. Counting of cultivable microorganisms by suspension-dilution of specific media did not reveal the presence of fungal contamination in mini-silos opened at D78 and D141, whereas lactic acid bacteria and yeasts were isolated.

4.3 Definition of an analytical procedure to assess the whole fumonisin content in high moisture maize grain silages

The procedure we propose to assess the whole fumonisin content in high moisture maize silage is summarized on Figure 4. Briefly, after a first extraction step using a MeOH/H₂O mixture, the resulting supernatant was used to quantify free FB1 and metabolites resulting from FB1 degradation. FB1 remaining in the pellet represents matrix-associated mycotoxin as defined by Rychlik *et al.* (2014). Matrix-associated FB1 was released from the maize matrix under the form of hydrolysed fumonisin (HFB1) after alkaline hydrolysis. This protocol allows quantifying the total FB1 that will be expressed by the sum of free FB1 and matrix-associated FB1. Extracted FB1 and HFB1 were analysed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry as previously used by several authors (Dall'Asta, *et al.*, 2008, Dall'Asta, *et al.*, 2010, Latorre, *et al.*, 2015).

4.4 Extraction and purification of free FB1

Extraction of FB1 was performed using the protocol of Picot *et al.* (2011) with some modifications. Briefly, 5 g of finely ground and lyophilized maize were agitated with 25 mL of methanol/water (75:25, v/v) for 15 min. After centrifugation, filtrates were adjusted at pH 6.5 and 5 ml were purified using Bond Elut Strong anion exchange (SAX) cartridges (Varian, Palo Alto, CA). Fumonisin were eluted with 10 ml of methanol/acetic acid (99:1, v/v), which was evaporated to dryness under a nitrogen stream at 60 °C. Dry samples were dissolved in acetonitrile/water (50:50, v/v), filtered through a 0.22 µm nylon filter and analysed by LC-MS as described below.

4.5 Alkaline hydrolysis for matrix-associated FB1 analysis

Matrix-associated fumonisins were extracted according to the method proposed by Dall Asta *et al.* (2008) with some modifications. After extraction of free FB1, the residue of ground maize was dried overnight. Then, aliquots (1 g) were subjected to alkaline hydrolysis (25 mL 2M KOH, 25 °C, 90 min) and followed by a twice liquid/liquid extraction with 25 mL acetonitrile. The organic phases were recovered, pooled and evaporated to dryness using a rotavapor (BÜCHI Rotavapor R-200) at 25 °C. The final precipitates were dissolved in 2 mL of acetonitrile/water (50:50, v/v) and filtered through a 0.22 µm nylon filter before LC-MS analysis. Extractions of free and matrix-associated FB1 were performed in triplicate.

4.6 Characterization of FB1 metabolites using the ATCC 74269 model yeast strain

The ATCC 74269 yeast strain patented for its ability to convert FB1 into HFB1 was used to examine the presence of FB1 hydrolyzed metabolites in silage samples. The yeast was inoculated in a minimum medium (Molnar, *et al.*, 2004) supplemented with 25 µg.mL⁻¹ FB1.

Table II.2 : Retention time and compound dependent parameters for LC-MS analysis of free FB1 and HFB1 in maize silages.

Compound	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)[M+H]⁺	Product ions (m/z)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Cell exit potential (V)
FB1	8.9	722.4	334.4/352.3	121	45/49	6/6
HFB1	6.1	406.4	388.3/370.3	121	23/23	16/16

Yeast culture was stopped at two incubation time points (0 h and 48 h) and filtered through a 0.22 µm nylon filter before LC-MS analysis. The metabolites identified in the theoretical fragmentation chart of [FB1+H]⁺ proposed by Bartók *et al.* (2006) were searched in specific mass chromatograms extracted from the total ion current chromatogram.

4.7 LC-MS analysis

LC-MS analyses were performed using a QTrap 2000 system (Applied Biosystems, France) equipped with a TurboIon Spray ESI source and coupled to an 1100 Series HPLC system (Agilent, France). Chromatographic separation was performed on a Kinetex XB- C18 100 A column (150 x 4.6 mm, 2.6 µm) (Phenomenex, France). The mobile phase consisted of 0.1 % formic acid in water (v/v) (solvent A) and 0.1% formic acid in methanol (v/v) (solvent B) according to the following gradient: 50 to 70% B in 11 min, 70% B for 4 min, 70 to 50% B in 1 min and kept at 50% B for 7 min (post-run reconditioning). The flow rate was kept at 0.7 mL.min⁻¹ and 0.35 mL.min⁻¹ went to the electrospray source. The column temperature was 45 °C and injection volume was 5 µL. LC-MS analyses were carried out using two monitoring modes: MRM mode for FB1 and HFB1 quantification and fullscan mode for samples qualitative analysis.

Full scans were acquired in the range of *m/z* 50-1000 in positive ESI mode. The electrospray interface was used at 420 °C with following settings: auxiliary gas, 60 p.s.i.; ion spray voltage, 4500 V; declustering potential, 30 V, entrance potential, 10 V; collision energy, 10 eV; collision-activated dissociation gas, medium.

Concerning MRM mode, quantification was performed by monitoring two transitions for each analyte, the primary transition was used for quantification and the second transition was used for identification (Table 2). In the particular case of HFB1, to avoid

misidentification because of the poor specificity of MRM transitions, the absence of matrix artefacts was checked in the non-contaminated silage A samples at 3 time points of fermentation. Quantification was performed by external calibrations with standard solutions of FB1 and HFB1 prepared from commercial pure solutions ranging from 1 to 5000 ng.mL⁻¹.

4.7 Data and statistical analyses

Results of free FB1 and matrix-associated FB1 concentration at different time points of fermentation (D0, D78 and D141) were reported as mean concentration values ($\pm$ SD) of three analytical repetitions corresponding to three extractions per sample. Differences between the three fermentation time points for each silage sample were determined with multiple comparisons test using the Duncan method. Levels of significance were set at $\alpha = 0.05$.

5. Conclusion

Using experimental mini-silos filled with various batches of grain from two cropping years, we evidenced that high moisture maize grain silages lead to conditions conducive to FB1 concentration decrease that cannot be explained by matrix-association mechanisms. The occurrence of fumonisin-metabolizing fermentative microorganisms in high moisture maize grain silages is highly probable. Additional studies are currently undertaken to identify these interesting microorganisms. Since microbial degradation of mycotoxins represents an environmental friendly decontamination option and an irreversible mechanism that guarantees a lower exposure of livestock, our data support the interest of introducing high moisture maize grain silages in feed rations in addition to their demonstrated nutritional value.

Acknowledgments

C.M.T. is grateful to Lallemand (Blagnac, France) for their financial as a PhD grant. The authors thank Christian Barreau for fruitful suggestions and scientific support during this work.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contribution

C.M.T, V. A-P, F. R-F conceived and designed experiments. C.M.T, N.F, G.M. performed the experiments. C. M.T, V. A-P, S. C, J-M. S, F. R-F analysed the data and wrote the paper.

Axe 2 : Recherche d'agents microbiens impliqués dans la dégradation de la Fumonisine B1 dans les ensilages maïs grain

Chapitre III : *Criblage des microorganismes cultivables pour leur capacité à dégrader la FB1.*

Chapitre IV : *Analyse globale de la communauté microbienne associée à la dégradation de la FB1.*

Les études conduites dans l'Axe 1 ont permis de mettre en évidence la dégradation de la FB1 à des niveaux variables, soulevant ainsi l'hypothèse d'une activité microbienne pouvant être impliquée dans la transformation de la fumonisine au cours de l'ensilage de maïs grain. Nous nous intéresserons à l'identification des agents microbiens associés à cette dégradation. Pour cela, nous avons réalisé deux approches complémentaires qui donnent lieu à deux chapitres du manuscrit. Premièrement, nous avons isolé des microorganismes cultivables présents dans les ensilages de maïs grain et effectué un criblage pour révéler leur capacité à métaboliser la FB1 en HFB1. Ces isolats candidats ont été identifiés taxonomiquement à l'aide des gènes ribosomaux. Ensuite nous avons voulu définir des outils moléculaires par PCR en temps réel, permettant d'identifier rapidement les microorganismes possédant des gènes impliqués dans la voie de dégradation de la fumonisine. Ces outils permettront d'élucider les mécanismes achevés par les souches candidates isolées des ensilages de maïs grain.

Dans un second temps, nous avons mis en œuvre une analyse métagénomique afin de caractériser la communauté microbienne présente. Nous avons exploré la diversité et l'évolution du microbiote durant la fermentation du maïs puis la présence d'un potentiel microbiome associé à la dégradation de cette toxine. Les résultats obtenus par cette deuxième approche sont prometteurs et offrent de nouvelles pistes pour l'étude de la dégradation microbienne de la FB1.

***Chapitre III : Criblage des
microorganismes cultivables pour leur
capacité à dégrader la FB1***

1. Introduction

Les bilans d'évolution des teneurs en fumonisines libres et piégées au cours du temps dans des ensilages de maïs grain indiquent une diminution globale de la teneur en FB1, mais à des niveaux variables selon les ensilages. Il est donc probable que cette dégradation soit expliquée par l'activité enzymatique de certains des microorganismes adaptés aux conditions physico-chimiques des ensilages de maïs qui s'installeraient plus ou moins abondamment en fonction des ensilages. De plus, nous avons montré dans le contexte bibliographique qu'un nombre restreint de microorganismes isolés de divers environnements est capable de métaboliser la FB1.

L'approche de microbiologie classique permet de sélectionner des microorganismes par des isolements sur milieux de culture plus ou moins sélectifs. Néanmoins, seule une faible proportion (<10%) des microorganismes présents dans l'environnement sont cultivables et donc peuvent être étudiés par ce type d'approche (Akondi & Lakshmi, 2013). Les isolats obtenus ne sont donc pas représentatifs de la composition de la communauté microbienne présente dans un écosystème donné. Ce type d'approche reste cependant très utile pour identifier des microorganismes cultivables qui peuvent être directement utilisés pour des applications technologiques.

L'objectif des travaux présentés ici est l'isolement et la caractérisation de microorganismes issus de l'ensilage de maïs grain capables de métaboliser la FB1. Le matériel biologique et les données obtenues permettront par la suite de réaliser des études approfondies sur les mécanismes impliqués dans cette dégradation et de mettre en place des expérimentations d'inoculation des souches candidates dans des ensilages de maïs grain en conditions réelles afin d'évaluer l'activité globale de dégradation de la FB1 dans ces ensilages.



Figure III.1 : Grain de maïs ensilés et mini silos utilisés

2. Procédures expérimentales

2.1 Matériel biologique

2.1.1 Echantillons végétaux

Basé sur la présence ou l'absence des symptômes de fusariose, des épis de maïs sains et naturellement contaminés par *Fusarium* ont été récoltés dans différentes communes du sud-ouest de la France (collaboration ARVALIS et AGPM) pendant deux années de récolte : 2011 et 2013 avec un taux d'humidité de 34% et 24% pour les différents lots. L'ensemble des échantillons a été égrainé et une partie a été broyée pour la préparation des mini silos.

2.1.2 Préparation des mini silos

Les mini silos d'une capacité de 3 kg ont été fournis par ARVALIS. Ils étaient constitués d'un tube PVC (50 cm x 10 cm ; 1 x d), fermé hermétiquement aux deux extrémités et munis d'un dispositif permettant l'évacuation de gaz de fermentation (**Figure III.1**). Ces mini silos ont préalablement été validés dans l'Unité Herbivores de l'INRA de Clermont Ferrand pour leur qualité de conservation et de stabilité anaérobie.

Huit modalités des silos ont été préparées en triplicata, selon les procédures établies par ARVALIS. Les mini silos issus de la récolte 2011 étaient composés d'un lot de maïs contaminé et d'un lot non contaminé mélangés à différentes proportions :

- ⇒ L'ensilage A, composé uniquement de grains broyés non contaminés.
- ⇒ L'ensilage B, composé des grains broyés non contaminés (80%) et des grains entiers contaminés (20%).
- ⇒ L'ensilage C, composé des grains entiers non contaminés (80%) et contaminés (20%).
- ⇒ L'ensilage D, composé des grains entiers non contaminés (70%) et contaminés (30%).

Pour les ensilages issus de la récolte 2013, chaque lot maïs provenant de différentes localités (E :Daubeze, F :Duras, G :Jusix, H :Cadillac) et pouvant correspondre à différents niveaux de contamination selon l'intensité des symptômes relevée au champ a été broyé. Les lots F et G, qui présentaient un taux d'humidité de 24 % et 28 % respectivement ont été ajustés à 30 %. Les lots E et H avaient un taux d'humidité convenable de 31 %. Ces maïs broyés ont été utilisés pour réaliser les ensilages suivants :

- ⇒ ensilage E
- ⇒ ensilage F
- ⇒ ensilage G
- ⇒ ensilage H

Après entassement les différents mini silos ont été fermés et stockés à température ambiante pendant environ quatre mois. Les silos issus de la récolte 2011 ont été échantillonnés à trois temps de fermentation (J0, J78, J141). Après analyse du contenu en fumonisine, ces silos seront utilisés pour mettre en place l'approche métagénomique. En revanche, les silos provenant de la récolte 2013 ont été ouverts à quatre temps de fermentation (J0, J48, J82, J141) pour les dosages des fumonisines et les analyses microbiologiques. A chaque arrêt de fermentation nous avons utilisé un seul silo et récupéré la partie centrale de l'ensilage pour les différentes analyses.

2.1.3 Microorganismes de référence

Trois microorganismes de référence rapportés comme étant capables de dégrader la fumonisine B1 ont été obtenus auprès de l'ATCC (The global Bioresource Center) :

- La bactérie ATCC 55552 (Duvick, *et al.*, 1998, Heinl, *et al.*, 2010).
- La bactérie ATCC 51380 *Sphingopyxis macrogoltabida* (proche du *Sphingopyxis* sp. MTA144) (Hartinger, *et al.*, 2011, Heinl, *et al.*, 2011).
- La levure *Exophiala spinifera* ATCC 74269 (Duvick, *et al.*, 1998).

2.2 Construction d'une banque des isolats à partir de mini silos

Nous avons construit une banque d'isolats à partir des ensilages de la récolte 2013 prélevés à 0, 48, 82, 141 jours de fermentation. Pour cela nous nous sommes basés sur deux stratégies : isolement direct et isolement après enrichissement successif avec FB1.

2.2.1 Isolement direct des microorganismes

Dix grammes de maïs de chaque ensilage ont été mis en suspension dans 90 mL de PBS stérile (pH 7,5), puis homogénéisés pendant 30 min (150 rev.min^{-1}) à température ambiante. La suspension ainsi obtenue a été diluée au dixième dans l'eau peptonnée stérile (9 mL) jusqu'à une dilution de l'ordre 10^{-8} . Puis 100 μL ont été prélevés à partir de chaque dilution et ensemencés en surface de boîtes Petri contenant des milieux gélosés pour l'isolement de levures et de bactéries lactiques, dont la composition est donnée ci-dessous.

- Malt-Agar supplémenté en antibiotique pour l'isolement de moisissures et de levures : Malt 10 g.L^{-1} , Agar granulé 15 g.L^{-1} , supplémenté de 2 mL.L^{-1} de Chloramphénicol à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ éthanol + 2 mL.L^{-1} de Pénicilline à $12 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ eau, ajouté après autoclavage.
- MRS-Agar supplémenté en antifongique pour l'isolement de bactéries : polypeptone 10 g.L^{-1} , extrait de viande 10 g.L^{-1} , extrait de levure 5 g.L^{-1} , glucose 20 g.L^{-1} , tween 80 1 g.L^{-1} , phosphate di-potassique 2 g.L^{-1} , acétate de sodium 5 g.L^{-1} , citrate d'ammonium 2 g.L^{-1} , sulfate de magnésium 0.2 g.L^{-1} , sulfate de manganèse 0.05 g.L^{-1} , agar 15 g.L^{-1} , supplémenté de 2 mL.L^{-1} de Pimaricine à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ eau, ajouté après autoclavage.

Les cultures ont été incubées à 25°C pendant 48 à 96 heures. Après incubation, 20% des colonies ont été sélectionnées et purifiées en privilégiant celles qui présentaient des morphologies différentes,. Les isolats ont été conservés à 4°C pour le test décrit dans la partie

2.3.

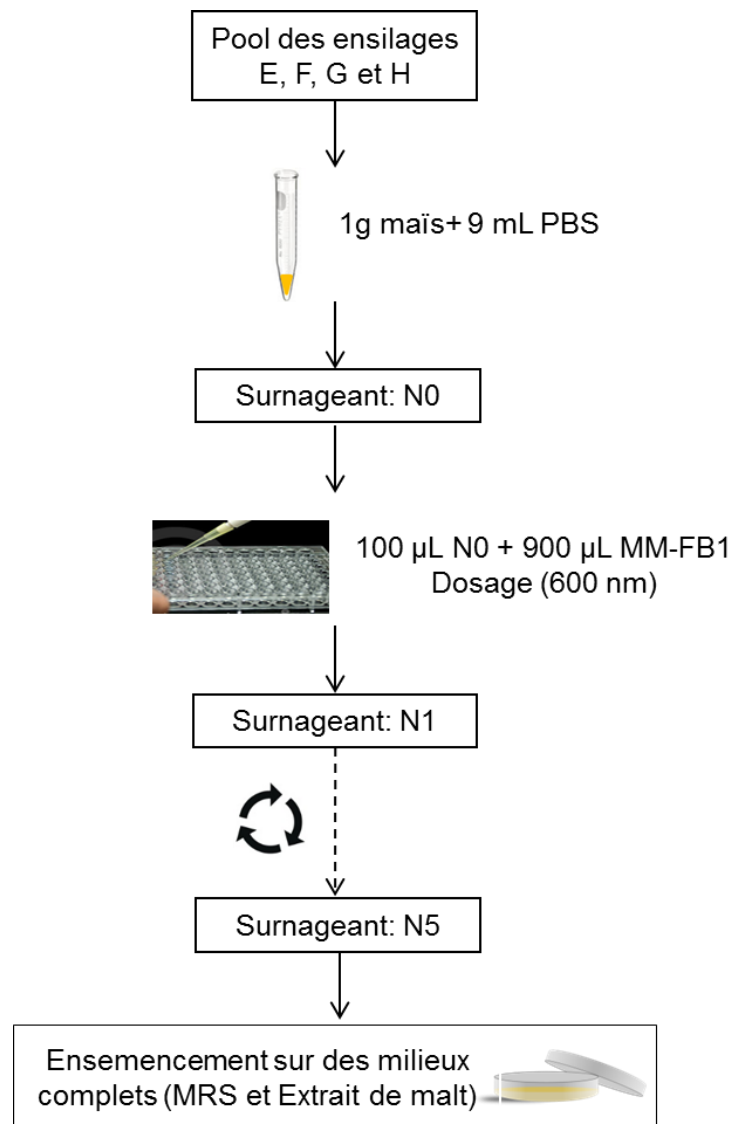


Figure III.2 : Représentation schématique de la méthode d'isolement des microorganismes à partir d'enrichissement successif avec FB1.

2.2.2 Isolement après enrichissement successif avec FB1

La méthode utilisée est celle proposée par Shima, *et al.* (1997) et Benedetti, *et al.* (2006). Cette démarche est résumée dans la **Figure III.2**.

Les échantillons de maïs issus des quatre ensilages (E, F, G et H) ont été préalablement mélangés afin d'obtenir une fraction aliquote d'1 g de maïs qui a été homogénéisé dans 9 mL de PBS stérile (pH 7,5) avec des billes en verre, pendant 15 min (150 rev.min^{-1}) à température ambiante. Après avoir laissé la suspension décanter pendant 15 min à température ambiante, 5 mL du surnageant de cette solution ont été récupérés afin de l'utiliser comme inoculum initial (N0). Puis 100 μL de N0 ont été inoculés dans 1 mL du milieu MM enrichi avec la FB1 ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et incubés à 25°C (150 rev.min^{-1}) pendant 8 jours afin d'obtenir un nouvel inoculum appelé N1. De la même façon une aliquote de 100 μL de N1 a été inoculée dans 1 mL de milieu neuf. Cette opération a été répétée quatre fois jusqu'à N5.

Le milieu minimum (MM) adapté à partir du protocole proposé par Molnar, *et al.* (2004) contient pour 1L : 2,44 g Na_2HPO_4 ; 1,52 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g.L^{-1} extrait de levure, 10 mL de solution d'oligoéléments et 10 mL de solution de vitamine. La composition de la solution d'oligoéléments est, pour 1 L: 0,5 g EDTA; 0,2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,003 g $\text{MnCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,03 g H_3BO_3 ; 0,001 g $\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,002 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,002 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,003 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. La composition de la solution de vitamine est pour 1 L: 2 mg biotine, 2 mg acide folique, 10 mg pyridoxine.HCl, 5 mg thiamine.HCl, 5 mg riboflavine, 5 mg acide nicotinique, 5 mg DL-Ca-pantothenate, 100 mg menadione, 5 mg acide *p*-aminobenzoïque. La solution mère de FB1 (5 mg, Biopur) est préparée par dilution dans 10 mL d'acétonitrile/eau (50/50, v/v).

Finalement 100 μL de la solution N5 ont été utilisées pour l'isolement des levures et des bactéries lactiques selon le protocole décrit plus haut. Les isolats obtenus ont été également conservés à 4 °C pour le test décrit dans la partie 2.3.

2.3 Criblage préliminaire des isolats pour leur capacité à se développer dans un milieu enrichi en FB1

Afin de tester la capacité des isolats à se développer en présence de FB1, un pré-criblage avec culture sur le milieu MM supplémenté avec 250 μg de FB1. mL^{-1} (MM-FB1) comme principale source de carbone et d'azote a été mis en place. Des pré-cultures (16 à 24 h) de l'isolat sélectionné en phase exponentielle (DO 0,6 à 600 nm) ont été utilisées. Ensuite, 200 μL du MM-FB1 ont été inoculés avec 25 μL de cette pré-culture dans des microplaques de 96 puits (CellStar, Greiner bio-One) pendant 48 h à 25 °C, en agitation. Des mesures de la densité optique (DO) ont été prises toutes les heures sur le lecteur de microplaque TECAN (InfiniteM200 Pro). Ce test a été réalisé en triplicata. Les souches ATCC 55552 et ATCC 74269 ont été utilisées comme control positif. L'effet solvant dans lequel la toxine a été dissoute a été également pris en compte.

Les isolats positifs dont la croissance était supérieure en présence de FB1 par rapport au milieu MM seul ont été conservées à 4 °C et à -20 °C et utilisés par la suite pour confirmer leur aptitude à dégrader la FB1.

2.4 Extraction d'ADN des isolats candidats

L'extraction d'ADN des isolats candidats est réalisée avec le kit Nucleon Phytopure DNA extraction (Amersham) selon les instructions du fournisseur à partir des culots microbiens préalablement lyophilisés. Les ADN ont été repris dans 50 μL d'eau MiliQ et conservés à -20 °C.

Tableau III.1 : Séquences d'amorces utilisées pour l'identification des isolats candidats

Microorganisme	Région	Amorce	Séquence (5'-3')	Taille d'amplicon (pb)	Référence
Bactérie	16S rRNA- V34	V3F	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	~ 465	Cai, <i>et al.</i> (2013)
		V4R	TAC NVG GGT ATC TAA TCC		
Levure	LSU 26/28S- D1/D2	NL1	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA	500-550	Kurtzman & Robnett (1998)
		NL4	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G		

Les ratios DO 260/280 nm et 260/230 nm ont été utilisés comme indicateurs de la pureté des extraits. La qualité des ADN est visualisée par électrophorèse de 5 µL d'échantillon sur gel d'agarose de 1%.

2.5 Identification taxonomique des isolats candidats

L'identification taxonomique des isolats candidats a été réalisée par amplification des régions ribosomiques 16S rRNA pour les bactéries (Cai, *et al.*, 2013) et LSU 26/28S rRNA pour les levures à l'aide des amorces universelles choisies pour leur sensibilité et fiabilité (Kurtzman & Robnett, 1998, Fujita, *et al.*, 2001) (**Tableau III.1**).

Les réactions de PCR ont été réalisées avec l'enzyme GoTaq DNA polymerase (Promega) dans 25 µL de mélange réactionnel (tampon GoTaq® 1X, MgCl₂ 2,5 mM, chaque dNTP 0,1 mM des amorces *sens/antisens*, 1 µM, ADN polymérase 0,02 U/µL) avec le programme suivant : une dénaturation initiale de 95 °C pendant 5 min, 35 cycles de [94 °C pendant 1min, 55 °C pendant 90 s, 72 °C pendant 90 s] et une élongation finale à 72 °C pendant 5 min. La taille des amplicons obtenus a été évaluée par électrophorèse dans un gel d'agarose 1% (Eurobio, France) en utilisant le marqueur de taille 1 Kb (Promega), puis les amplicons ont été séquencés (Beckman Coulter Genomics) et analysés à l'aide des logiciels Bioedit (Hall, 1999) et BLAST (Altschul, *et al.*, 1997).

2.6 Caractérisation des microorganismes capables de métaboliser la FB1

Les isolats sélectionnés sur leur capacité à produire de la biomasse en utilisant la FB1 comme source de C et N ont été caractérisés pour leur capacité à métaboliser la FB1 en HFB1 et pour la présence, dans leur milieu de culture, du métabolite partiellement hydrolysé pHFB1 (*m/z* 564) décrit dans le chapitre II.

Tableau III.2 : Conditions retenues pour le test de métabolisation de la FB1

Microorganisme	Milieu de culture	Volume du milieu (mL)	Concentration de FB1	Arrêts de culture
Bactérie	Complet (MRS et TSB)	2	5 µg.mL ⁻¹	0 h et 96 h
Levure	Complet (Extrait de malt)	5		

Pour mettre au point ce test, nous avons utilisé dans un premier temps les souches de référence ATCC 55552 (bactérie) et ATCC 74269 (levure) afin d'optimiser plusieurs paramètres tels que le milieu (complet ou minimum), le volume du milieu, la concentration initiale de la toxine, le nombre d'arrêts de culture, le temps et la température d'incubation. L'effet de la biomasse cellulaire et la séquestration de la FB1 (cellules viables et non viables) ont été également examinés selon le protocole proposé par Dalié (2009). Les conditions optimales sont résumées dans le **Tableau III.2**.

Le protocole expérimental utilisé est basé sur celui de Niderkorn, *et al.* (2006) avec quelques modifications. La souche candidate a été activée dans 5 mL d'un milieu complet pendant 24 à 48 h, sous agitation à 25 °C pour les levures et 30 °C pour les bactéries. 200 µL de la culture obtenue ont été inoculés dans un volume final de 90 mL du milieu complet pendant 48 h sous agitation (180 rpm) à 25 °C ou 30 °C afin de produire de la biomasse. Après incubation les cultures ont été centrifugées à 3000 *g* à 5 °C, pendant 10 min pour éliminer le surnageant. Le culot obtenu a été lavé 3 fois avec 20 mL de PBS stérile (10 mM; pH 7,4). Deux mL (bactérie) et 5 mL (levure) de milieu complet contenant 5 µg. mL⁻¹ de FB1 ont été ajoutés au culot. La densité optique des cultures a été prise en compte à chaque étape (DO 600 nm) pour évaluer la biomasse microbienne. Les solutions ont été homogénéisées et incubées à 25 °C ou 30 °C pendant 4 jours sous agitation.

Les cultures ont été arrêtées et centrifugées (3000 *g*, 10 min, 5 °C) à 0 h et à 96 h. A chaque arrêt le surnageant a été récupéré, filtré (0,22 µm, Merckmillipore) et stocké à -20 °C avant le dosage de FB1 et HFB1 par LC-MS.

Ce test a été réalisé en triplicata avec un témoin positif (bactérie ou levure de référence/ milieu + FB1), un témoin négatif (isolat/milieu) et un témoin d'injection, milieu + FB1.

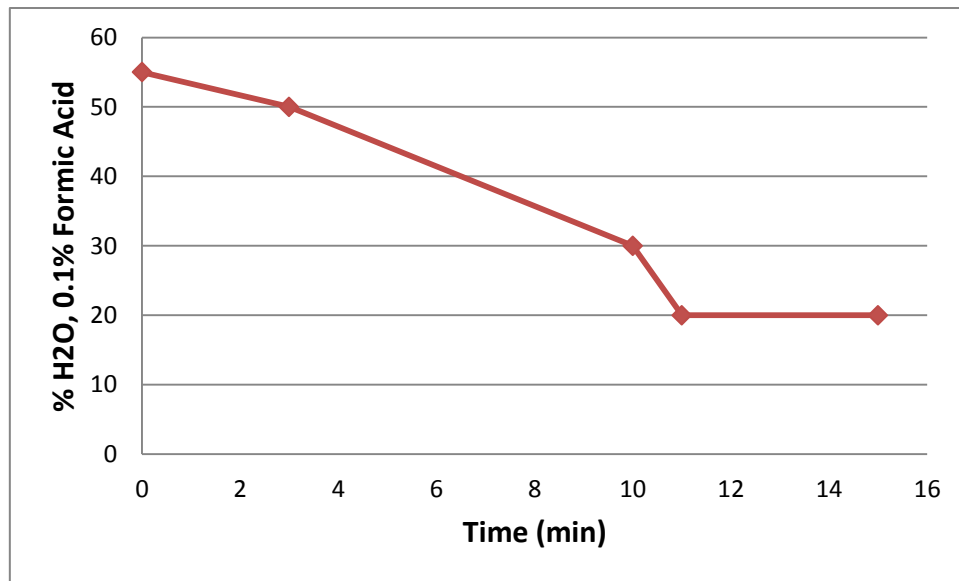


Figure III.3 : Représentation du gradient eau, 0,1% acide formique, utilisé pour l'analyse de FB1 et ses formes hydrolysées.

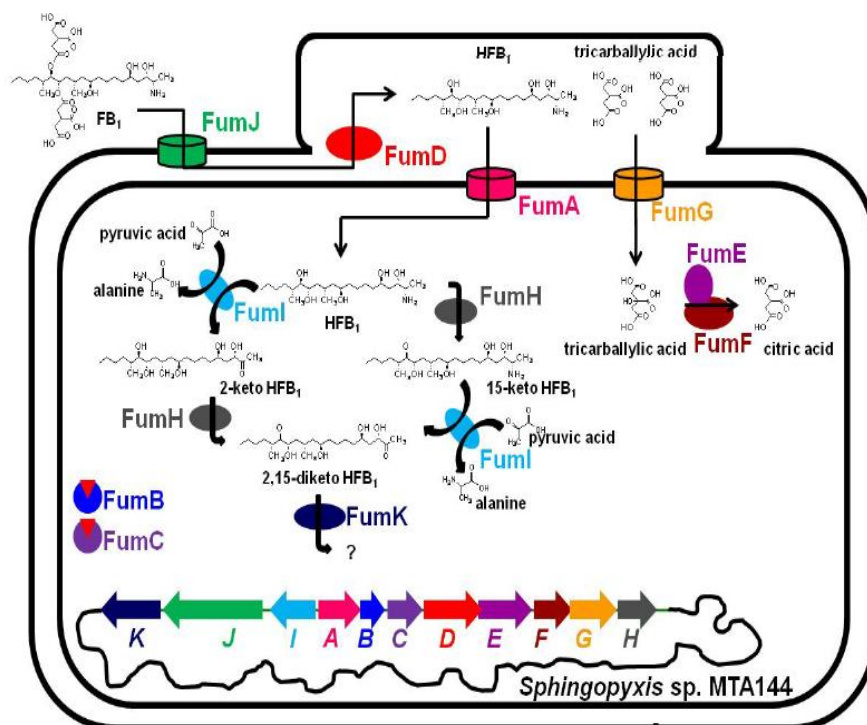


Figure III.4 : Cluster de gènes de *Sphingopyxis* MTA144 impliqué dans la dégradation de la FB1 (Hartinger, *et al.*, 2010 ; Biomin communication).

2.7 Quantification de FB1 et HFB1 par LC-MS

La méthode d'analyse LC-MS est celle décrite dans le chapitre II avec quelques modifications de solvant et de gradient d'élution. Cinq μL sont injectés sur une colonne Kinetex XB-C18 100 Å (150 mm x 4,6 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Le Pecq, France) maintenue à une température de 45 °C. La phase mobile est constituée d'eau et acide formique 0,1% (solvant A) et de méthanol/acétonitrile (50 :50, vol/vol) et acide formique 0,1% (solvant B). Le temps d'analyse par échantillon était de 21 min. Les conditions du gradient d'élution sont présentées dans la **Figure III.3**.

Les analyses en mode MRM et full-scan ont été réalisées afin de quantifier la FB1 et la HFB1 avec des étalons externes compris entre 1 et 5000 ng.mL^{-1} . La présence de pHFB1 a été également examinée.

2.8 Mise au point d'un outil moléculaire de caractérisation des gènes impliqués dans la dégradation de la fumonisine B1

Pour mettre au point un outil moléculaire permettant de cibler des gènes impliqués dans la dégradation de la FB1, nous nous sommes basés sur des travaux précédents. En effet Hartinger, *et al.* (2011) ont identifié le cluster de gènes relié à la dégradation de la fumonisine B1 chez la souche *Sphingopyxis macrogoltabida* MTA144 (GenBank accession n°. FJ426269.1) (**Figure III.4**). Heintl, *et al.* (2011) ont également reporté le gène *FumI* de la bactérie ATCC 55552, codant une aminotransferase (GenBank : GU338977.1) capable de dégrader la FB1. Nous avons ainsi ciblé deux gènes : le gène *FumD* codant une carboxylesterase, et le gène *FumI* codant une aminotransferase de classe III (Heintl, *et al.*, 2010, Hartinger & Moll, 2011).

Tableau III.3 : Amorces spécifiques des gènes *FumI* et *FumD* impliqués dans la dégradation de la FB1.

Espèces	Gène	Amorces	Séquence 5'-3'	Tm (°C)
ATCC 55552	<i>FumI</i>	<i>FumI</i> ATCC 55552 F	GTC TCC ATG CCC CAA G	60
		<i>FumI</i> ATCC 55552 R	GGT GGA TTT CTA GGC TCG	
ATCC 51380 (MTA 144)	<i>FumI</i>	<i>FumI</i> MTA 144 F	CTG GTC GTT GAC GAT G	60
		<i>FumI</i> MTA 144 R	CTG AGA CTG TGC CTC C	
ATCC 51380 (MTA 144)	<i>FumD</i>	<i>FumD</i> MTA 144	AAC AGG TCG GTA AGG G	60
		<i>FumD</i> MTA 144	CGA GAA GAC CAT AGT TGC C	

2.8.1 Dessin d'amorces spécifiques du gène *FumI* et *FumD*

Dans un premier temps, les séquences du gène *FumI* de *Sphingopyxis* sp. MTA144 et ATCC 55552 ont été alignées pour essayer de définir des amorces communes. Cependant étant donné la diversité entre ces deux séquences, cela n'a pas été possible. Nous avons donc défini deux couples d'amorces. Le premier permet l'amplification du gène *FumI* chez ATCC 51380 (MTA 144) et le deuxième l'amplification du gène *FumI* chez ATCC 55552. Nous avons également dessinés des amorces amplifiant le gène *FumD* chez ATCC 51380. Les couples d'amorces ont été dessinés en utilisant le logiciel LightCycler Probe Design 1.0 (Roche Applied Science).

2.8.2 Conditions d'amplification en qPCR

Les analyses par PCR quantitative ont été réalisées avec 1 µL de chaque ADN (correspondant à 10 ng) dans un mélange réactionnel de 10 µL, en utilisant le QuantiFast™ SYBR® Green PCR kit 2X (QIAGEN). Les réactions ont été effectuées en utilisant le système LightCycler® 1.5 ou 2.0 et le logiciel LightCycler 3.5.3 (Roche, Allemagne), avec le programme suivant: une dénaturation initiale de 95 °C pendant 5 min, 40 cycles de [95 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 30 s, 72 °C pendant 90 s] et une élongation finale à 72 °C pendant 5 min. Une courbe de fusion est établie par diminution de la température de 0,5 °C toutes les 10 s à partir de 90 °C. Les amorces utilisées et leur température d'hybridation sont présentées dans le **Tableau III.3**. L'absence de produits d'amplification PCR non spécifiques ou la formation de dimères d'amorces a été vérifiée par la réalisation de courbes de fusion.

3. Résultats et discussions

3.1 Isolats microbiens obtenus à partir des ensilages maïs grain

La banque des isolats microbiens des ensilages de maïs grain a été mise en place à partir des quatre ensilages E, F, G, H fortement contaminés en fumonisine B1 avec différents niveaux de réduction de cette toxine observés au cours de l'ensilage (voir chapitre II). Dans un premier temps, nous avons réalisé des dénombrements des microorganismes cultivables (bactéries et levures) à quatre temps de fermentation J0, J48, J82 et J141. De façon générale nous avons observé une diminution de la concentration de levures et bactéries au cours de la fermentation avec des niveaux de l'ordre de 10^8 UFC/g à jour 0 et de 10^4 UFC/g après quatre mois de fermentation. Ce phénomène peut être expliqué par l'acidification et l'anaérobiose progressive achevée au cours de l'ensilage. Selon Weinberg, *et al.* (2004) les niveaux des bactéries généralement rencontrées dans les ensilages de maïs plante entière correspondent 10^8 - 10^9 UFC.g⁻¹. La baisse des concentrations microbiennes reportée dans ce travail pourrait être associée aux forts niveaux de FB1, susceptibles d'influencer la densité microbienne après quatre mois de fermentation et d'induire une spécialisation de la communauté microbienne adaptée à ces concentrations en FB1. C'est aussi possiblement une caractéristique des ensilages maïs grains humide qui se distinguent des ensilages de plantes entière.

A partir des deux stratégies d'isolement, direct et après enrichissement successif avec FB1 nous avons obtenu 90 et 160 isolats de bactéries et de levures, respectivement. L'ensemble de ces isolats provient des essais à quatre temps de fermentation. Cette forte présence des levures cultivables est en désaccord avec les travaux de Brusetti, *et al.* (2006) et McDonald, *et al.* (1991) dans lesquels ils observent majoritairement des bactéries lactiques tout au long de la fermentation de l'ensilage de maïs plante entière. Ce résultat peut être relié à la particularité.

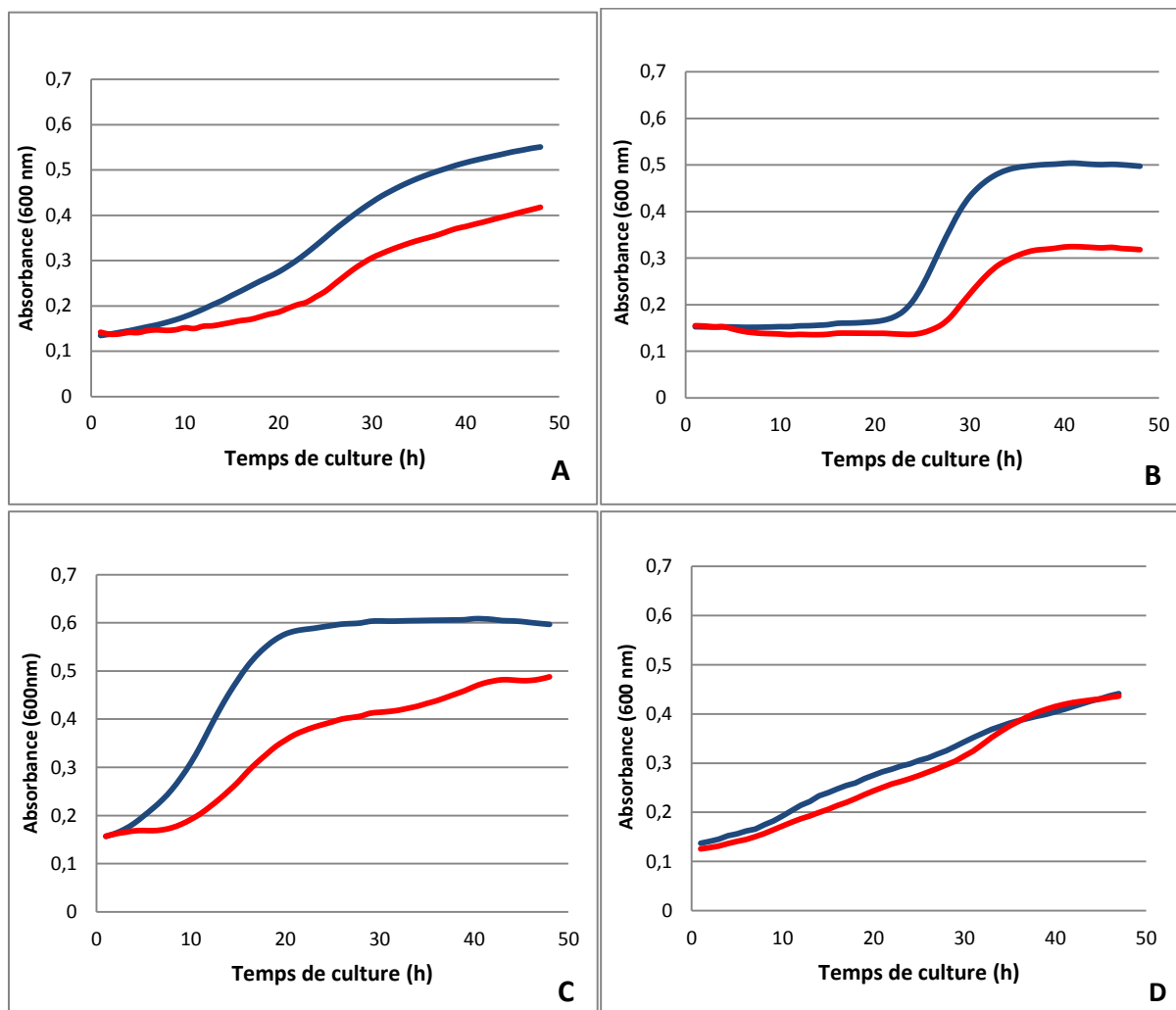


Figure III.5 : Courbes de croissance des microorganismes en présence de la FB1. En bleu, le microorganisme inoculé dans le milieu MM supplémenté avec la FB1 et en rouge le microorganisme inoculé dans le milieu MM comme témoin négatif. **A :** souche d'*Exophiala spinifera* (ATCC 74269) utilisée comme témoin positif. **B, C :** isolats VA19 et CA238 considérés positifs au pre-screening. **D :** isolat considéré négatif.

des ensilages de maïs grain riches en amidon par rapport aux plantes entière riches en fibre lignocellulosiques.

3.2 Capacité des isolats à se développer en présence de FB1

Parmi tous les isolats obtenus, nous avons choisi les 50 les plus représentatifs des colonies viables présentant des aspects différents afin d'étudier leur capacité de se développer dans un milieu contenant la fumonisine B1 comme source principale de carbone et azote. Cette étape avait pour objectif de présélectionner des microorganismes potentiellement capables de dégrader cette toxine. Pour cela, la comparaison des courbes de croissance en milieux liquides, obtenues par mesure de l'absorbance de l'isolat candidat sur MM-FB1 et sur MM non supplémenté en FB1 au cours de 48 h de culture, a été prise en compte. La **Figure III.5** présente quelques exemples de la croissance des isolats dans les deux conditions. De façon générale nous avons observé différentes cinétiques de croissance en réponse à la présence de la FB1 avec des valeurs d'absorbance comprises entre 0,4 et 0,7 après 48 h d'incubation. Ces résultats indiquent des faibles niveaux de croissance des isolats, associés au milieu minimum, limitant en nutriments nécessaires à la croissance optimale des isolats analysés.

Malgré cette faible production de biomasse, nous avons pu observer que pour certains isolats (**Figure III.5B** et **III.5C**), la présence de la FB1 pouvait favoriser leur croissance en milieu MM-FB1 par rapport à la condition témoin MM. Ainsi 20 isolats positifs (13 levures et 7 bactéries) pour la capacité à croître avec la FB1 comme source de C et N ont été obtenus avec des valeurs d'absorbance jusqu'à deux fois supérieures aux témoins à la fin de l'incubation (**Tableau III.4**).

Tableau III.4 : Exemples des isolats positifs au test de pre-screening

Isolat	Condition	Densité optique (600 nm)		Fois DO supérieure après 48 h
		0 h	48 h	
Levure	VA19	Isolat/MM-FB1	0,2	1,6
		Isolat/MM	0,3	
	JU236	Isolat/MM-FB1	0,2	1,8
		Isolat/MM	0,3	
	DU233	Isolat/MM-FB1	0,2	1,6
		Isolat/MM	0,3	
Bactérie	N182	Isolat/MM-FB1	0,1	1,6
		Isolat/MM	0,5	

Tableau III.5 : Identification taxonomique des isolats sélectionnés lors du pré-criblage pour leur capacité à croître en présence de FB1.

Micro-organisme	Origine	Echantillon d'ensilage	Isolat	Longueur séquence (pb)	BLAST de séquences sur la base de données NCBI	
					Espèce	Accession
Levure	Isolement direct	H-J82	CA238	512	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KM978209.1
		E-J82	DA229	512	<i>Uncultured Wickerhamomyces</i>	KM999154.1
		E-J82	DA230	526	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	AB778768.1
		E-J82	DA246	524	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KM978209.1
		F-J82	DU232	512	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KM978209.1
		F-J82	DU233	500	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KP263785.1
		F-J82	DU252	512	<i>Uncultured Wickerhamomyces</i>	KM999154.1
		G-J82	JU236	512	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KM978209.1
	Isolement après sélection sur FB1	J0	VA19	512	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KM978209.1
		J141	N345	511	<i>Candida glabrata</i>	LC015357.1
		J141	N346	525	<i>Candida glabrata</i>	LC015357.1
		J48	N183	424	<i>Pichia fermentans</i>	KM029994.1
		J141	N353	522	<i>Candida glabrata</i>	LC015357.1
		J48	N182	377	<i>Klebsiella oxytoca</i>	LC049201.1
		J48	N186	283	<i>Klebsiella oxytoca</i>	LC049201.1
		J48	N197	376	<i>Lactobacillus brevis</i>	KP773479.1
Bactérie	J0	VA26	378	<i>Klebsiella variicola</i>	LC049203.1	
	J0	VA34	379	<i>Klebsiella sp.</i> HGH0311	JX520200.1	
	J48	N195	377	<i>Uncultured Bacillus sp.</i>	KM819175.1	
	J48	N339	377	<i>Uncultured Bacillus sp.</i>	KM819175.1	

3.3 Identification des isolats candidats issus des ensilages de maïs grain

L'identification taxonomique des 20 isolats positifs a été réalisée par similarités de séquences d'ARN ribosomiques sur la base de données non redondante NCBI (National Center for Biotechnology Information) avec l'outil d'alignement BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, *et al.*, 1997). Pour cela les amplicons obtenus par les amorces *sens* et *antisens* ont été alignées afin d'obtenir un contig à l'aide du module CAP (Contig Assembly Program) (Huang, 1992) et du logiciel BioEdit en obtenant ainsi des séquences comprises entre 500 et 526 pb pour les levures et 283 et 379 pb pour les bactéries. Nous avons observé des homologies de 100% après le BLAST pour tous les isolats. L'utilisation des couples d'amorces V34 pour les bactéries et NL14 pour les levures semble donc pertinente pour une première identification au niveau de l'espèce. L'utilisation d'amorces couvrant une plus grande région des ARN ribosomiques permettra de préciser ces identifications taxonomiques dans certains cas.

Le **Tableau III.5** montre l'identification taxonomique des 20 isolats analysés. Seul le temps d'ensilage 82 jours a fourni les isolats candidats par isolement direct. Ces isolats sont tous des levures. Nous avons observé notamment la présence de levures du genre *Wickerhamomyces* dans divers échantillons. *Wickerhamomyces anomalus* est une espèce qui a déjà été également isolée à partir d'autres systèmes fermentaires tels que l'ensilage d'herbe et des levains de fermentation de pain (Coda, *et al.*, 2011, Zha, *et al.*, 2013). Dans notre étude, cette espèce qui s'est révélée potentiellement capable de dégrader la FB1, était présente dans les 4 ensilages analysés (J82). Des études complémentaires pourraient permettre de définir s'il existe une diversité génétique parmi ces isolats de *W. anomalus*. Les isolats obtenus après enrichissement successif avec FB1, considérés comme potentiellement aptes à dégrader la

toxine proviennent des ensilages à différents temps de fermentation (0, 48 et 141 jours). Nous avons obtenu les levures *W. anomalus* à J0, *Candida glabrata* à J141 et *Pichia fermentans* à J48. Concernant les bactéries nous avons remarqué la présence d'une souche de *L. brevis* (J48). Cette bactérie hétérofermentaire est capable de convertir les sucres solubles du maïs en acide lactique, diminuant ainsi le pH de l'ensilage (Rossi & Dellaglio, 2007). Nous avons également observé la présence de *Bacillus* sp. (J48) et de l'entérobactérie *Klebsiella* (J0 et J78). Des études précédentes ont montré la présence de *Klebsiella* dans le sol et des matrices végétales. *Klebsiella variicola* étant isolée à partir de nombreuses plantes (Rosenblueth, *et al.*, 2004) et *Klebsiella oxytoca*, isolée à partir du sol. Cette dernière bactérie possède un métabolisme respiratoire aérobie-anaérobie facultatif, ce qui a pu lui permettre de supporter les conditions de l'ensilage. Elle possède par ailleurs des capacités de métaboliser des homodimères et homotrimères de glucose qui sont exploitées dans certains procédés de production d'éthanol à partir de biomasse végétale (Doran, *et al.*, 1994). Son développement dans l'ensilage de maïs grain n'est donc pas surprenant. Par ailleurs, cette espèce est déjà connue pour ses propriétés de dégradation de xénobiotiques (Kwon, *et al.*, 2005).

La présence de ces microorganismes pourrait être associée à l'utilisation des grains de maïs abîmés (préparation des silos avec du maïs fusarié) et à la détérioration aérobie des ensilages au cours de la fermentation. En effet, Brusetti, *et al.* (2006) ont reporté une forte présence des entérobactéries sur des ensilages plante entière préparés avec du maïs fané.

Plusieurs auteurs ont reporté la présence de *Bacillus*, *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* comme des principaux agents d'altération de l'ensilage après une exposition aérobie (Dolci, *et al.*, 2011 ; Pahlow, *et al.*, 2003) impliqués dans certains cas dans la métabolisation du lactate (Driehuis & Oude Elferink, 2000). Cependant l'aspect visuel et olfactif des ensilages lors de l'ouverture des silos ne traduisait pas d'altération aérobie.

Les résultats reportés dans cette section ne sont pas en accord avec le schéma d'évolution de la communauté microbienne des ensilages de maïs plante entière, présenté dans le Chapitre I. Cela peut s'expliquer par le fait que nous n'avons identifié que les isolats présentant une capacité potentielle dans la dégradation de la FB1, mais aussi par les particularités de l'ensilage de maïs grain, comme sa forte teneur en amidon. L'analyse globale de la communauté microbienne permettra de préciser les particularités de cette matrice végétale.

3.4 Dégradation de la FB1 par les microorganismes présents dans les ensilages maïs grain

Comme cité précédemment, des paramètres analytiques ont été optimisés à partir des souches modèles (ATCC 55552 et ATCC 74269) dans le but de mettre en évidence la dégradation de la FB1 pour l'ensemble des microorganismes (bactéries et levures) candidats isolés des ensilages de maïs grain. Pour cela nous avons quantifié la FB1 et HFB1 dans des cultures liquides après incubation avec des cellules des souches analysées.

Le milieu complet avec une incubation pendant 96 h s'est avéré comme le plus adapté pour les bactéries comme pour les levures. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Guan, *et al.* (2009) qui ont également retenu ces conditions de culture pour cribler des microorganismes capables de dégrader une autre fusariotoxine, le DON. En effet un milieu complet enrichi en toxine semble permettre la croissance optimale et l'adaptation du microorganisme à la toxine en développant ainsi la machinerie enzymatique nécessaire pour leur métabolisation (Fuchs, *et al.*, 2002). La concentration de FB1 ($5\mu\text{g.mL}^{-1}$) correspond selon Niderkorn (2007) à une limite haute de contamination naturelle. Elle permet donc d'évaluer la capacité des isolats microbiens à éliminer la fumonisine présente dans les ensilages fortement contaminés. Des concentrations élevées de toxines sont nécessaires pour

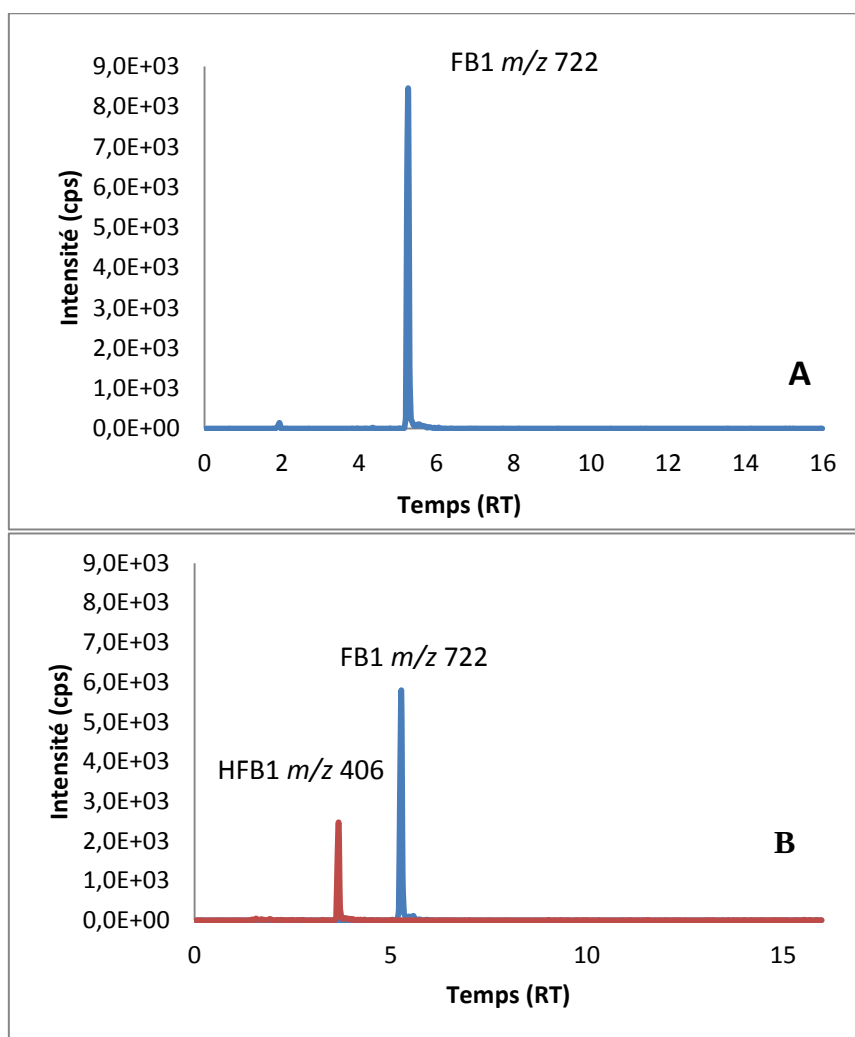


Figure III.6 : Dégradation de FB1 par la souche *W. anomalus* VA19. Profils chromatographiques. **A** :    temps 0. **B** : après 96 h d'incubation. FB1 (TR 5,3 min) HFB1 (TR 3,7 min).

activer les mécanismes microbiens impliqués dans leur dégradation (Fuchs, *et al.*, 2002, Schatzmayr, *et al.*, 2006). Concernant l'analyse LC/MS, nous avons obtenu des temps de rétention de 5,3 pour la FB1 (m/z 722); 3,7 pour la HFB1 (m/z 406) **Figure III.6**. Au cours de l'optimisation méthodologique, nous avons également observé un coefficient de réponse de HFB1 qui est différent en conditions d'hydrolyse. Nous appliquons donc un facteur de correction de 2,8 pour tenir compte de ce phénomène.

La **Figure III.7** montre la cinétique de dégradation de FB1 par la bactérie ATCC 55552. Nous avons observé une diminution de 65% (10 nM) de FB1 dont 52% sont convertis en HFB1. En ce qui concerne la levure ATCC 74269, nous avons également obtenu 82% de réduction de FB1 dont 49% associé à la production de la HFB1. Ces résultats s'expliquent par la présence d'autres composés issus de la dégradation de la FB1 et la HFB1 (tels que N-acetyl HFB1 et 2-keto-HFB1 et CO₂ qui n'avaient pas été mesurés dans notre expérience) produits par ces souches modèles.

Forts de ces résultats, nous avons analysé 15 des 20 isolats sélectionnés précédemment. Nous avons observé une diminution de la FB1 avec des niveaux variables compris entre 6 et 40% de réduction dans les différentes souches. Cette réduction de la teneur de FB1 ne semble cependant pas toujours associée à une activité microbienne de décarboxylation permettant la transformation de la FB1 en HFB1, car nous avons observé et quantifié cette molécule uniquement sur trois des souches étudiées *W. anomalus* VA19 (**Figure III.6**), *L. brevis* N197, *Bacillus* sp. N195 et avec des niveaux très faibles (**Tableau III.6**). Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'une dynamique de dégradation différente de celle reportée par les souches modèles ou par la présence d'un mécanisme de dégradation autre que la décarboxylation (qui transforme la FB1 en HFB1) dans les autres souches présentant une réduction de la FB1 ou par leur capacité à piéger la FB1 dans leur

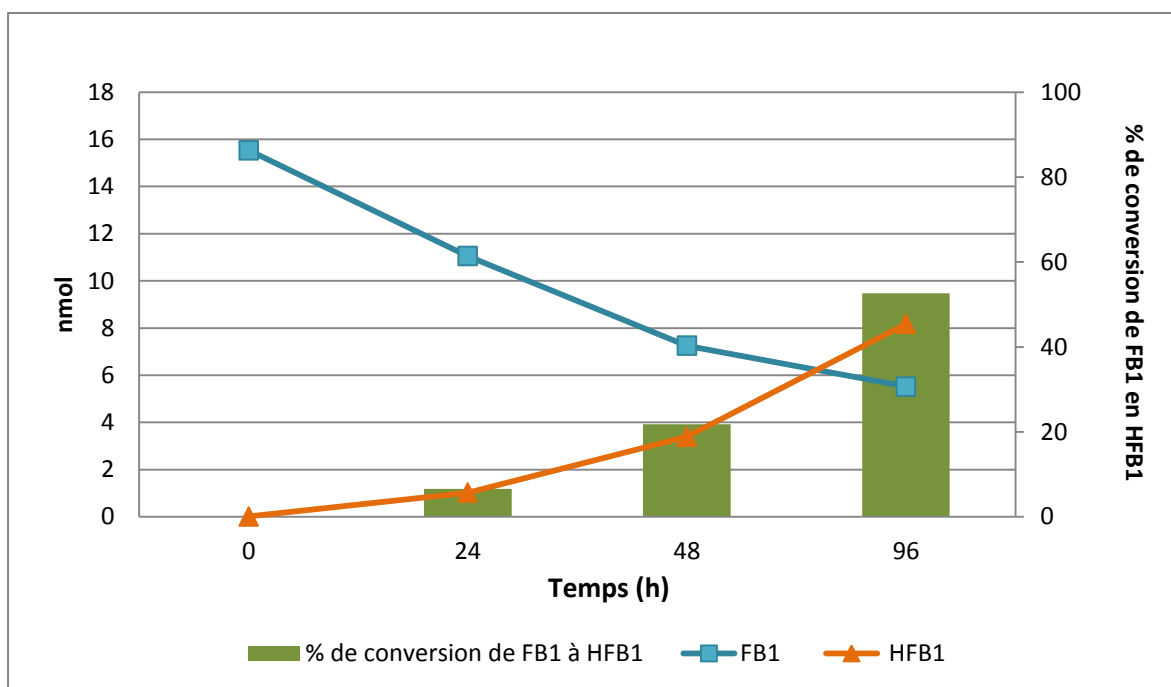


Figure III.7 : Cinétique de conversion de FB1 en HFB1 par la souche ATCC 55552

Tableau III.6 : Dégradation de la FB1 après 96 h par les souches issues de l'ensilage maïs grain

Souche	Diminution de FB1 (%)	Conversion de FB1 en HFB1 (%) ^a	HFB1 apparue (nmol) ^a
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> DA229	9,6	traces	
<i>Saccharomyces paradoxus</i> DA230	14,7	non détectée	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> DA246	6,6	non détectée	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> DA252	11,9	non détectée	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> JU236	14,5	non détectée	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> VA19	38,9	10,8	0,8
<i>Candida glabrata</i> N345	7,1	non détectée	
<i>Candida glabrata</i> N346	6,4	non détectée	
<i>Pichia fermentans</i> N183	6,1	non détectée	
<i>Candida glabrata</i> N353	7,2	non détectée	
<i>Klebsiella oxytoca</i> N186	14,5	non détectée	
<i>Lactobacillus brevis</i> N197	30,4	16,5	1,1
<i>Klebsiella variicola</i> VA26	22	non détectée	
<i>Bacillus</i> sp. N195	32,6	15,6	1,1
<i>Bacillus</i> sp. N339	21,1	non détectée	

a, valeurs calculés en tenant compte du niveau de HFB1 détecté à T0

paroi microbienne. Des études supplémentaires seront nécessaires afin de caractériser ces souches.

Nous avons également examiné la présence du métabolite intermédiaire de dégradation pHFB1 décrit précédemment dans le chapitre II, en repérant des traces de cette molécule (TR : 4,4 ; m/z 564) pour certains isolats. Des études supplémentaires sont envisagées afin d'optimiser les conditions de sa détermination et la recherche d'autres métabolites intermédiaires.

Nous avons constaté que les isolats identifiés comme *W. anomalus* présentent différents profils de diminution de la FB1, surtout quand ils proviennent d'ensilages différents. Cela suggère que la capacité de métaboliser la FB1 est souche dépendante.

Ces niveaux de réduction de la FB1 et la faible détection de HFB1 peuvent être expliqués par deux facteurs :

- La nécessité d'une optimisation des conditions d'incubation pour améliorer l'expression du potentiel de dégradation de la FB1.
- La présence de métabolites partiellement hydrolysés tels que la pHFB1. En effet, l'étude réalisée par Fodor, *et al.* (2007) sur la dégradation de la FB1 par le microbiote du système digestif porcin, reporte de très faibles niveaux de HFB1 (<1%) et la capacité de certains microorganismes à dégrader la FB1 principalement en métabolites partiellement hydrolysés tel que la pHFB1 (49%) en conditions *in vitro* après 3 jours d'incubation. La même équipe a démontré qu'un *consortium* microbien composé notamment d'*Escherichia coli* et *Bacteroides* spp. pouvait dégrader la FB1 en 30% de HFB1 et 20% de pHFB1 (Fodor, *et al.*, 2008). Ces résultats soulignent les forts niveaux de métabolites de FB1 partiellement dégradés par les microorganismes. Il serait donc pertinent de mettre en œuvre des études complémentaires pour bien

quantifier et caractériser les différents métabolites de la dégradation de la FB1.

Finalement, la dégradation de la FB1 observée dans nos travaux pourrait être le résultat d'activités enzymatiques autres que la décarboxylation conduisant ainsi à une métabolisation complète de la FB1 disparue. Cette alternative serait très prometteuse car plusieurs études reportent que la métabolisation de la FB1 en HFB1 n'est pas suffisante pour garantir la perte de la toxicité de la fumonisine (Humpf, *et al.*, 1998). En effet selon Blackwell, *et al.* (1999) le groupement amine de la FB1 a un rôle essentiel dans sa toxicité. Dans ce contexte, des études précédentes ont reporté la capacité de certaines levures (*E. spinifera* et *R. atrovirens*) et bactéries (ATCC 55552 et *Sphingopyxis* sp.) à hydrolyser le groupement amine de la HFB1 par une activité amine oxydase et aminotransferase, respectivement (Duvick, *et al.*, 1998, Blackwell, *et al.*, 1999, Heintz, *et al.*, 2010, Heintz, *et al.*, 2011). Malheureusement des standards de ces métabolites permettant leur quantification ne sont pas commercialement disponibles à ce jour. Nous avons constaté que d'après la littérature disponible, les activités microbiennes impliquées dans l'hydrolyse du groupe amine nécessitent des conditions spécifiques (*e.g.* la présence de coenzymes, du pyruvate) rendant la biodégradation de la FB1 difficile dans un système fermentaire tel que l'ensilage de maïs. De ce fait, la présence des microorganismes issus de cette matrice capables de métaboliser cette toxine constitue une voie intéressante à explorer. Camilo, *et al.* (2000) ont isolé des *Bacillus* spp. à partir de l'ensilage de maïs plante entière capables de réduire la FB1 avec des niveaux compris entre 43 et 83%. Cependant les mécanismes et les métabolites de dégradation n'ont pas été élucidés. Dans notre travail, la levure *W. anomalus* VA19 et les bactéries *L. brevis* N197 et *Bacillus* sp. N195 présentent un fort potentiel dans la dégradation de la FB1 qui pourrait être exploité.

3.5 Utilisation de gènes ciblés impliqués dans la dégradation de la FB1 pour repérer des microorganismes potentiellement dégradants

Un moyen de criblage fiable et rapide pour sélectionner des microorganismes ayant la capacité de métaboliser la FB1 est nécessaire pour pouvoir explorer un grand nombre de souches issues de collections ou isolées d'environnements divers. Dans ce travail, nous avons cherché à explorer la possibilité d'utiliser des marqueurs moléculaires (gènes) impliqués dans l'activité de dégradation de la FB1. Pour cela, nous nous sommes basés sur des gènes déjà décrits dans la littérature. Le gène *FumD* codant une carboxylesterase permet la transformation de la Fumonisine FB1 en HFB1 et le gène *FumI* codant une aminotransferase de classe III, permet la transformation de HFB1 en 2-Keto HFB1 (Heinl, *et al.*, 2010, Hartinger & Moll, 2011). Nous avons pu obtenir une amplification spécifique avec les amorces *FumI* ATCC 55552 F/R avec la souche bactérienne ATCC 55552 et la levure ATCC 74269. Toutefois à quantité d'ADN égale nous avons pour l'ATCC 5552 un Cycle Threshold (CT) de 13,2 et pour la levure nous avons un CT de 29. La courbe de fusion a permis de montrer que ce produit d'amplification était spécifique pour les deux souches et que le Tm est identique entre celui obtenu pour ATCC 55552 et ATCC 74269. Cette différence de Ct pourrait être expliquée par une différence de séquences entre les deux microorganismes sur cette portion du gène amplifié. Pour vérifier cette hypothèse nous avons envoyé à séquencer l'amplicon obtenu avec ces amorces par PCR quantitative pour ces deux microorganismes (ATCC 55552 et ATCC 74269). Nous avons une séquence identique. Nous ne sommes pas en mesure pour l'instant d'expliquer la différence de CT entre les deux microorganismes alors que la séquence de l'amplicon obtenu est identique. L'extraction d'ADN pour la bactérie et la levure est la même, mais peut être que pour la levure cette méthode n'est pas optimale et

introduit des inhibiteurs qui influencent l'efficacité de la polymérase. Les amorces *FumI* ATCC 55552 F/ R ont également été testées sur la souche ATCC 51380 mais n'ont pas permis l'amplification de ce gène. Ces amorces pourront servir lors d'études complémentaires sur la souche ATCC 55552 pour voir comment et dans quelle(s) condition(s) est exprimé ce gène. Pour les autres amorces testées (*FumI* MTA144F/R ; *FumD* MTA 144 R/F) nous n'avons pas obtenu d'amplification spécifique. Nous avons utilisé les amorces du gène *FumI* de la souche ATCC 55552 pour caractériser les isolats candidats mais nous n'avons pas obtenu d'amplification.

Si cette voie de dégradation existe dans les isolats de notre étude, des optimisations des conditions d'amplification pourraient permettre de valider leur présence. Cependant les faibles homologues entre les gènes *FumI* des deux bactéries de référence (*Sphingopyxis* sp. MTA144 et ATCC 55552) illustre la difficulté pour trouver des couples d'amorces et des conditions de PCR à usage universel pour rechercher ces gènes. La faible conservation des séquences génétiques peut inciter à utiliser des amorces dégénérées, mais le succès de cette technique peut être très variable du fait de perte de spécificité. Par ailleurs, les résultats présentés précédemment laissent supposer que d'autres voies de dégradation pourraient être associées à l'activité des isolats issus d'ensilages de maïs grain. L'identification de ces voies nécessitera une étude approfondie des microorganismes sélectionnés.

4. Conclusions

Les ensilages de maïs grain peuvent être considérés comme un vaste réservoir de microorganismes avec des activités enzymatiques spécifiques capables de métaboliser la fumonisine B1. L'approche ciblée basée sur le criblage des microorganismes dégradant la FB1 a permis d'isoler 5 bactéries et 10 levures avec des profils de dégradation de FB1

différents. Parmi ces microorganismes candidats, *L. brevis* N197, *Bacillus* sp. N195 et *W. anomalous* VA19 sont les plus efficaces. Ces trois souches ont été isolées par la méthode d'enrichissement successif avec FB1, puis présélectionnées dans un test de croissance sur milieu minimum contenant la FB1. Cette méthodologie pourra être utilisée pour rechercher d'autres sources de microorganismes capables de dégrader la fumonisine.

Nous sommes particulièrement intéressés par la souche V19 de *W. anomalous* car elle est capable de dégrader jusqu'à 40% de la FB1 (3 nmol) après 4 jours de fermentation, de manière répétable. Il serait pertinent donc de mettre en place des analyses complémentaires pour sa caractérisation (*e.g.* cinétique de dégradation, quantification des métabolites partiellement hydrolysés pHFB1) et l'élucidation des mécanismes responsables de cette transformation de FB1.

Cependant, si nous comparons les niveaux de dégradation de la FB1 obtenus par les souches isolées dans ce travail (de 7 à 40% après 4 jours de fermentation) et ceux que nous avons mesurés dans les ensilages dont elles sont issues (de 54 à 76% après 4 mois de fermentation, voir chapitre II), ils semblent relativement insuffisants pour expliquer le taux élevé de disparition de la FB1 dans ces ensilages. Bien qu'il s'agisse de matrices et de temps d'action différents difficilement comparables, il est probable que la dégradation de la FB1 à des niveaux importants dans les ensilages soit favorisée par des interactions entre les activités de plusieurs espèces de la communauté microbienne (*i.e.* activité synergique) que l'on n'obtient pas avec un isolat pur. L'exploration de la communauté microbienne afin d'identifier un microbiote ou un profil métagénomique associé à la dégradation de la FB1 permettra une meilleure compréhension des processus biologiques globaux liés à la dégradation de la FB1 dans les ensilages de maïs grain.

***Chapitre IV : Analyse globale de la
communauté microbienne
potentiellement associée à la
dégradation de la FB1***

1. Introduction

Actuellement, la plupart des études sur la communauté microbienne des ensilages de maïs ont ciblé les microorganismes cultivables ainsi que les microorganismes majoritaires, sans tenir compte des espèces et communautés faiblement représentées. De ce fait, la métagénomique qui comprend le séquençage exhaustif et l'analyse du contenu génétique d'un échantillon issu d'un environnement complexe permet de caractériser taxonomiquement divers écosystèmes ainsi que d'étudier leur capacité fonctionnelle en proposant *in silico* des gènes putatifs d'intérêt. Cette approche offre donc plusieurs pistes de recherche pour l'étude de la communauté microbienne au cours de l'ensilage de maïs grain, qui reste très peu étudiée à ce jour.

Dans le chapitre II, nous avons constaté une réduction réelle de la FB1 totale dans les ensilages de maïs grain à différents niveaux, notamment après 78 jours de fermentation. De plus, nos résultats ont suggéré la présence d'activités microbiennes impliquées dans cette dégradation. Basés sur ces résultats, nous avons choisi une approche de métagénomique comparée pour l'analyse globale de la communauté microbienne potentiellement associée à la dégradation de la FB1. Pour cela nous avons étudié deux ensilages avec des niveaux de dégradation de FB1 contrastés à deux temps de fermentation (J0 et J78). L'ensilage D dît dégradant et l'ensilage C dît moins dégradant, présentaient respectivement 55% et 28% de réduction de la FB1 après 78 jours de fermentation.

Afin d'y parvenir deux approches métagénomiques étaient possibles ; soit via le séquençage des amplifiats 16S rDNA et 18S rDNA pour les bactéries et les levures, respectivement (amplicon sequencing) ou soit par le séquençage global du métagénome (shotgun). Nous avons privilégié ce dernier car il permettait une analyse sans *a priori* du microbiote, en accédant à un maximum de diversité. Cependant une des limites de cette

Tableau IV.1 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes de référence

	Région	Amorce	Séquence (5'-3')	Taille d'amplicon (pb)	Référence
Bactérie	16S rDNA- V6	V6-F	ATG CAA CGC GAA GAA CCT	~400	Pinto, <i>et al.</i> 2014
		V6-R	TAG CGA TTC CGA CTT CA		
Levure	LSU rDNA- D2	D2-F	AAG MAC TTT GRA AAG AGA G	~250	Pinto, <i>et al.</i> 2014
		D2-R	GGT CCG TGT TTC AAG ACG		
Maïs	MAc1-maïs actine	NP-MAc1F	TCC TGA CAC TGA AGT ACC CGA TTG	94	Uzarowska, <i>et al.</i> 2007
		NP-MAc1R	CGT TGT AGA AGG TGT GAT GCC AGT T		

approche était causée par la présence majoritaire de l'ADN de maïs, pouvant interférer avec nos analyses. C'est pourquoi nous avons mis au point une extraction sélective d'ADN microbien à partir des ensilages de maïs grain préalable à l'analyse métagénomique. Cette stratégie a permis une vision globale du consortium microbien présent et de son évolution au cours de la fermentation. Elle a également donné un premier aperçu de la diversité fonctionnelle pouvant être impliquée dans la dégradation de la fumonisine. La démarche et les résultats de cette approche sont décrits ci-dessous.

2. Procédures expérimentales

2.1 Enrichissement microbien

Nous avons mis au point un procédé pour collecter sélectivement les cellules microbiennes présentes dans les ensilages de maïs. Pour cela, quatre échantillons de 1 g de maïs ensilé ont été homogénéisés, chacun dans 10 mL de PBS stérile (1X ; pH 7,5) pendant 15 min à 50 rpm à température ambiante. Ensuite les tubes contenant ces solutions ont été soumis à des sonications pendant 20 s au bain à ultrasons avec une fréquence de 40 kHz (Branson Bransonic 220, Ultrasonic Cleaner) suivi d'une agitation pendant 90 s. Les suspensions ont été centrifugées à 500 *g* pendant 1 min afin de récupérer le surnageant. Puis les surnageants des quatre tubes ont été regroupés dans un seul tube et centrifugés à 500 *g* pendant 1 min afin d'éliminer les débris de maïs résiduels. Après une dernière centrifugation à 10000 *g* pendant 10 min, le surnageant a été éliminé. Finalement, le culot contenant les cellules microbiennes a été lavé 3 fois avec 5 mL du PBS puis utilisé pour l'extraction d'ADN. Six répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon.

2.2 Extraction de l'ADN microbien

La méthode d'extraction de l'ADN a été sélectionnée après plusieurs tests préliminaires avec différents protocoles décrits dans la littérature, utilisant ou non des kits commerciaux (tel que le kit PowerSoil DNA isolation de MOBIO). L'ADN microbien présent dans les culots récupérés a été extrait par la méthode au CTAB décrite par Noël & Labarère (1987) avec quelques modifications afin d'améliorer le rendement et la qualité de l'extraction (Annexe 1), dont un traitement RNase (RNase A PureLink Invitrogen™) de 30 min à 37°C. Les ADN ont été repris dans 32 µL d'eau Nuclease-Free (GIBCO, Invitrogen™). Des vérifications de la quantité et la qualité de l'ADN microbien ont été réalisées par dosage spectrophotométrique (Nanodrop 1000, Thermo Fischer Scientific) et par migration sur gel d'agarose à 1,5%.

2.3 Validation de la méthode d'enrichissement en ADN microbien

La validation de la méthode d'extraction sélective d'ADN microbien s'avère être une étape clé pour l'analyse métagénomique de la communauté microbienne due à la contamination potentielle par l'ADN du maïs présente dans nos échantillons.

Cette validation a été ainsi réalisée par l'amplification par PCR des gènes de référence présents dans les bactéries (16S rDNA-V6), les levures (LSU rDNA- D2) et le maïs (gène de l'actine de maïs MAc1GenBank : J01238.1).

Les réactions de PCR ont été réalisées avec une polymérase haute-fidélité dans un volume réactionnel de 25 µL (0,3 µM des amorces *sens/antisens*, voir **Tableau IV.1**), tampon Kapa Hifi 1X, 0,3 mM de dNTP et 0,02 U.µL⁻¹ de la Kapa HiFi DNA polymérase (Kapa Biosystems) avec le programme suivant: une dénaturation initiale de 95 °C pendant 5 min, 30 cycles de 98 °C pendant 20 s, 55 °C pendant 35 s, 68 °C pendant 40 s et une élongation

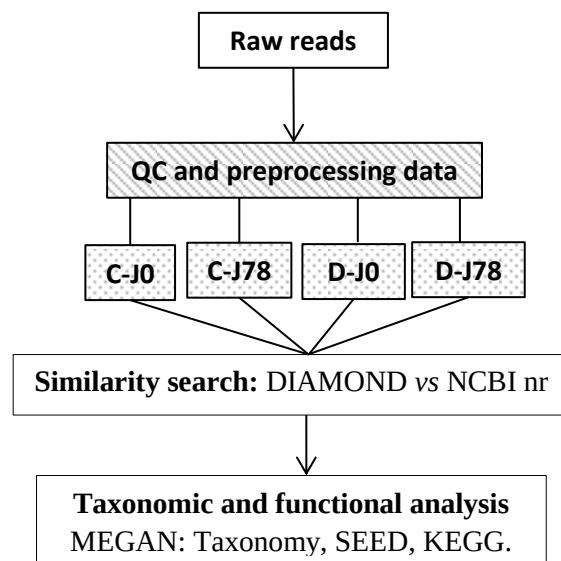


Figure IV.1 : Schéma de la stratégie d'analyse des lectures de séquençage.

finale à 68 °C pendant 5 min. La taille des amplicons obtenus a été évaluée par électrophorèse dans un gel d'agarose 1,5% (Eurobio, France) en utilisant le marqueur de taille 100 pb et 1 Kb (Promega). Les échantillons ne présentant pas la bande correspondant à l'amplicon de l'actine de maïs ont été sélectionnés. Tous les échantillons ont été analysés de cette façon.

2.4 Analyse métagénomique

L'ADN microbien validé a été séquencé directement en « shotgun » sur un séquenceur Illumina HiSeq 2000 en mode pairé et une longueur de lecture de 100 pb.

La création des banques de séquençage et le séquençage ont été réalisés par la société Eurofins Genomics. Nous avons ainsi reçu les données brutes de séquençage dans le format FASTQ standard.

2.5 Pipeline d'analyse bio-informatique

Dans un premier temps, des analyses de contrôle de qualité (trimming des adaptateurs, filtrage et nettoyage des données) ont été mises en place afin d'éliminer les séquences de mauvaise qualité et les séquences contaminantes telles que celles du maïs et du virus PhiX (ADN contrôle d'Illumina) ainsi que les singletons (séquences non pairées).

Nous avons mis en place deux stratégies d'analyse, représentées dans les **figures IV.1** et **IV.2**. D'un côté nous avons réalisé une comparaison des lectures de séquençage sur la base de données protéiques non-redondantes (nr) du NCBI à l'aide du logiciel DIAMOND (Buchfink, *et al.*, 2015). En effet ce logiciel, basé sur une traduction des reads *in silico*, permet d'aligner directement des séquences courtes d'ADN (100-150 pb) plus rapidement que le BLAST (10000X), bien qu'un peu moins sensible (efficacité de 80-90% comparée au BLAST), mais tout aussi informatif. Ensuite, les jeux de données obtenus ont été analysés avec le logiciel MEGAN v.5.10.6 (Huson, *et al.*, 2007, Huson, *et al.*, 2011) permettant de lier les séquences

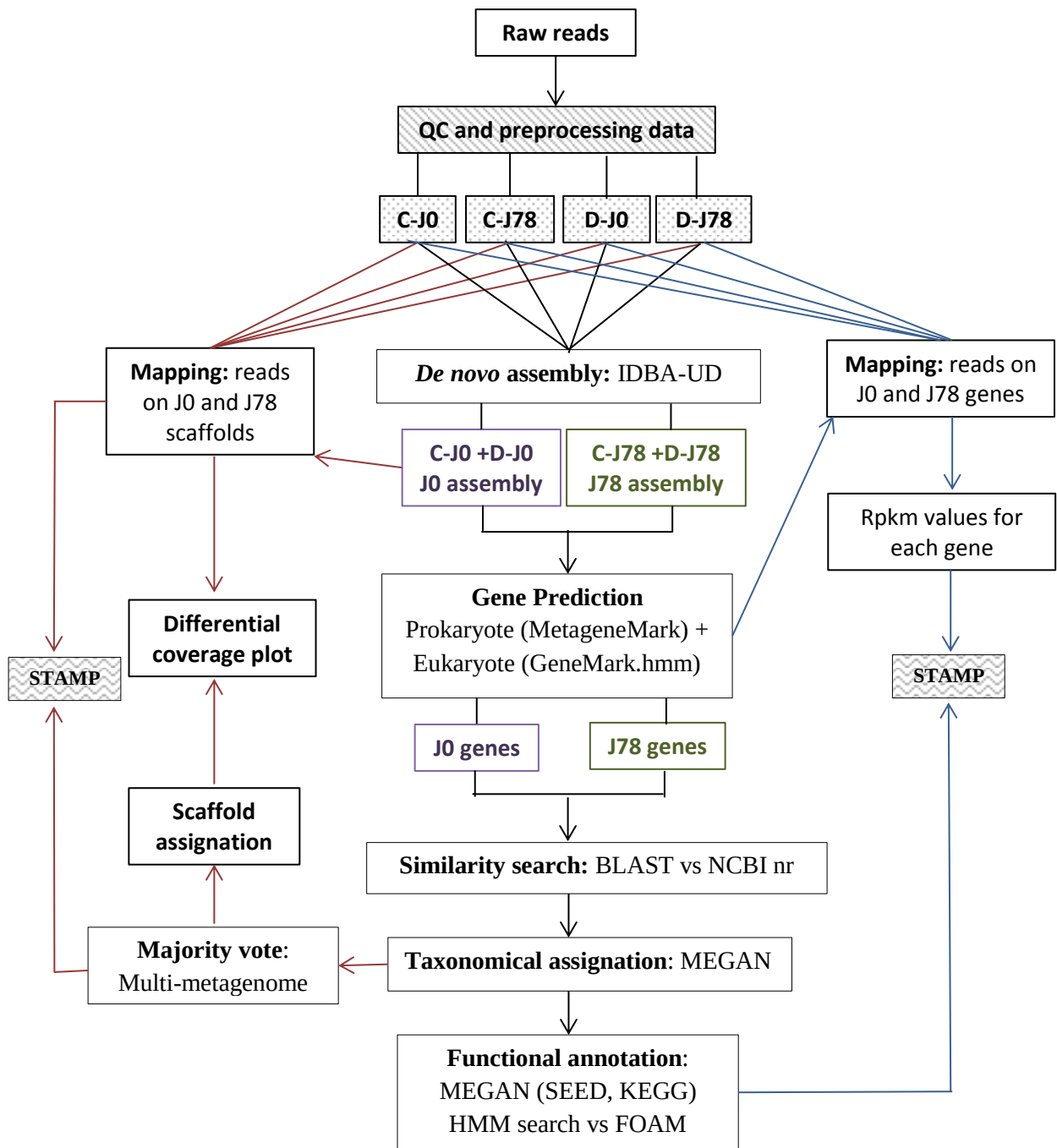


Figure IV.2 : Schéma présentant la stratégie d'analyse à partir des séquences assemblées et des gènes prédits.

métagénomiques avec un panel complet de bases de données protéiques comme SEED ou KEGG (Overbeek, *et al.*, 2005, Kanehisa, *et al.*, 2012) (**Figure IV.1**). Cette analyse a fourni une première vision de la composition taxonomique et fonctionnelle du microbiote.

Parallèlement, un assemblage *de novo* des échantillons issus des ensilages C et D regroupés par le temps de fermentation (J0 et J78) a été réalisé avec le logiciel IDBA-UD (Peng, *et al.*, 2012) afin d'être plus sensible et de prédire des gènes d'intérêt (**Figure IV.2**). En effet ce logiciel est spécialement conçu pour des données métagénomiques composées par des séquences pairées courtes et d'organismes séquencés à des profondeurs différentes. A partir des séquences assemblées (*scaffolds*), nous avons prédit les gènes chez les eucaryotes et les bactéries à l'aide des logiciels GeneMark.hmm et MetageneMark, respectivement (Lukashin & Borodovsky, 1998, Zhu, *et al.*, 2010). Nous avons ensuite comparé les gènes prédits avec la base de données protéiques NCBI nr à l'aide du logiciel BLAST (Altschul, *et al.*, 1997). L'assignation taxonomique des gènes a été réalisée avec le logiciel MEGAN. De plus nous avons utilisé le logiciel GAAS (Angly, *et al.*, 2009) pour examiner l'effet de la taille des génomes afin d'obtenir une estimation quantitative de la composition du métagénome. La répartition taxonomique des séquences identifiées a été visualisée avec le logiciel Krona (Ondov, *et al.*, 2011).

L'annotation fonctionnelle a été réalisée à partir des résultats BLASTnr avec le logiciel MEGAN et les bases de données protéiques SEED et KEGG. En complément, nous avons également comparé les gènes ainsi prédits avec la base de données de gènes FOAM (Functional Ontology Assignments for Metagenomes), spécifique aux métagénomes (Prestat, *et al.*, 2014) à l'aide du logiciel HMMer (Finn, *et al.*, 2011). Cette comparaison basée sur des profils HMM (Hidden Markov model : similarités de familles de protéines plutôt que des similarités de séquences) permet de chercher des homologies de fonction plus lointaines.

Cette analyse a ainsi permis d'estimer la capacité fonctionnelle du métagénome présent dans les ensilages de maïs grain.

Afin de comparer la structure et l'évolution des deux ensilages (dégradant et moins dégradant) en même temps, l'ensemble des *reads* a été aligné sur les *scaffolds* (obtenus préalablement). Cette analyse a permis d'obtenir une couverture différentielle entre les deux ensilages pour chaque temps d'analyse (J0 et J78). De plus, nous avons suivi le protocole « Multi-metagenome-majority vote » proposé par Albertsen, *et al.*, (2013) qui se base sur le vote majoritaire des différentes assignations taxonomiques des gènes pour attribuer le *scaffold* correspondant.

Finalement les *reads* ont été alignés sur les gènes prédits afin d'obtenir les valeurs de Rpk (Reads per kilo base per million mapped reads), permettant de mettre en évidence les différences entre l'ensilage dégradant et moins dégradant pour les voies métaboliques. Enfin, ces différences ont été analysées et visualisées avec le logiciel STAMP (Parks, *et al.*, 2014), proposant divers tests statistiques afin de mettre en évidence des différences biologiques (taxonomique et fonctionnelle).

3. Résultats et discussion

3.1 Stratégie d'analyse de la communauté microbienne

L'amplification du gène *MAC1* dans les échantillons d'ADN microbien a permis de valider l'extraction sélective d'ADN microbien à partir des ensilages de maïs. Cette étape était cruciale car plusieurs auteurs soulignent qu'une des difficultés majeures lors de l'étude de la communauté microbienne présente dans les matrices végétales est causée par la présence majoritaire de l'ADN végétal pouvant masquer l'ADN microbien et biaiser le séquençage et les résultats (Wang, *et al.*, 2008, Sharpton, 2014). Un exemple

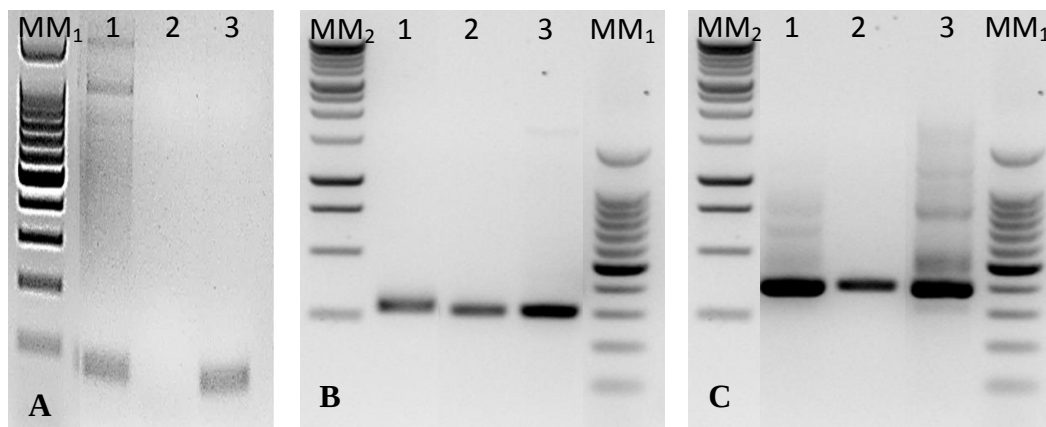


Figure IV.3 : Vérification de l'efficacité de la méthode d'enrichissement microbien.

Pistes 1 : ADN extrait d'un ensilage de maïs sans enrichissement microbien préalable.

Pistes 2 : ADN extrait d'un ensilage de maïs avec la méthode d'enrichissement microbien.

Pistes 3 : ADN de maïs commercial de référence.

MM₁ : Echelle de marqueur de taille « 100 pb »,

MM₂ : Echelle de marqueurs de taille « 1 kb ».

A : Test de la présence d'ADN de maïs par amplification du gène *MAc1* codant l'actine (94 pb),

B : Mise en évidence de la présence des bactéries par amplification de la région V6 (~ 400 pb),

C : Mise en évidence de la présence des levures par amplification de la région D2 (~ 250 pb).

Tableau IV.2 : Rendement et qualité du séquençage à haut débit

Bilan d'analyse FastQC					Alignement sur le génomme du maïs	
Echantillon	Index multiplex	Nombre de séquences après filtre "chastity" ^a Illumina	%Q30	%GC	% de maïs présent	
C-J0	$\frac{R1}{R2}$	ACAGTG	48480999	89	$\frac{52}{53}$	0,36
C-J78	$\frac{R1}{R2}$	GCCAAT	48816121	92	$\frac{38}{38}$	0,12
D-J0	$\frac{R1}{R2}$	CTTGTA	41065377	88	$\frac{52}{52}$	0,34
D-J78	$\frac{R1}{R2}$	GTGAAA	54577086	93	$\frac{37}{37}$	0,05

^a « the ratio of the highest of the four (base type) intensities to the sum of highest two »,

^b aligné sur un génome de maïs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid4577>).

des résultats obtenus est présenté dans la **Figure IV.3**. Après 30 cycles d'amplification, la présence du gène de l'actine de maïs *MAc1* (**Figure IV.3A**) dans les échantillons extraits selon notre méthode d'enrichissement n'est pas détectable, ce qui suggère que cette méthode d'enrichissement microbien préalable à l'extraction d'ADN entraîne l'élimination efficace des tissus provenant du maïs présents dans la matrice. De plus, nous avons confirmé la présence des bactéries (**Figure IV.3B**) et des levures (**Figure IV.3C**) dans ces échantillons. Cependant, nous avons également observé l'amplification de ces séquences (région V6-16S rDNA et région D2-26S rDNA) dans de l'ADN de maïs. Ces résultats peuvent suggérer que soit l'ADN de maïs commercial utilisé dans ces travaux était contaminé par des microorganismes, soit ces amorces présentent un manque de spécificité lorsqu'elles sont utilisées avec de l'ADN trop complexe.

Nos résultats de purification sélective de l'ADN microbien sont en accord avec les travaux de Jiao, *et al.* (2006) et Delmotte, *et al.* (2009) dans lesquelles ces auteurs ont extrait de l'ADN microbien de haute qualité à partir de la phyllosphère végétale à l'aide d'un enrichissement microbien basé sur des centrifugations et des lavages successifs. L'obtention de préparation d'ADN microbien non contaminé par l'ADN de maïs à partir des ensilages a permis ainsi de mettre en place un séquençage sans *a priori* par «Whole Genome Shotgun » permettant d'étudier le microbiote dans sa globalité et d'avoir un aperçu de la structure et du potentiel métabolique d'un microbiote donné (Sharpton, 2014).

3.2 Rendement et qualité du séquençage à haut débit

Nous avons obtenu plus de 41 millions de séquences par échantillon d'une haute qualité avec des niveaux du score phred (Q30) d'au-dessus de 89% (**Tableau IV.2**). Ce score de qualité estime la précision d'identification d'une base au cours du séquençage.

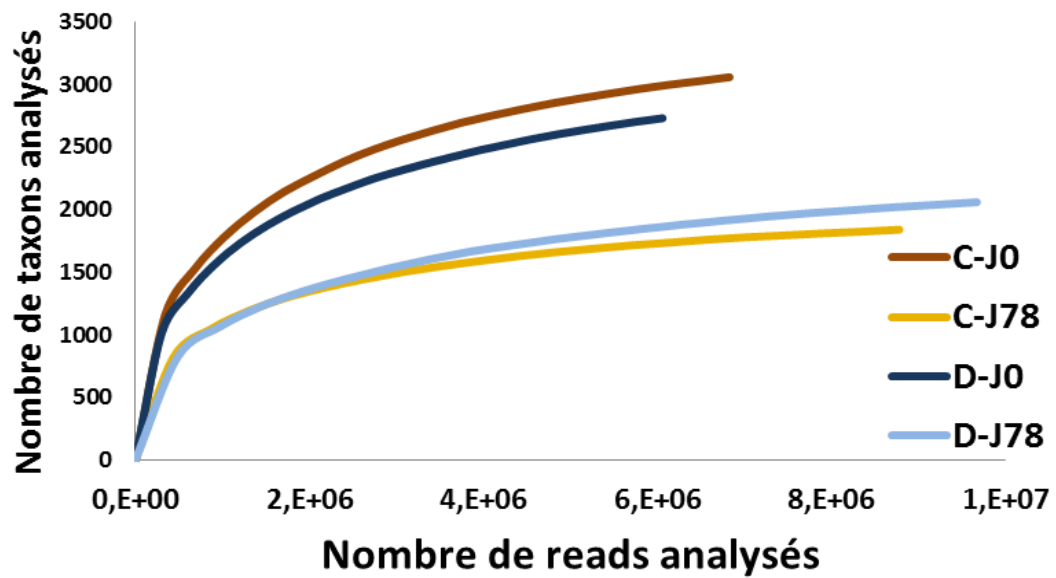


Figure IV.4 : Estimation de la profondeur de séquençage par l'analyse des courbes de raréfaction des échantillons (MEGAN). Axes-x : nombre des séquences analysées, axes-y : nombre des espèces assignées.

Les séquences étaient caractérisées également pour leur très faible niveau de contamination en maïs ($\leq 0,36\%$), après alignement sur un génome de référence du maïs (NCBI, GenBank assembly accession : GCA_000005005.5) (**Tableau IV.2**). Ces résultats confirment ainsi l'efficacité de l'extraction sélective d'ADN mise au point dans ce travail. Nous avons également observé des pourcentages en GC très différents entre les échantillons prélevés à J0 et à J78 pour les deux ensilages, environ 50% et 40% respectivement. Ces résultats peuvent suggérer une composition du métagénome changeante au cours de la fermentation.

De même, des courbes de raréfaction ont été réalisées à partir du nombre d'espèces assignés en fonction du nombre de *reads* analysés pour chaque échantillon (**Figure IV.4**). Cette analyse permet une estimation de la profondeur de séquençage. Nos résultats montrent que dans tous les échantillons analysés dont particulièrement à J78, nous avons obtenu des profondeurs du séquençage suffisantes pour permettre l'accès et l'étude du maximum de diversité (incluant les espèces minoritaires) présents dans l'ensilage de maïs.

De plus, nous avons observé des profils différents entre les deux temps d'analyse J0 et J78, ce qui suggère la diminution de la diversité après 78 jours de fermentation.

3.3 Diversité et évolution de la communauté microbienne au cours de l'ensilage

La diversité et l'évolution microbienne au cours de la fermentation des ensilages de maïs grain ont été étudiées à partir de l'assignation taxonomique des *reads* (DIAMOND) et des *scaffold* (BLAST), permettant d'attribuer une identité aux différentes séquences métagénomiques. Afin d'effectuer des comparaisons plus pertinentes entre les quatre échantillons, nous avons normalisé ces données par le nombre de séquences dont elles sont issues.

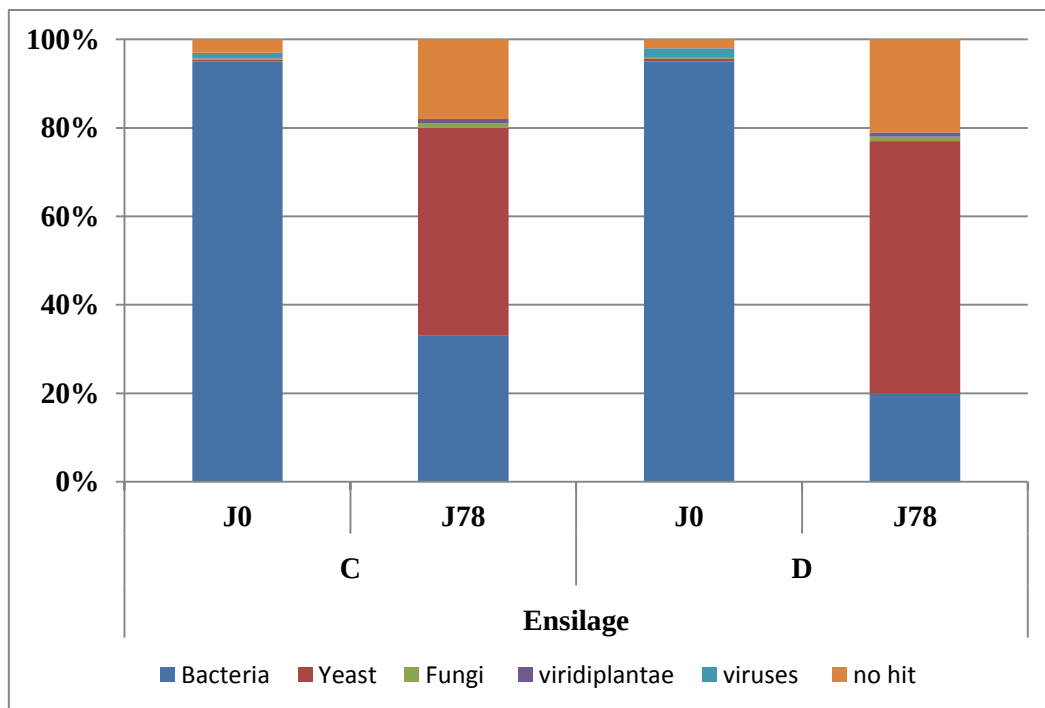


Figure IV.5 : Composition du microbiote présent au cours de l'ensilage de maïs grain. Données obtenues par assignation taxonomique des *scaffolds* (BLAST).

Tableau IV.3 : Composition du microbiote présent au cours de la fermentation pondéré par la taille de génomes des taxons assignés

Ensilage	Temps de fermentation (jours)	Séquences assignées (%)						
		Bacteria	Yeast	Viridiplantae	Fungi	Unknown	Viruses	Others
C & D	0	77	1	3	3	7	4	5
	78	32	35	1	2	17	6	7

Résultats obtenus par BLAST vs NCBI nt et GAAS

Au début de la fermentation (J0), le microbiote des ensilages dégradant (D) et moins dégradant (C) était composé principalement de bactéries. En effet, 95% des séquences (*scaffolds*) ont été attribuées aux bactéries (**Figure IV.5**). Egalement, une minorité des séquences a été attribuée à des levures et à des champignons. La présence de ces derniers pourrait s'expliquer par l'utilisation de maïs présentant de la fusariose pour la mise en place des silos. En revanche, après environ deux mois et demi d'ensilage (J78), un changement important de la proportion bactérie-levure (en nombre des *scaffolds*) a été remarqué avec une diminution des séquences attribuées aux bactéries de 62% et 75% pour l'ensilage C et D respectivement et une augmentation de 46% et 56% des séquences assignées aux levures pour l'ensilage C et D respectivement. De plus, jusqu'à 21% de séquences non-classées ont été également reportées. Huson, *et al.* (2009) ont souligné que jusqu'à 90% des séquences métagénomiques peuvent rester non identifiées du fait que les bases des données génomiques restent toujours incomplètes.

Ces premiers résultats indiquaient ainsi une forte colonisation initiale de bactéries à J0, qui change après 78 jours de fermentation pour évoluer vers une prédominance des levures pour les deux ensilages. Cependant, cette forte augmentation des séquences attribuées aux levures pouvait être liée à la taille plus importante de leur génome par rapport à ceux des bactéries, entraînant ainsi une surestimation de leur présence. C'est pourquoi nous avons pondéré nos données par la taille des génomes des taxons assignés (Angly, *et al.*, 2009) afin d'évaluer leur effet sur nos résultats (**Tableau IV.3**). Bien que nos résultats indiquent un effet de la taille du génome des levures sur la proportion des séquences assignées (32% et 35% des séquences attribuées aux bactéries et levures, respectivement après 78 jours de fermentation) nous avons confirmé la présence importante des séquences assignées aux levures après 78 jours

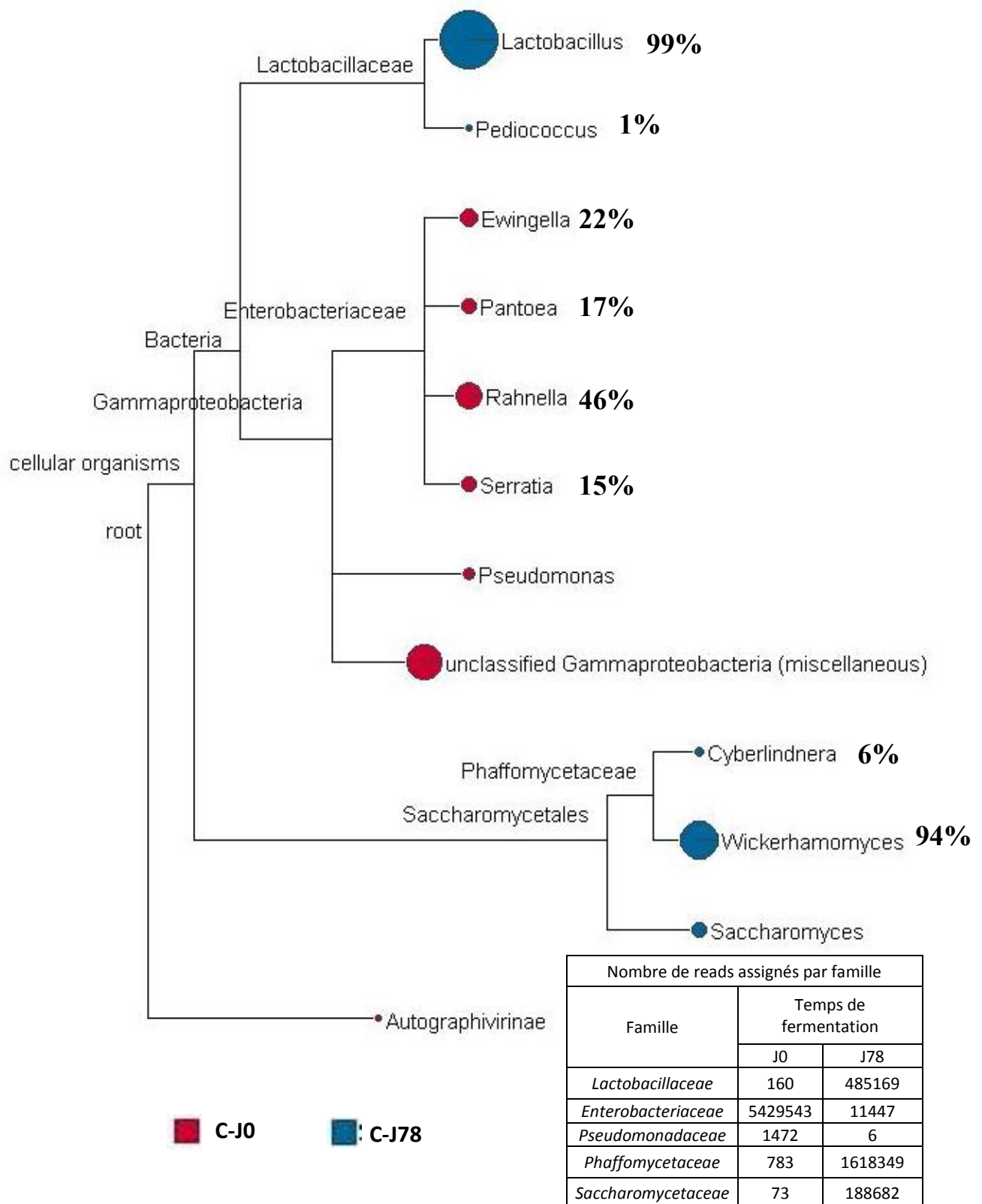


Figure IV.6 : Phylogramme représentant l'évolution de la composition du microbiote de l'ensilage C pendant 78 jours de fermentation. Données obtenues par assignation taxonomique des *reads* (MEGAN). La taille du cercle représente le nombre de *reads* par nœud. Pourcentages du nombre de *reads* assignés pour les genres microbien au sein des familles le plus représentatives.

de fermentation (35% pour les deux ensilages) alors qu'à J0 elles étaient infimes (<1%).

Pour les deux ensilages, nous observons ainsi une colonisation des bactéries et des levures à des niveaux similaires pendant la fermentation du maïs grain, contrairement à ce qui a été reporté par Holzer, *et al.* (2003) et Rossi & Dellaglio (2007). En effet, ces travaux ont montré la prédominance des bactéries au cours de la phase fermentaire de l'ensilage de maïs plante entière. Afin d'étudier plus précisément la composition du microbiote de l'ensilage de maïs grain nous avons donc examiné la composition du microbiote en bactéries et levures pour chaque échantillon d'ensilage.

La **Figure IV.6** résume l'évolution de la communauté microbienne au sein de l'ensilage C. Au début de la fermentation (J0) (cercles rouges), le microbiote bactérien était composé majoritairement de séquences attribuées aux γ -proteobacteria dont notamment des entérobactéries du genre *Rahnella* (46%), *Pantoea* (17%), *Ewingella* (22%), *Serratia* (15%). Nous avons également observé 25% des séquences assignées aux γ -proteobacteria non-classée et une minorité des séquences attribuées aux *Pseudomonas* (3%). Ces résultats sont en accord avec un niveau de GC de 52%. En effet les entérobactéries sont caractérisées par des niveaux de GC de l'ordre de 50-58% (Strapp & Mandel, 1969). En revanche après 78 jours de fermentation (**Figure IV.6**, cercles bleus), nous avons observé un changement important dans la composition du microbiote bactérien ainsi qu'un écosystème très peu diversifié avec la prédominance des séquences attribuées aux bactéries appartenant à la famille de *Lactobacillaceae*, composée principalement par des *Lactobacillus* (99%) et une minorité de *Pediococcus* (1%). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenu par plusieurs études qui ont reporté le remplacement des entérobactéries, présentes à l'origine dans la

phyllosphère du maïs, par des bactéries lactiques telles que *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Lactococcus* capables de se développer dans un milieu acide et anaérobie au cours du processus de l'ensilage (Pahlow, *et al.*, 2003, Rossi & Dellaglio, 2007, Parvin, *et al.*, 2010). Ces bactéries ont un rôle essentiel dans la fermentation spontanée. Elles sont capables de transformer les sucres solubles en acide lactique et autres molécules (*e.g.* acide acétique, éthanol, dioxyde de carbone) selon leur profil fermentaire (Driehuis & Oude Elferink, 2000, Pahlow, *et al.* 2003).

En ce qui concerne les levures, nous avons observé leur forte présence après 78 jours de fermentation (**Figure IV.6**, cercles bleus) avec la présence des séquences attribuées aux levures de la famille des *Saccharomycetaceae* et de *Phaffomycetaceae*, composées majoritairement de *Saccharomyces* (100%) de *Wickerhamomyces* (94%) ainsi que de *Cyberlindnera* (6%), ce qui peut s'expliquer par la capacité de ces levures à se développer dans des milieux acides et anaérobies (Naumov, *et al.*, 2001, Jamalzadeh, *et al.*, 2012). Les levures du genre *Wickerhamomyces* (anciennement connu comme *Pichia*) ont été précédemment isolées à partir d'orge, de l'ensilage d'herbe, de levains, de betteraves (Lowes, *et al.*, 2000, Laitila, *et al.*, 2011, Ruyters, *et al.*, 2015). De plus, les levures *Wickerhamomyces* ont été largement décrites comme agents de biocontrôle par leur capacité à produire les toxines « Mycocins » ou « killer toxins » inhibant la croissance de certains microorganismes tels que les levures du genre *Candida* (Tay, *et al.*, 2014). Cette capacité pourrait expliquer la forte présence de ce genre après 78 jours de fermentation.

La composition du microbiote présent dans l'ensilage D a été également étudiée. Ces résultats montrent de façon générale une évolution du profil microbien similaire au cours du processus d'ensilage.

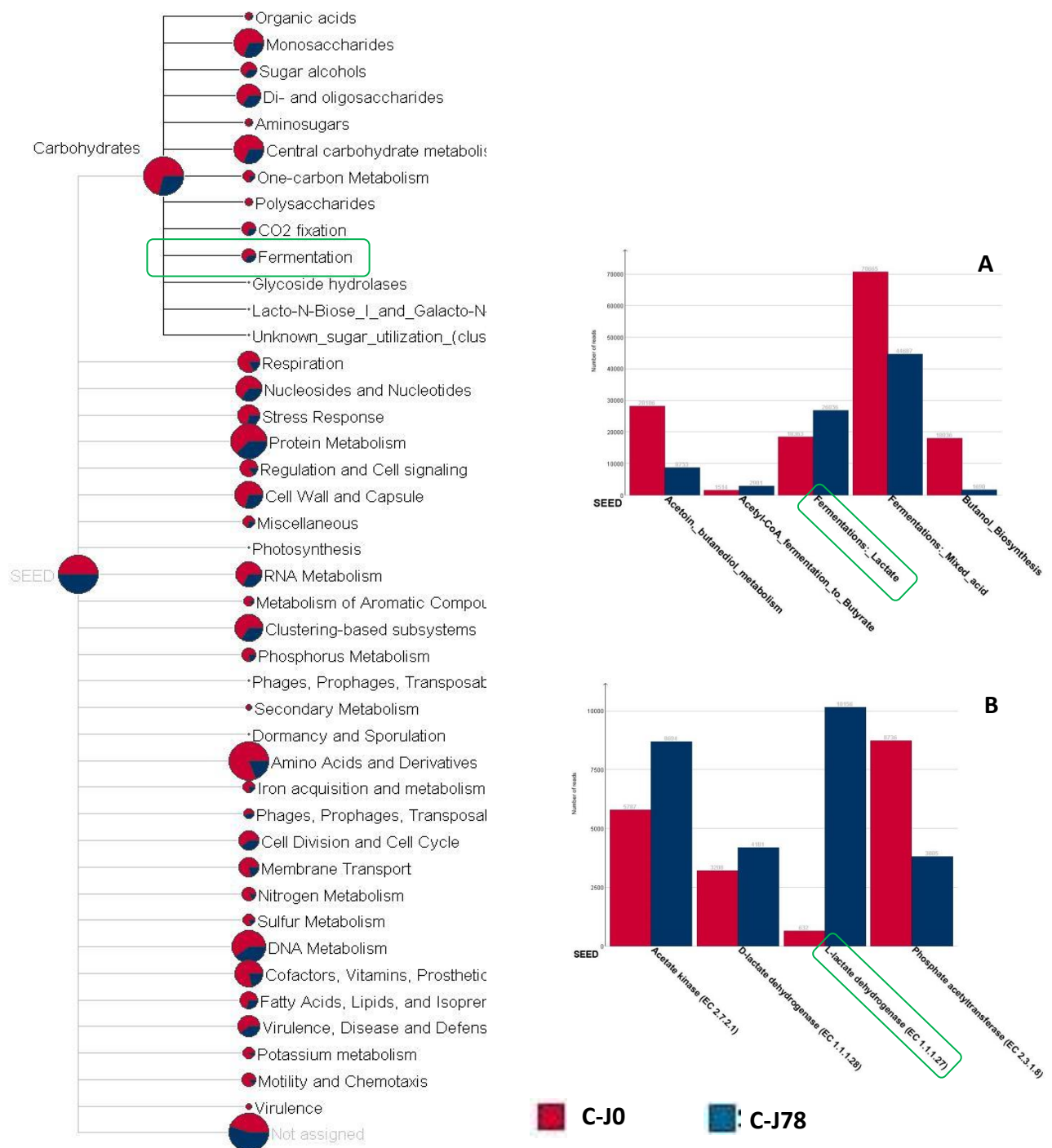


Figure IV.7 : Profil fonctionnel de l'ensilage C au cours de la fermentation (rouge : J0 ; bleu : J78) par regroupement de séquences selon leur catégorie fonctionnelle (SEED).

A : Au sein de la fermentation

B : Au sein de la fermentation du lactate.

Données obtenues par assignation fonctionnelle des séquences (DIAMOND-MEGAN). La taille du cercle représente le nombre des séquences par nœud.

En complément, nous avons mis en place une analyse métagénomique ciblée (amplicon sequencing) pour l'étude des bactéries (16S ARNr) et des levures/fungi (18S ARNr) à partir de mêmes échantillons C et D. Ces analyses sont en cours d'exploitation mais les premiers résultats confirment et valident les résultats obtenus par l'approche « shotgun » et montrent la présence d'un grand nombre d'entérobactéries au début de la fermentation (J0) et des *Lactobacillus* et *Wickerhamomyces* après 78 jours de fermentation. Cette nouvelle approche par « amplicon sequencing » permettra en outre d'approfondir l'étude des « Unités taxonomiques opérationnelles » (OTU) composant ce microbiote.

Premiers résultats de l'étude de la diversité fonctionnelle au cours de la fermentation

L'évolution du microbiote au cours de l'ensilage peut être associée aux changements des conditions de la matrice telles que l'anaérobiose et l'acidification. Ces facteurs peuvent ainsi avoir un rôle clé dans la colonisation et les activités enzymatiques de ces microorganismes. Afin d'avoir un premier aperçu sur la capacité fonctionnelle de l'ensilage C durant la fermentation nous avons analysé nos données (à J0 et J78) sur la base de données SEED, permettant de regrouper les séquences selon des catégories fonctionnelles établies dans cette base (**Figure IV.7**). Ces résultats montrent une diminution de la capacité fonctionnelle après 78 jours de fermentation pour toutes les catégories fonctionnelles étudiées (30), dont principalement celles impliquées dans le métabolisme de sucres et des acides aminés, ce qui reflète la spécialisation de la communauté microbienne de l'ensilage C. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux fonctions impliquées dans le métabolisme des sucres et ses sous-catégories. En effet, ceci inclut des voies métaboliques essentielles pour les microorganismes présents dans les silos permettant le bon développement du microbiote de l'ensilage (*e.g.* Embden-Meyerhoff, d'Entner –Douroff, métabolisme du pyruvate) ainsi que celles impliquées dans la fermentation (Pahlow, *et al.* 2003). Après 78 jours de

fermentation, nous avons observé une augmentation du nombre de séquences (*reads*) pouvant être associées à la fermentation de l'acide lactique, tout particulièrement l'enzyme L-lactate déshydrogénase (**Figure IV.7A et B**). Cette spécificité peut être liée à la composition du microbiote de cet ensilage (C). En effet Pahlow, *et al.* (2003) ont souligné que la production des deux isomères de cette enzyme (L- et D-) dépend de l'espèce de bactérie lactique présente (*e.g.* *L. plantarum* produit les isomères L et D, tandis que *L. casei* produit uniquement l'isomère L). Ces résultats ont été également confirmés par l'analyse des données sur la base de données KEGG (données non présentées).

Ces résultats (basés sur le nombre de *reads* attribués) peuvent suggérer une spécialisation du microbiote lié à un profil métabolique particulier (*e.g.* cas de la L-lactate déshydrogénase, observé ici). Ces résultats sont cependant très préliminaires car il s'agit des séquences (*reads*) assignées. Une analyse à partir des gènes prédits est nécessaire pour suivre convenablement la capacité fonctionnelle au cours de la fermentation.

Nos travaux ont permis pour la première fois une caractérisation du microbiote présent dans l'ensilage de maïs grain par une analyse métagénomique. Bien qu'il s'agisse de seulement deux ensilages donnés, ces résultats permettent d'avoir une première vision globale du microbiote d'ensilage grain et de ses particularités.

A notre connaissance seule deux études précédentes utilisant une approche métagénomique ont été menées sur des ensilages d'herbe, amarante et maïs plante entière. Ces résultats montrent une forte abondance principalement des *Lactobacillus*, *Weissella* et *Leuconostoc* au cours de la fermentation. Cependant ces résultats ne sont pas directement comparables avec ceux de notre étude en raison de matrices végétales et des traitements différents (Eikmeyer, *et al.*, 2013, Grumaz, *et al.*, 2015).

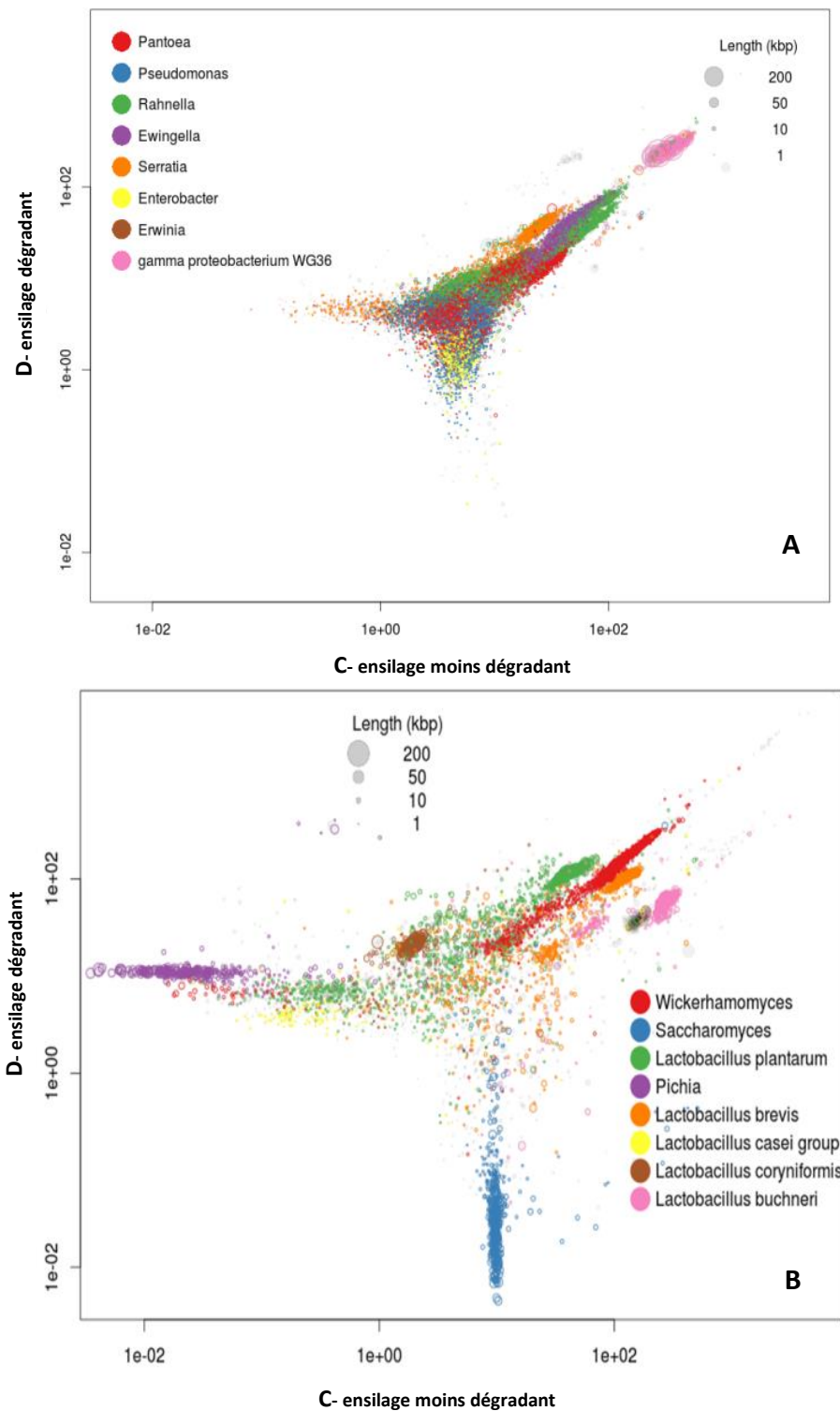


Figure IV.8 : Comparaison du microbiote présent dans l'ensilage dégradant (D) et moins dégradant (C) à J0 et après 78 jours de fermentation.

La taille et la couleur du cercle représente la taille du « *scaffold* » et le taxon assigné, respectivement.

A : J0 et **B :** J78.

Axes-x : couverture de *scaffolds* assignés dans l'ensilage C, axes-y : couverture de *scaffolds* assignés dans l'ensilage D.

Maintenant que le microbiote de l'ensilage de maïs grain est partiellement caractérisé grâce à cette étude, nous pouvons rechercher, par comparaison de l'ensilage présentant des capacités de dégradation de la fumonisine différentes, d'éventuelles particularités génomiques qui pourraient être corrélées à la dégradation de cette toxine.

3.4 Profils métagénomiques associés à la dégradation de la fumonisine B1

Afin de décrypter un microbiote potentiellement associé à la dégradation de la FB1 nous avons comparé le métagénome présent dans un ensilage dégradant (D) et moins dégradant (C). Pour cela nous avons réalisé une assignation taxonomique (à partir des *scaffolds* assignés) et fonctionnelle (à partir des gènes prédits) des deux ensilages (C et D).

Nous avons analysé la distribution et la couverture des *scaffolds* assignés taxonomiquement en fonction de la condition C ou D aux temps J0 et J78 de fermentation (**Figure IV.8**). Ces résultats montrent la présence d'un « core microbiome » pour les deux ensilages, tout au début de la fermentation (J0) composé d'un panel de γ -proteobacteria (**Figure IV.8 A**). Après 78 jours, le microbiome est composé essentiellement de séquences assignées aux *Wickerhamomyces* et de différentes espèces de *Lactobacillus*. Cependant nous avons remarqué la présence de profils microbiens spécifiques à chaque ensilage (**Figure IV.8 B**). En effet nous avons observé la présence des séquences assignées aux *Pichia* (cercles violets) et de *Lactobacillus casei* (cercles jaunes) uniquement dans l'ensilage D considéré comme dégradant, tandis que l'ensilage C, considéré comme moins dégradant est composé de *Saccharomyces* (cercles bleus).

Ces résultats ont également été confirmés par des analyses statistiques entre les deux ensilages à J78 à partir de la valeur Rpkms des gènes prédits (**Figure IV.9**). Les levures *Pichia* sont observées uniquement dans l'ensilage dégradant (D) et leur présence est significativement différente par rapport à l'ensilage C. Ces résultats suggèrent ainsi que le

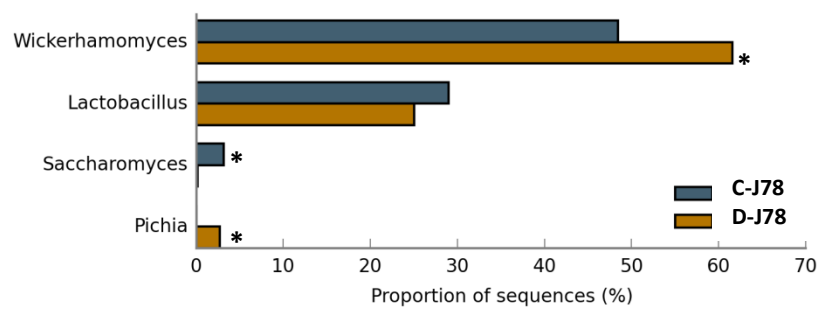


Figure IV.9 : Comparaison du microbiote présent dans l'ensilage dégradant (D) et moins dégradant (C) à J0 et après 78 jours de fermentation.

Données obtenus par analyse statistique des *scaffolds* assignés, par le test G-test + Fisher (P-value < 0,05 STAMP). *Différences significatives.

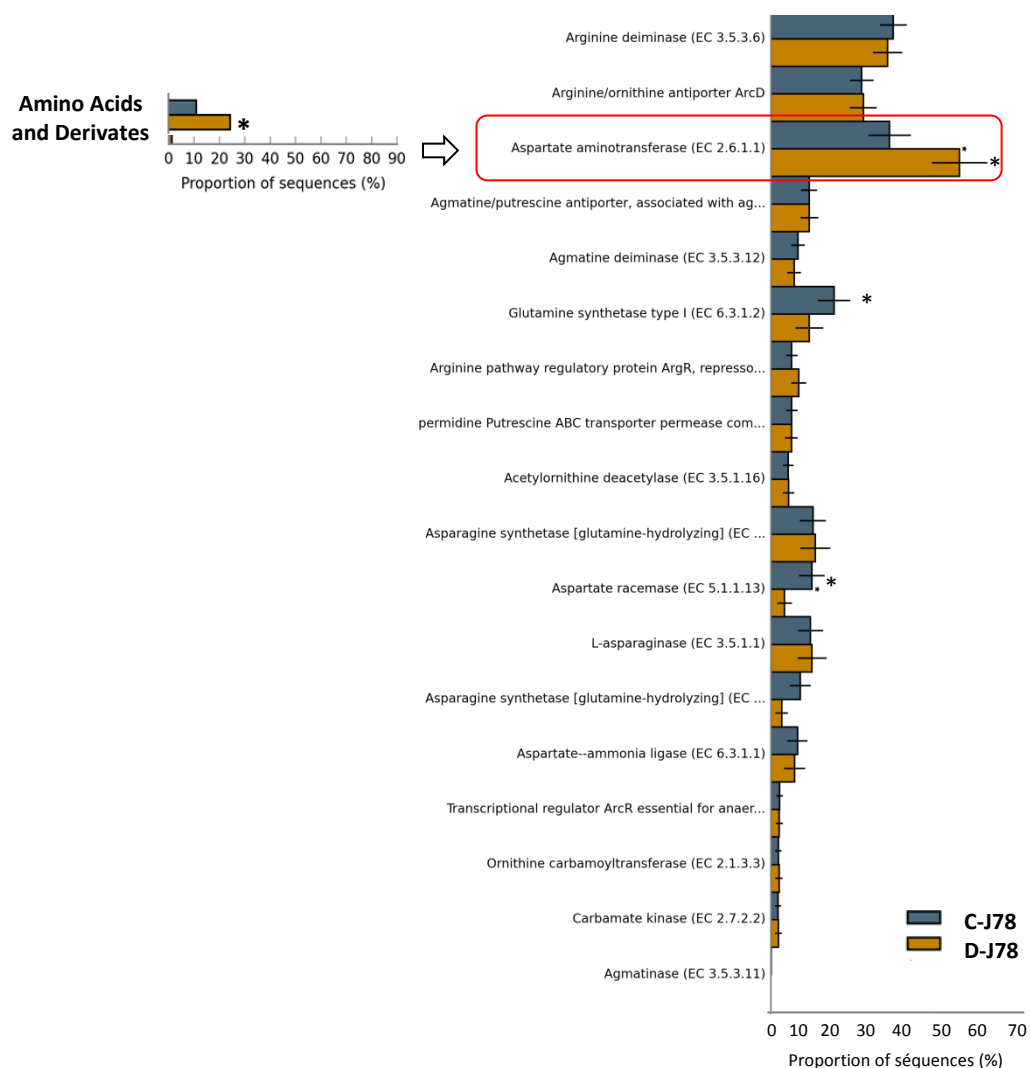


Figure IV.10 : Valeur Rpkkm des gènes prédits d'un ensilage dégradant (D) et moins dégradant (C) impliqués dans le métabolisme d'acides aminés (KEGG).

Données obtenus par analyse statistique des *scaffolds* assignés, par le test G-test + Fisher (P-value < 0,05 STAMP).

*Différences significatives.

microbiote de l'ensilage D (dégradant), ayant comme particularité d'être composé de *Pichia*, *L. casei* et d'une forte présence de *Wickerhamomyces* peut être éventuellement associé à la dégradation de la fumonisine B1.

Afin d'élucider la capacité fonctionnelle de ce microbiote candidat nous avons exploré différentes bases de données fonctionnelles à partir des gènes prédits après 78 jours de fermentation. Par exemple, parmi les trente-six sous-catégories fonctionnelles de la base de données KEGG, nous avons observé que le microbiote de l'ensilage D (dégradant) présentait beaucoup plus de gènes prédits impliqués dans le métabolisme et transport d'acides aminés.

La désamination ou la transamination (selon les groupes microbiens) est considérée comme une activité enzymatique clé pour la détoxification de la FB1 (Blackwell, *et al.*, 1999, Hartinger & Moll, 2011, Heintl, *et al.*, 2011). C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur l'exploration de cette voie métabolique. La **Figure IV.10** montre les enzymes les plus représentatives, impliquées dans le métabolisme d'acides aminés. Nous avons observé que l'ensilage D (dégradant) à J78 présentait une forte abondance de gènes prédits, associés à l'enzyme aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1). Ces résultats ont été également confirmés par l'analyse des données sur la base des données COG (Phylogenetic classification of proteins encoded in complete genomes), dans laquelle nous avons observé une forte abondance des gènes prédits, associés à l'enzyme aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase (COG1448) présentes dans la catégorie [E] correspondant au métabolisme et transport d'acides aminés.

L'aspartate aminotransferase est considérée comme une enzyme ubiquitaire. Cependant elle a été principalement étudiée chez différents microorganismes tels que *Saccharomyces* sp., *Escherichia* sp., *Bacillus* sp. et *Lactococcus* sp. (Yvon, *et al.*, 1997, Moat, *et al.* 2002).

Dernièrement cette enzyme a été également annotée chez une souche de *Wickerhamomyces ciferri* (NCBI, Gene ID : 23468844). Cependant des informations complémentaires quant à sa fonction ne sont pas disponibles. Ces données confirment l'intérêt de cette famille d'enzymes.

Des études précédentes ont mis en évidence deux enzymes microbiennes capables de désaminer la FB1 : une aminotransférase (Heinl, *et al.*, 2010, Hartinger & Moll, 2011, Heinl, *et al.*, 2011) et une amine déshydrogénase (Blackwell, *et al.*, 1999). Ces enzymes cependant requièrent des conditions spécifiques pour assurer leur activité (*e.g.* présence du pyruvate, de coenzymes et d'anaérobiose). De ce fait la recherche de nouveaux microorganismes ainsi que leurs activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de cette toxine semble nécessaire.

Dans ce contexte, l'analyse métagénomique, réalisée dans ce travail, a permis dans un premier temps d'identifier des taxa ainsi que des voies métaboliques plus présentes dans un ensilage dégradant par rapport à un moins dégradant. Dans un deuxième temps cette analyse (à partir des protéines prédites) permettra d'identifier des gènes candidats liés à la dégradation de la FB1.

4. Conclusion

Dans ce travail, nous avons analysé la communauté microbienne présente dans deux ensilages de maïs grain issus de la récolte 2011. Ces résultats montrent la perte de la diversification du microbiote au cours de la fermentation avec la prédominance principalement des *Wickerhamomyces* et *Lactobacillus* après 78 jours de fermentation.

Bien qu'il s'agisse de seulement deux ensilages donnés et que ceux-ci aient été préparés au laboratoire de façon très spécifique (mini silos), ils ont néanmoins été obtenus avec du maïs naturellement contaminé en FB1. L'analyse réalisée au cours de ce travail apporte donc une première image globale de l'évolution et de la diversité fonctionnelle potentielle d'un tel écosystème, très peu exploré jusqu'à ce jour.

Ces résultats recourent ceux obtenus par l'approche souche cultivable (décrit dans le chapitre III), dans laquelle à partir d'un criblage avec des ensilages maïs grain naturellement contaminés en FB1 et issus de la récolte 2013, nous avons isolé principalement des souches de *Wickerhamomyces* (8) capables de réduire la FB1 à différents niveaux. La présence de ces microorganismes est donc validée sur deux années de récolte. De plus, ces résultats permettront de réaliser des analyses croisées avec les données obtenues *in silico*. Cette alternative sera discutée par la suite.

L'analyse comparative entre le métagénome d'un ensilage dégradant (D) et moins dégradant (C) nous a permis de décrypter un microbiote et ses activités potentielles associées à la métabolisation de la fumonisine. Dans ce travail nous avons identifié des levures du genre *Pichia* présentes uniquement dans l'ensilage D, qui est caractérisé pour leur plus forte capacité de dégrader la FB1 (55% après 78 jours). Ces résultats suggèrent ainsi la présence d'un microbiote potentiellement associé à cette dégradation. Cependant ces résultats n'excluent pas la présence d'autres souches de *Wickerhamomyces* et *Lactobacillus* spécifiques de cet ensilage liées à la dégradation de la FB1 car comme cité précédemment, des levures du genre *Wickerhamomyces* présentent un grand potentiel et elles sont capables de s'adapter à ce milieu. Afin d'approfondir ces résultats et d'identifier des microorganismes pouvant être utilisés comme de marqueurs de dégradation de la fumonisine dans les ensilages, l'identification au niveau « espèces » spécifiques à l'ensilage dégradant est nécessaire. Cette

identification permettrait de rechercher ces microorganismes à l'aide d'amorces spécifiques dans les différents lots d'ensilages dégradants de cette étude et par la suite dans tout nouvel ensilage de maïs grain.

A titre d'exemple nous avons mis en évidence la présence des gènes prédits codant l'enzyme aminotransferase, qui semble intéressante à exploiter car, comme cité précédemment, une telle activité est primordiale pour la dégradation de la FB1. Bien que préliminaires, les résultats de l'analyse fonctionnelle, dont notamment des voies métaboliques présentes dans ce microbiote, sont très prometteurs et restent à approfondir. Pour cela deux stratégies peuvent être envisagées ; d'une part nous pourrions cibler des gènes putatifs associés à un ensilage dégradant. Ensuite nous pourrions identifier le *scaffold* (qui a été préalablement assigné taxonomiquement) dont ils sont issus. Cette analyse apportera ainsi l'identification du taxon possédant ce gène d'intérêt. D'une autre part nous pourrions identifier les gènes putatifs présents uniquement dans les espèces spécifiques de l'ensilage dégradant telles que *Pichia*. Afin d'étudier ces gènes, l'ensemble des données pourra être comparé avec les bases des données, incluant les gènes déjà connus pour leur capacité à dégrader la FB1. Heinl, *et al.* (2010) et Hartinger, *et al.* (2011) ont identifié un cluster composant de 11 gènes impliqués dans la dégradation de la FB1.

L'extraction sélective de l'ADN couplée à l'analyse métagénomique mise en place au cours de ce travail semble très adaptée à une matrice telle que l'ensilage de maïs puisque elle a permis l'étude globale du microbiome et son évolution. Cette approche a permis ainsi d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche sur la caractérisation taxonomique et fonctionnelle de cet écosystème et plus particulièrement sur l'élucidation d'un éventuel consortium microbien potentiellement impliqué dans la dégradation de la fumonisine.

Chapitre V : Discussion générale et perspectives

1. Stratégies et résultats majeurs

Les travaux présentés tout au long de ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre de la recherche de solutions pratiques au problème économique et de santé animale que pose la présence de mycotoxines, en particulier les fumonisines, dans les grains de maïs utilisés pour l'alimentation animale. L'analyse de la littérature montre qu'une des méthodes les plus performantes de décontamination des aliments est la dégradation des mycotoxines par des microorganismes sélectionnés. Celle-ci permet un retrait des mycotoxines dans des conditions douces, sans utilisation de substances chimiques nocives et sans perte significative de valeur nutritive et gustative des aliments détoxifiés. L'ensilage qui fait intervenir des bactéries et des levures fermentaires apparaît comme un procédé potentiellement intéressant pour cet objectif de détoxification. Diverses publications confirment cet intérêt (voir Chapitre I), cependant aucun travail publié ne concernait l'ensilage de maïs grain humide qui est un mode de conservation dont l'utilisation se généralise rapidement. Du fait de la nature particulière du grain, riche en amidon par rapport aux plantes entières qui sont plutôt riches en lignocellulose, des microorganismes et des mécanismes de détoxification originaux pourraient être actifs dans ce milieu. Afin de les mettre en évidence nous avons développé une stratégie de recherche basée sur la mise en évidence de la biodégradation des fumonisines, l'identification de microorganismes et de consortia microbiens responsables de la dégradation et l'exploration de voies métaboliques potentiellement mises en jeu.

Ainsi le premier objectif de ce travail a été de démontrer que la FB1, considérée comme la plus abondante des fumonisines, est effectivement dégradée au cours de l'ensilage de maïs grain humide, et pas seulement rendue moins accessible au dosage du fait des modifications de la matrice associées à la fermentation. Pour cela nous avons mis au point

une méthodologie d'analyse biochimique pour quantifier la FB1 libre et la FB1 piégée et pour rechercher des métabolites intermédiaires issus de leur dégradation.

Le second objectif de ce travail était d'identifier des agents microbiens pouvant expliquer cette dégradation. Nous avons mis en place deux stratégies complémentaires : une approche ciblée basée sur l'isolement et le criblage des microorganismes capables de métaboliser la FB1 et une analyse globale de la communauté microbienne au cours de la fermentation. Cette étude s'est basée sur l'analyse comparative du métagénome présent dans deux ensilages avec des niveaux contrastés de dégradation, caractérisés comme fortement et moins dégradants.

L'analyse comparative de métagénomes ainsi que les études *in vitro* sur des microorganismes isolés d'ensilages de maïs grain humide ont apporté plusieurs éléments de réponse sur l'exploration des voies de dégradation des fumonisines impliquées.

Les résultats les plus importants reportés au cours de ce travail sont cités ci-après :

Dégradation de la FB1 dans les ensilages de maïs grain humide :

- Nous avons mis en évidence la dégradation réelle de la FB1 au cours de l'ensilage de maïs grain sur deux années de récolte. En effet nous avons confirmé que la diminution de cette toxine n'est pas expliquée par la complexation de la FB1 dans la matrice.
- Nos résultats suggèrent la présence de métabolites intermédiaires de dégradation de la FB1 tels que la pHFB1 dans certains ensilages.
- Nous avons pu caractériser différents lots d'ensilage pour leur niveau de dégradation de la FB1.

Microorganismes cultivables issus d'ensilages capables de dégrader le FB1 :

- Nous avons isolé un panel de 5 bactéries et 10 levures capables de diminuer la concentration de FB1 à différents niveaux, après 4 jours de culture liquide, dont majoritairement le genre *Wickerhamomyces*. Les levures du genre *Wickerhamomyces* ont été reportées pour la première fois dans l'ensilage de maïs.
- Seules trois souches (*W. anomalus* VA19, *L. brevis* N197 et *Bacillus* sp. N195) se sont avérées capables de métaboliser la FB1 en HFB1 (décarboxylation). D'autres mécanismes microbiens que la décarboxylation pourraient être responsables de la dégradation de la FB1.
- La capacité de métabolisation de la FB1 reportée dans ce travail est souche dépendante.

Communauté microbienne des ensilages de maïs grain humide potentiellement associée à la dégradation de la FB1 :

- Nous avons étudié pour la première fois l'évolution et la diversité fonctionnelle du microbiote présent dans l'ensilage de maïs grain par une analyse métagénomique globale.
- Nous avons reporté un profil métagénomique potentiellement lié à la dégradation de la FB1 au cours de la fermentation. Il est composé de *Lactobacillus casei*, *Wickerhamomyces* spp. et *Pichia* spp.
- Les premiers résultats d'analyse de la capacité fonctionnelle de cet écosystème montrent la présence de gènes prédits codant une Aminotransférase (EC 2.6.1.1) dans les ensilages dégradants. Cette approche ouvre des perspectives d'identification de nouvelles voies métaboliques associées à la dégradation de la FB1.

Dans ce travail nous avons identifié et caractérisé un consortium microbien potentiel associé à la dégradation de la FB1 dans les ensilages de maïs grain humide. La compréhension globale de cet écosystème a été abordée par trois approches complémentaires. Cependant ces résultats ont été obtenus à partir de dispositifs expérimentaux particuliers, des minisilos préparés au laboratoire (en nombre limité) avec du maïs naturellement contaminé en fumonisines, sur deux années de récolte. Les facteurs environnementaux et les paramètres physico-chimiques présents lors de nos essais ne sont probablement pas totalement représentatifs des ensilages conduits en situation réelle par les agriculteurs. De ce fait, afin de valider ces résultats il est nécessaire d'une part d'étudier une gamme plus large d'ensilages et d'autre part d'analyser des ensilages de maïs grain en conditions *in situ* à la ferme. En effet, Chermei, *et al.* (2004) ont reporté des différences nettes des profils fermentaires (teneur d'acide lactique, acide acétique) entre des mini silos *in vitro* et des silos du type boudin au cours de l'ensilage de maïs plante entière. Ces profils différenciés suggèrent ainsi des différences dans la composition et le comportement de la communauté microbienne présente.

2. Confirmation de la dégradation de la fumonisine B1 au cours de l'ensilage de maïs grain humide

Nos travaux ont permis d'étudier pour la première fois l'évolution de la FB1 au cours de l'ensilage de maïs grain humide. En effet toutes les études précédentes effectuées à ce jour ont été consacrées à l'ensilage de maïs plante entière. Pour cela nous avons quantifié les fumonisines libres (FB1) et les fumonisines piégées dans la matrice, qui ont été quantifiées sous la forme de HFB1, après hydrolyse alcaline.

Concernant l'évolution des fumonisines libres, nous avons démontré la diminution de leurs concentrations après quatre mois de fermentation, avec des niveaux de réduction variant entre 35 et 92% pour la récolte 2011 et de 54 et 76% pour la récolte 2013. Des études

précédentes ont montré une évolution très variable selon les auteurs au cours de l'ensilage de maïs plante entière. Boudra & Morgavi (2008), ont observé des niveaux de réduction de FB1 libre jusqu'à 92% après trois mois de fermentation dans des mini silos de maïs plante artificiellement contaminés. Latorre, *et al.* (2015) ont trouvé plutôt des teneurs stables après huit mois de fermentation, alors que Keller, *et al.* (2013) ont observé une augmentation de la teneur de FB1 dans des ensilages de maïs *in situ* après trois mois de fermentation. La diminution de la concentration en FB1 libre que nous avons mesurée dans les ensilages de maïs grain s'est répétée sur plusieurs échantillons de grains provenant d'exploitations différentes et sur deux années différentes de récolte. Elle semble être une spécificité de la composition des ensilages de maïs grain (*e.g.* microbiote présent) et de son évolution au cours de la fermentation.

La HFB1 est considérée comme le premier métabolite d'hydrolyse biologique et chimique éliminant deux groupes TCA de la FB1 (Dall'Asta, *et al.*, 2009). Elle a été aussi reportée comme un métabolite d'hydrolyse microbienne (Duvick, *et al.*, 1998, Blackwell, *et al.*, 1999, Heintz, *et al.*, 2010). Nous pouvions donc nous attendre à une augmentation de la présence de HFB1 libre au cours du temps en parallèle de la diminution de FB1. Cependant nous n'avons pas détecté ce métabolite. Ces résultats peuvent être expliqués soit par le manque de sensibilité de la méthode d'analyse employée, soit par l'instabilité de la HFB1 formée qui était métabolisée directement en d'autres métabolites.

Au-delà de l'évolution des fumonisines libres, plusieurs auteurs ont souligné la forte occurrence des fumonisines dites « masquées » dans le maïs et ses produits dérivés (Dall'Asta, *et al.*, 2009, Dall'Asta, *et al.*, 2009, De Girolamo, *et al.*, 2014). En effet cette toxine peut se complexer avec différentes molécules du maïs telles que l'amidon et des protéines du maïs

comme la zéïne et la prolamine (Seefelder, *et al.*, 2003, Park, *et al.*, 2004), échappant ainsi aux analyses classiques qui ne dosent que la fumonisine libre (Dall'Asta, *et al.*, 2009, Berthiller, *et al.*, 2012, McCormick, 2013). Dall'Asta, *et al.* (2009) ont reporté que seulement 37 à 68% des fumonisines totales sont extractibles par les méthodes classiques dans les échantillons de maïs. Dans ce contexte, il était indispensable de quantifier la fumonisine associée à la matrice dans notre étude. Nos résultats montrent des niveaux de 25 à 40% de FB1 masquée par rapport à la fumonisine totale (FB1 libre + masquée). Cependant, ces niveaux étaient stables au cours de l'ensilage dans la plupart des cas (6 de 8 ensilages analysés). Latorre, *et al.* (2015) ont reporté que la FB1 masquée représente jusqu'à 65% de la fumonisine totale dans l'ensilage de maïs plante entière et que ces niveaux de complexation augmentent au cours de la fermentation. Selon nos résultats, les changements des caractéristiques physico-chimiques du maïs au cours de la fermentation seraient plus propices à cette complexation dans les ensilages de maïs plante entière que dans les ensilages de maïs grain humide.

Le bilan de l'évolution des concentrations en FB1 totale (FB1 libre et FB1 masquée dosée sous forme de HFB1 après hydrolyse alcaline) confirme une réduction réelle de la concentration totale en FB1 au cours de la fermentation dans les ensilages de maïs grain.

Dans le but d'expliquer la nature de cette diminution, la mise en évidence de métabolites intermédiaires de dégradation autres que la HFB1 semble nécessaire. Nous avons donc recherché ces métabolites d'intérêt. Tout d'abord, nous avons cherché à identifier ces métabolites grâce au microorganisme de référence (*Exophiala spinifera* ATCC 74269) connu pour sa capacité à métaboliser la FB1. Ensuite, nous avons recherché ces métabolites dans les ensilages de maïs. Nous avons ainsi pu détecter *in vitro* la production du métabolite

intermédiaire de dégradation pHFB1 par *E. spinifera*. Nous avons aussi pu détecter sa présence à l'état de traces dans les ensilages après quatre mois de fermentation. Des études supplémentaires seront nécessaires afin d'optimiser l'extraction, la détection et la caractérisation de ce métabolite afin de pouvoir suivre son apparition pendant la dégradation de la FB1. Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, ils constituent également une première base pour la recherche des nouveaux métabolites marqueurs de dégradation de la FB1 qui pourront permettre d'élucider de nouveaux mécanismes de transformation de cette toxine.

Finalement les résultats du suivi de l'évolution de la FB1 en tenant compte des formes masquées et la détection d'un métabolite intermédiaire de dégradation convergent pour démontrer qu'il se produit bien une dégradation de la mycotoxine pendant la fermentation. Les ensilages semblent donc favorables au développement d'agents microbiens, adaptés à cette matrice, capables de dégrader la FB1.

3. Mise en évidence des agents microbiens impliqués dans la dégradation de la FB1

Les approches complémentaires culture dépendante et indépendante, menées dans ce travail ont permis une analyse exhaustive des agents microbiens associés à la dégradation de la fumonisine. Ces analyses apportent à la fois une vision de la composition taxonomique de cette matrice ainsi que de son potentiel métabolique (Sharpton, 2014). Plusieurs études se sont basées sur la combinaison de ces deux approches pour leur potentiel effectif dans le criblage de microorganismes liés à des activités spécifiques à partir de différentes matrices (tels que les sols, les écosystème marins, le système digestif) (Ozturk, *et al.*, 2013, Guo, *et al.*, 2014, Stefani, *et al.*, 2015)

L'analyse globale de la communauté microbienne de l'ensilage de maïs grain a principalement montré la structure d'un microbiote potentiellement lié à la métabolisation de la FB1 après 78 jours de fermentation. Ce microbiote se caractérise plus particulièrement par sa composition en levures du genre *Pichia* et de *Lactobacillus* du groupe *casei*. Il était également composé d'autres espèces de *Lactobacillus* et de levures du genre *Wickerhamomyces* spp.

Les levures du genre *Wickerhamomyces* ont été précédemment identifiées dans les produits fermentés tels que l'ensilage d'herbe, le levain de boulangerie et au cours de la fermentation de la bière (Lowes, *et al.*, 2000, Coda, *et al.*, 2011, Laitila, *et al.*, 2011). Elles ont aussi été décrites comme agents de biocontrôle pour leur capacité à produire des toxines connues sous le nom de « Mycocin killer toxin » inhibant le développement des champignons d'altération (Lowes, *et al.*, 2000, Coda, *et al.*, 2011, Satora, *et al.*, 2014). Ces résultats indiquent que *Wickerhamomyces* est à la fois adapté aux conditions d'un ensilage riche en amidon et qu'il présente un potentiel métabolique intéressant. Par ailleurs une souche de *W. anomalus* (VA19) a été isolée au cours de l'approche culture dépendante dans les ensilages de maïs grain et caractérisée pour sa capacité à dégrader la FB1 en conditions *in vitro*. Ces résultats soulignent l'intérêt d'approfondir la recherche sur le potentiel de *Wickerhamomyces* dans la dégradation de la FB1.

Ainsi, l'analyse métagénomique a permis une première caractérisation taxonomique des genres microbiens et dans certains cas d'espèces présentes dans les ensilages de maïs grain humide de notre étude. Ces résultats ont été également validés par l'analyse de métagénomique ciblée (séquençage des amplifiats) pour les bactéries (16S ARNr) et des levures (18S ARNr). Les premiers résultats ont permis d'observer des profils microbiens similaires. L'analyse fine de ces données qui doit se poursuivre permettra d'approfondir

l'identification d'Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs) présentes et leur abondance relative, et ainsi de progresser dans la compréhension de la communauté microbienne associée à la dégradation de la toxine.

La stratégie d'analyse globale choisie a montré que l'extraction sélective d'ADN couplée à une analyse métagénomique développée ici a permis une profondeur satisfaisante de séquençage et l'accès à un maximum de diversité. Cependant une des limites de notre étude pourrait justement être liée à l'étape d'enrichissement microbien préalable à l'extraction d'ADN, qui pourrait avoir favorisé la perte d'une partie des cellules microbiennes présentes dans cette matrice. Il semble pertinent de réaliser une analyse métagénomique ciblée (séquençage d'amplifiats 16S ARNr et 18S ARNr) à partir de l'ADN génomique total présent dans l'ensilage de maïs (maïs + microorganismes) afin de vérifier que l'on n'a pas perdu une partie de la communauté microbienne lors de l'étape de purification. Ceci permettrait de valider définitivement notre stratégie d'analyse.

En ce qui concerne l'analyse fonctionnelle du métagénome présent dans les ensilages de maïs, ces travaux ont apporté plusieurs pistes de recherche sur les mécanismes potentiels de biodégradation de la FB1. Nous avons par exemple observé que dans les ensilages avec un fort niveau de dégradation de la FB1, les niveaux de gènes prédits associés à l'activité aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1) étaient le plus important. La désamination ou la transamination (selon les groupes microbiens) est considérée comme une activité enzymatique clé pour la détoxification de la FB1 (Blackwell, *et al.*, 1999, Hartinger & Moll, 2011, Heintl, *et al.*, 2011). Ces premiers résultats sont encourageants et méritent d'être approfondis, également pour d'autres voies métaboliques. En effet, cette approche via l'assignation taxonomique et la prédiction des gènes pourrait être une première base pour la prospection des microorganismes et des gènes candidats.

4. Conclusions et perspectives

L'utilisation d'agents microbiens capables de dégrader les mycotoxines comme additifs dans les ensilages pourrait augmenter le potentiel naturel de dégradation de cet écosystème et permettre de garantir une maîtrise du risque mycotoxique dans l'alimentation animale. Les résultats obtenus au cours de ce travail ouvrent plusieurs perspectives pour finaliser l'identification et la caractérisation d'un tel inoculum microbien capable de dégrader la FB1.

i) Dans un premier temps, il sera nécessaire d'optimiser les conditions et le rendement de dégradation de la FB1 *in vitro* par la souche candidate *W. anomalus* VA19. Par la suite, cette souche pourra être inoculée dans des ensilages de maïs naturellement contaminé en FB1 (mini silos) afin d'évaluer son aptitude à se développer et à améliorer l'efficacité de biotransformation de la FB1 lors de la fermentation. Ces travaux permettront ainsi de caractériser les mécanismes de dégradation de la FB1 par cette souche et d'évaluer son efficacité réelle *in situ*.

ii) Dans un deuxième temps, le génome de *W. anomalus* VA19 pourra être séquencé et comparé d'une part aux génomes de référence pour cette espèce disponibles sur par exemple la base de données NCBI et d'autre part, sur les jeux de données métagénomiques de l'ensilage dégradant (shotgun et amplicon sequencing) assignés à *Wickerhamomyces* spp. Cette analyse permettra d'identifier et cibler des particularités génomiques pouvant être associées à la capacité de la dégradation. De plus, nous pouvons également envisager de développer des amorces spécifiques de cette souche afin de les utiliser comme marqueur de dégradation dans les ensilages de maïs.

iii) Comme décrit précédemment, nos travaux ont montré la présence d'un microbiome potentiellement associé à la dégradation de la FB1. Nous pouvons réaliser une analyse approfondie (en utilisant les données de shotgun et amplicon) pour déterminer les espèces assignées à l'ensilage dégradant, particulièrement les espèces du genre *Pichia* (assignés uniquement dans l'ensilage dégradant). Une fois ces espèces identifiées, il sera possible de rechercher à l'aide d'amorces spécifiques si ces microorganismes sont toujours présents dans les différents lots d'ensilages dégradants obtenus dans cette étude (issus de la récolte 2011 et de la récolte 2013). Ceci permettra ainsi de les valider comme marqueurs de dégradation. En effet ces outils pourraient permettre de suivre le développement de ces espèces dans les ensilages et ainsi de servir d'indicateur précoce du potentiel de dégradation de la FB1 dans des ensilages.

iv) L'analyse différentielle approfondie des voies métaboliques va permettre d'identifier des gènes putatifs associés à l'ensilage dégradant (*e.g.* le gène codant l'aspartate aminotransférase reporté ici). Comme ces gènes putatifs ont été prédits sur des *scaffolds* (séquences assemblées) qui ont été assignées taxonomiquement nous pourrions identifier les microorganismes possédant ce gène putatif. Nous pourrions par la suite comparer la séquence codant le gène d'intérêt avec les bases de données. L'ensemble de ces données contribuera principalement à identifier les microorganismes (putatifs) capables de dégrader la FB1 et fournir des marqueurs moléculaires de cette dégradation. Les gènes d'intérêt pourront aussi être recherchés dans le génome de *W. anomalus* VA 19. Ces analyses apporteront éventuellement des éléments de réponse sur les mécanismes de dégradation de la souche *W. anomalus* VA19. Toutefois, les résultats obtenus par ces prédictions nécessiteront d'être validés *in vitro*.

v) À long terme, il sera nécessaire de caractériser la fonction des gènes candidats *in vitro*. Par exemple, si les gènes potentiellement impliqués dans la dégradation de la FB1 chez *W. anomalus* VA19 (ou par les autres microorganismes candidats issus de cette étude) peuvent être identifiés, ils pourront ensuite être validés par inactivation et surexpression chez *W. anomalus* VA19 ou expression hétérologue chez d'autres espèces proches. Heinl, *et al.* (2010) ont validé les gènes *FumD* et *FumI* impliqués dans la décarboxylation et la désamination de FB1 de *Sphingopyxis* sp. MTA144, par une expression hétérologue de ces gènes et l'étude de l'effet de ces enzymes impliquées dans la dégradation de la FB1 chez les souches recombinantes.

La recherche des nouveaux agents microbiens capables de dégrader les mycotoxines dont la fumonisine B1 est un sujet porteur car, l'utilisation de ces agents comme additifs dans les aliments, pourrait permettre la décontamination de ces mycotoxines de façon irréversible dans les ensilages et ainsi contribuer à résoudre le problème du risque mycotoxique dû à la fumonisine chez les animaux. Cependant, les agents microbiens ainsi identifiés doivent n'avoir aucune toxicité ou dangerosité associée pour pouvoir être utilisés ainsi comme additifs.

Références bibliographiques

- Abrunhosa L, Serra R & Venancio A (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J Agric Food Chem* **50**: 7493-7496.
- Abrunhosa L, Paterson RRM & Venâncio A (2010). Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* **2**: 1078-1099.
- Abrunhosa L, Inês A, Rodrigues AI, Guimarães A, Pereira VL, Parpot P, Mendes-Faia A & Venâncio A (2014). Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *Int J Food Microbiol* **188**: 45-52.
- AFSSA (2004). Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments AFSSA. Available at : <http://www.afssa.fr/Documents/ALAN-Ra-ensilage.pdf>
- Akondi KB & Lakshmi VV (2013). Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. *OMICS* **17**: 61-70.
- Alberts JF, Gelderblom AFSSA (2004). Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments AFSSA. Available at : <http://www.afssa.fr/Documents/ALAN-Ra-ensilage.pdf>
- Alberts JF, Gelderblom WC, Botha A & van Zyl WH (2009). Degradation of aflatoxin B(1) by fungal laccase enzymes. *Int J Food Microbiol* **135**: 47-52.
- Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, Nielsen KL, Tyson GW & Nielsen PH (2013). Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nature Biotechnology* **31**: 533-538.
- Alonso VA, Pereyra CM, Keller LA, Dalcero AM, Rosa CA, Chiacchiera SM & Cavaglieri LR (2013). Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J Appl Microbiol* **115**: 637-643.
- Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman D (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Anderson IC & Cairney JW (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* **6**: 769-779.
- Angly FE, Willner D, Prieto-Davo A, *et al.* (2009). The GAAS metagenomic tool and its estimations of viral and microbial average genome size in four major biomes. *PLoS Comput Biol* **5(12)**: e1000593.
- Ashbell G & Weinberg Z (2006). Silage production and utilization. Food and Agriculture Organization.
- Awad WA, Ghareeb K, Bohm J & Zentek J (2010). Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **27**: 510-520.
- Bartók T, Szécsi A, Szekeres A, Mesterházy A & Bartók M (2006). Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM* **20**: 2447-2462.

- Beck T (1972). The quantitative and qualitative composition of the lactic acid bacteria flora of silage. *Landwirtschaftliche Forschung* **27**: 55-63.
- Beeton S & Bull AT (1989). Biotransformation and detoxification of T-2 toxin by soil and freshwater bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 190-197.
- Benedetti R, Nazzi F, Locci R & Firrao G (2006). Degradation of Fumonisin B1 by a Bacterial Strain Isolated from Soil. *Biodegradation* **17**: 31-38.
- Berthiller F, Schuhmacher R, Adam G & Krska R (2009). Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**: 1243-1252.
- Berthiller F, Crews C, Dall'asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, Oswald I, Seefelder W, Speijers G & Stroka J (2012). Masked mycotoxins: A review. *Molecular nutrition & food research* **57**: 165-186.
- Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G & Vleggaar R (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 743-745.
- Blackwell BA, Gilliam JT, Savard ME, David Miller J & Duvick JP (1999). Oxidative deamination of hydrolyzed fumonisin B(1) (AP(1)) by cultures of *Exophiala spinifera*. *Natural toxins* **7**: 31-38.
- Boguhn J, Neumann D, Helm A, Strobel E, Tebbe CC, Danicke S & Rodehutsorda M (2010). Effects of concentrate proportion in the diet with or without *Fusarium* toxin-contaminated triticale on ruminal fermentation and the structural diversity of rumen microbial communities in vitro. *Arch Anim Nutr* **64**: 467-483.
- Borreani G, Tabacco E & Cavallarin L (2007). A new oxygen barrier film reduces aerobic deterioration in farm-scale corn silage. *J Dairy Sci* **90**: 4701-4706.
- Boudra H & Morgavi DP (2008). Reduction in fusarium toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time. *J Agric Food Chem* **56**: 4523-4528.
- Brodehl A, Moller A, Kunte HJ, Koch M & Maul R (2014). Biotransformation of the mycotoxin zearalenone by fungi of the genera *Rhizopus* and *Aspergillus*. *FEMS Microbiol Lett* **359**: 124-130.
- Brusetti L, Borin S, Mora D, Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C & Daffonchio D (2006). *Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling*. *FEMS Microbiology Ecology* **56** (1): 154-164.
- Bryła M, Roszko M, Szymczyk K, Jędrzejczak R & Obiedziński MW (2016). Fumonisins and their masked forms in maize products. *Food Control* **59**: 619-627.
- Buchfink B, Xie C & Huson DH (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* **12**: 59-60.
- Cai L, Ye L, Tong AHY, Lok S & Zhang T (2013). Biased Diversity Metrics Revealed by Bacterial 16S Pyrotags Derived from Different Primer Sets. *PLoS ONE* **8**: e53649.
- Camilo SB, Ono CJ, Ueno Y & Hirooka EY (2000). Anti-*Fusarium moniliforme* activity and fumonisin biodegradation by corn and silage microflora. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **43**: 159-164.

- Castoria R, Mannina L, Pinedo-Rivilla C, Duran-Patron R, de Felice D, Maffei F, Sobolev A, Ritieni A & Ferracane R (2011). Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11. *J Agric Food Chem* **59**: 11571-11578.
- Cheli F, Campagnoli A & Dell'Orto V (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology* **183**: 1-16.
- Chen YS, Yanagida F & Shinohara T (2005). Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology* **40**: 195-200.
- Cheng B, Wan C, Yang S, Xu H, Wei H, Liu J, Tian W & Zeng M (2010). Detoxification of deoxynivalenol by *Bacillus* strains. *Journal of Food Safety* **30**: 599-614.
- Cherney DJ, Cherney JH & Cox WJ (2004). Fermentation characteristics of corn forage ensiled in mini-silos. *J Dairy Sci* **87**: 4238-4246.
- Chulze SN (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **27**: 651-657.
- Ciegler A, Lillehoj EB, Peterson RE & Hall HH (1966). Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl Microbiol* **14**: 934-939.
- Coda R, Cassone A, Rizzello CG, Nionelli L, Cardinali G & Gobbetti M (2011). Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect during Storage of Wheat Bread. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 3484-3492.
- Colvin BM & Harrison LR (1992). Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia* **117**: 79-82.
- Cserhádi M, Kriszt B, Krifaton C, Szoboszlay S, Háhn J, Tóth S, Nagy I & Kukolya J (2013). Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. *International Journal of Food Microbiology* **166**: 176-185.
- Dalié DKD (2009). Biocontrôle des moisissures du genre *Fusarium* productrices de fumonisines par sélection de bactéries lactiques autochtones de maïs. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Biologie. Université de Bordeaux 1.
- Dalié DKD, Deschamps AM & Richard-Forget F (2010) Lactic acid bacteria-Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* **21**: 370-380.
- Dalié D, Pinson-Gadais L, Atanasova-Penichon V, Marchegay G, Barreau C, Deschamps A & Richard-Forget F (2012). Impact of *Pediococcus pentosaceus* strain L006 and its metabolites on fumonisin biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Food Control* **23**: 405-411.
- Dall'Asta C, Galaverna G, Aureli G, Dossena A & Marchelli R (2008). A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products. *World Mycotoxin Journal* **1**: 237-246.
- Dall'Asta C, Galaverna G, Mangia M, Sforza S, Dossena A & Marchelli R (2009). Free and bound fumonisins in gluten-free food products. *Molecular nutrition & food research* **53**: 492-499.

- Dall'Asta C, Mangia M, Berthiller F, Molinelli A, Sulyok M, Schuhmacher R, Krska R & Galaverna G (2009). Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**: 1335-1345.
- Dall'Asta C, Falavigna C, Galaverna G, Dossena A & Marchelli R (2010). *In vitro* digestion assay for determination of hidden fumonisins in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 12042-12047.
- Danner H, Holzer M, Mayrhuber E & Braun R (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* **69**: 562-567.
- De Girolamo A, Lattanzio VMT, Schena R, Visconti A & Pascale M (2014). Use of liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry for isolation and characterization of hydrolyzed fumonisins and relevant analysis in maize-based products. *Journal of Mass Spectrometry* **49**: 297-305.
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R, von Mering C & Vorholt JA (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 16428-16433.
- Dobritzsch D, Wang H, Schneider G & Yu S (2014). Structural and functional characterization of ochratoxinase, a novel mycotoxin-degrading enzyme. *Biochem J* **462**: 441-452.
- Doebley J (1990). Molecular Evidence and the Evolution of Maize. *Economic Botany* **44**: 6-27.
- Dolci P, Tabacco E, Cocolin L & Borreani G (2011). Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. *Appl Environ Microbiol* **77**: 7499-7507.
- Doohan FM, Brennan J & Cooke BM (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 755-768.
- Doran JB, Aldrich HC & Ingram LO (1994). Saccharification and fermentation of sugar cane bagasse by *Klebsiella oxytoca* P2 containing chromosomally integrated genes encoding the *Zymomonas mobilis* ethanol pathway. *Biotechnology and Bioengineering* **44**: 240-247.
- Doyle MP, Applebaum RS, Brackett RE & Marth EH (1982). Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural Commodities. *Journal of Food Protection* **45**: 964-971.
- Driehuis F, Elferink SJ & Spoelstra SF (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J Appl Microbiol* **87**: 583-594.
- Driehuis F & Oude Elferink SJ (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet Q* **22**: 212-216.
- Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM & te Giffel MC (2008). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J Dairy Sci* **91**: 4261-4271.
- Driehuis F (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science*; **22** (1): 16-34.

- Dunière L (2012). Stratégies de limitation du portage sain des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) par les bovins. Potentiel bio-protecteur des bactéries lactiques en alimentation animale. Thèse de l'Université Blaise Pascal.
- Duvick J, Rood T, Maddox J, Gilliam J, (1998). Detoxification of mycotoxins in planta as a strategy for improving grain quality and disease resistance: identification of fumonisin-degrading microbes from maize. *Dev Plant Pathol*, **13** : 369-381.
- Duvick J (2001). Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environmental health perspectives* **109** (2): 337-342.
- Duvick J, Maddox JR, Gilliam J, Folkerts O, Crasta OR (2002). Compositions and methods for fumonisin detoxification. US Patent 6388171, Pioneer Hi-Bred International (USA).
- Eckard S, Wettstein FE, Forrer HR & Vogelgsang S (2011). Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins (Basel)* **3**: 949-967.
- EFSA (2005). Opinion of the FEEDAP panel on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **J**:223, 1
- EFSA (2009). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific report CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01.
- EFSA (2014). Scientific Opinion on the safety and efficacy of fumonisin esterase (FUMzyme®) as a technological feed additive for pigs. **12(5)**:3667.
- Eikmeyer FG, Kofinger P, Poschenel A, Jünemann S, Zakrzewski M, Heinel S, Mayrhuber E, Grabherr R, Pühler A, Schwab H & Schlüter A (2013). Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. *J Biotechnol* **167**: 334-343.
- El-Nezami HS, Chrevatidis A, Auriola S, Salminen S & Mykkänen H (2002). Removal of common *Fusarium* toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants* **19**: 680-686.
- European Commission (EC), 2005. Commission directive 2005/38/EC of 31 June 2005. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels of *Fusarium* toxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **L 143**:18-26.
- European Commission (EC), 2006. Commission directive 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union* **L 229**:7-9.
- Commission européenne (2006). Recommandation N° 576/2006 de la commission européenne 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 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). *Official Journal of the European Union* **L229**: 7-9.
- Commission européenne (2007). Règlement (CE) No 1126/2007 de la Commission du 28 septembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs. *Official Journal of the European Union* **L255**: 14-17.

- Falavigna C, Cirilini M, Galaverna G & Dall'Asta C (2012). Masked fumonisins in processed food: co-occurrence of hidden and bound forms and their stability under digestive conditions. *World Mycotoxin Journal* **5**: 325-334.
- Filya I, Sucu E & Karabulut A (2004). The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J Appl Microbiol* **97**: 818-826.
- Finn RD, Clements J & Eddy SR (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research* **39**: 29-37.
- Fodor J, Meyer K, Gottschalk C, Mamet R, Kametler L, Bauer J, Horn P, Kovacs F & Kovacs M. (2007). *In vitro* microbial metabolism of fumonisin B1. *Food Addit Contam* **24**: 416-420.
- Fodor J, Balogh K, Weber M, Mézes M, Kametler L, Pósa R, Mamet R, Bauer J, Horn P, Kovács F & Kovács M (2008). Absorption, distribution and elimination of fumonisin B(1) metabolites in weaned piglets. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **25**: 88-96.
- Fuchs E, Binder EM, Heidler D & Krska R (2002). Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food additives and contaminants* **19**: 379-386.
- Fujita S-I, Senda Y, Nakaguchi S & Hashimoto T (2001). Multiplex PCR Using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 3617-3622.
- Gallo A, Giuberti G, Frisvad J, Bertuzzi T & Nielsen K (2015). Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects. *Toxins* **7**: 3057.
- Gao X, Ma Q, Zhao L, Lei Y, Shan Y & Ji C (2011). Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B1, M1, and G1 detoxification. *European Food Research and Technology* **232**: 957-962.
- Garon D, Richard E, Sage L, Bouchart V, Pottier D & Lebailly P (2006). Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 3479-3484.
- Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WF, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R & Kriek NP (1988). Fumonisins-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1806-1811.
- Gollop N, Zakin V & Weinberg ZG (2005). Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 662-666.
- González Pereyra ML, Pereyra CM, Ramírez ML, Rosa CAR, Dalcero AM & Cavaglieri LR (2008). Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentina. *Letters in Applied Microbiology* **46**: 555-561.
- González Pereyra ML, Chiacchiera SM, Rosa CAR, Sager R, Dalcero AM & Cavaglieri L (2011). Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**: 1474-1481.

- Grenier B & Oswald I (2011). Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin Journal* **4**: 285-313.
- Grumaz C, Wiese F & Sohn K (2015). Metagenome analyses for the optimization of the ensiling and biogas process. Annual Report 2014/15. Fraunhofer Institute IGB.
- Guan S, Ji C, Zhou T, Li J, Ma Q & Niu T (2008). Aflatoxin B(1) degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *Int J Mol Sci* **9**: 1489-1503.
- Guan S, He J, Young J, Zhu H, Li X-Z, Ji C & Zhou T (2009). Transformation of trichothecene mycotoxins by microorganisms from fish digesta. *Aquaculture* **290**: 290-295.
- Guo M, Huang K, Chen S, *et al.* (2014). Combination of metagenomics and culture-based methods to study the interaction between ochratoxin a and gut microbiota. *Toxicol Sci* **141**: 314-323.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hamady M & Knight R (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques and challenges. *Genome Res* **19**: 1141-1152.
- Hartinger D, Heidl S, Schwartz HE, Grabherr R, Schatzmayr G, Haltrich D & Moll W-D (2010). Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of an aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B1. *Microbial Cell Factories* **9**: 62.
- Hartinger D & Moll W (2011). Fumonisin elimination and prospects for detoxification by enzymatic transformation. *World Mycotoxin Journal* **4**: 271-283.
- Hartinger D, Schwartz H, Hametner C, Schatzmayr G, Haltrich D & Moll W-D (2011). Enzyme characteristics of aminotransferase FumI of *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**: 757-768.
- Hawar S, Vevers W, Kariab S, Ali BK, Billington R & Beal J (2013). Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* **34**: 502-508.
- He J & Zhou T (2010). Patented techniques for detoxification of mycotoxins in feeds and food matrices. *Recent Pat Food Nutr Agric* **2**: 96-104.
- He P, Young LG & Forsberg C (1992). Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). *Appl Environ Microbiol* **58**: 3857-3863.
- Heidl S, Hartinger D, Thamhesl M, Vekiru E, Krska R, Schatzmayr G, Moll WD & Grabherr R (2010). Degradation of fumonisin B1 by the consecutive action of two bacterial enzymes. *Journal of Biotechnology* **145**: 120-129.
- Heidl S, Hartinger D, Thamhesl M, Schatzmayr G, Moll WD & Grabherr R (2011). An aminotransferase from bacterium ATCC 55552 deaminates hydrolyzed fumonisin B₁. *Biodegradation* **22**: 25-30.
- Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Wickes BL, Schmidt HJ & Walsh TJ (2009). *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **47**: 3091-3097.

- Higa A, Kimura M, Mimori K, Ochiai-Fukuda T, Tokai T, Takahashi-Ando N, Nishiuchi T, Igawa T, Fujimura M, Hamamoto H, Usami R & Yamaguchi I (2003). Expression in cereal plants of genes that inactivate *Fusarium* mycotoxins. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 914-918.
- Higginbotham GE, Mueller SC, Bolsen KK & DePeters EJ (1998). Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* **81**: 2185-2192.
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H & Braun R (2003). The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol* **21**: 282-287.
- Hormisch D, Hormisch D, Brost I, Kohring GW, Giffhorn F, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Färber P, Holzapfel WH (2004). *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov., a fluoranthene and Aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 653-660.
- Huang X (1992). A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics* **14**: 18-25.
- Humpf HU, Schmelz EM, Meredith FI, Vesper H, Vales TR, Wang E, Menaldino DS, Liotta DC & Merrill AH (1998). Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase. Formation of N-palmitoyl-aminopentol produces a toxic metabolite of hydrolyzed fumonisin, AP1, and a new category of ceramide synthase inhibitor. *J Biol Chem* **273**: 19060-19064.
- Huson DH, Auch AF, Qi J & Schuster SC (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* **17**: 377-386.
- Huson DH, Richter DC, Mitra S, Auch AF & Schuster SC (2009). Methods for comparative metagenomics. *Bmc Bioinformatics* **10**.
- Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh HJ, Weber N & Schuster SC (2011). Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res* **21**: 1552-1560.
- Kurtzman CP & Robnett CJ (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 331-371.
- Kwon GS, Sohn HY, Shin KS, Kim E & Seo BI (2005). Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 845-850.
- IARC (1993). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins, Lyon, IARC Press.
- Igawa T, Takahashi-Ando N, Ochiai N, Ohsato S, Shimizu T, Kudo T, Yamaguchi I & Kimura M (2007). Reduced contamination by the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1622-1629.
- Ikunaga Y, Sato I, Grond S, Numaziri N, Yoshida S, Yamaya H, Hiradate S, Hasegawa M, Toshima H, Koitabashi M, Ito M, Karlovsky P & Tsushima S (2011). *Nocardioides* sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**: 419-427.

- Jamalzadeh E, Verheijen PJT, Heijnen JJ & van Gulik WM (2012). pH-dependent uptake of fumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 705-716.
- Jard G, Liboz T, Mathieu F, Guyonvarc'h A & Lebrihi A (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants: Part A* **28**: 1590-1609.
- Jestoi M (2008). Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **48**: 21-49.
- Jiao JY, Wang HX, Zeng Y & Shen YM (2006). Enrichment for microbes living in association with plant tissues. *J Appl Microbiol* **100**: 830-837.
- Jonsson A. & Pahlow G. (1984). Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. *Anim Res Develop* **20**: 7-22.
- Kadivar H & Stapleton AE (2003). Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. *Microb Ecol* **45**: 353-361.
- Takeya H, Takahashi-Ando N, Kimura M, Onose R, Yamaguchi I & Osada H (2002). Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 2723-2726.
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M & Tanabe M (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research* **40**: 109-114.
- Karlovsky P (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural toxins* **7**: 1-23.
- Karlovsky P (2011). Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 491 - 504.
- Karlovsky P (2014). Enzymatic detoxification of mycotoxins for healthy food. <http://www.newfoodmagazine.com>
- Kedera CJ, Plattner RD & Desjardins AE (1999). Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B1 in maize in western Kenya. *Appl Environ Microbiol* **65**: 41-44.
- Keller LAM, González Pereyra ML, Keller KM, *et al.* (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research* **52**: 42-47.
- Kim EK, Scott PM & Lau BPY (2003). Hidden fumonisin in corn flakes. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **20**: 161-169.
- Kim EK, Maragos CM & Kendra DF (2004). Liquid chromatographic determination of fumonisins B-1, B-2, and B-3 in corn silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 196-200.
- Kolosova A & Stroka J (2011). Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal* **4**: 225-256.
- Kosawang C, Karlsson M, Jensen D, Dilokpimol A & Collinge D (2014). Transcriptomic profiling to identify genes involved in *Fusarium* mycotoxin Deoxynivalenol and Zearalenone tolerance in the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea*. *BMC Genomics* **15**: 55.

- Krifaton C, Kriszt B, Risa A, Szoboszlay S, Cserhádi M, Harkai P, Eldridge M, Wang J & Kukolya J (2013). Application of a yeast estrogen reporter system for screening zearalenone degrading microbes. *Journal of Hazardous Materials* **244-245**: 429-435.
- Kriszt R, Krifaton C, Szoboszlay S, Cserhádi M, Kriszt B, Kukolya J, Czéh A, Fehér-Tóth S, Török L, Szőke Z, Kovács KJ, Barna T & Ferenczi S (2012). A new zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 strain. *PLoS One* **7**: e43608.
- Krooneman J, Faber F, Alderkamp AC, Elferink SJ, Driehuis F, Cleenwerck I, Swings J, Gottschal JC & Vancanneyt M (2002). *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 639-646.
- Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, McDonald S & Crews C (2008). Mycotoxin analysis: an update. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **25**: 152-163.
- Laitila A, Sarlin T, Raulio M, Wilhelmson A, Kotaviita E, Huttunen T & Juvonen R (2011). Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**: 75-84.
- Lapalíkar GV, Taylor MC, Warden AC, Scott C, Russell RJ & Oakeshott JG (2012). F(420)H(2)-Dependent degradation of aflatoxin and other furanocoumarins is widespread throughout the actinomycetales. *PLoS ONE* **7**: e30114.
- Latorre A, Dagnac T, Lorenzo BF & Llompart M (2015). Occurrence and stability of masked fumonisins in corn silage samples. *Food Chemistry* **189**: 38-44.
- Lemke SL, Ottinger SE, Ake CL, Mayura K & Phillips TD (2001). Deamination of fumonisin B(1) and biological assessment of reaction product toxicity. *Chem Res Toxicol* **14**: 11-15.
- Ley RE, Harris JK, Wilcox J, *et al.* (2006). Unexpected Diversity and Complexity of the Guerrero Negro Hypersaline Microbial Mat. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3685-3695.
- Li Y & Nishino N (2011). Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology* **110**: 1561-1570.
- Liu DL, Yao DS, Liang R, Ma L, Cheng WQ & Gu LQ (1998). Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Food Chem Toxicol* **36**: 563-574.
- Lowes KF, Shearman CA, Payne J, MacKenzie D, Archer DB, Merry RJ & Gasson MJ (2000). Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1066-1076.
- Lukashin AV & Borodovsky M (1998). GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res* **26**: 1107-1115.
- Magan, N & Olsen, M (2004). *Mycotoxins in Food : Detection and control*. 1st Edition. Woodhead Publishing Ltd.
- Magan N & Aldred D (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol* **119**: 131-139.
- Magan N, Medina A & Aldred D (2011). Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology* **60**: 150-163.

- Mansfield MA, De Wolf ED & Kulda GA (2005). Relationships between weather conditions, agronomic practices, and fermentation characteristics with deoxynivalenol content in fresh and ensiled maize. *Plant Disease* **89**: 1151-1157.
- Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG & van der Lugt JJ (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res* **55**: 197-203.
- Marasas WFO (1995). Fumonisin: their implications for human and animal health. *Natural Toxins* **3**: 193-198.
- Marco D (2010). *Metagenomics: Theory, Methods and Applications*.
- May LA, Smiley B & Schmidt MG (2001). Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 829-841.
- McCormick SP (2013). Microbial detoxification of mycotoxins. *J Chem Ecol* **39**: 907-918.
- McCormick SP, Price NP & Kurtzman CP (2012). Glucosylation and other biotransformations of T-2 toxin by yeasts of the trichomonascus clade. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8694-8702.
- McDonald P, Henderson AR & Heron SJE (1991). The biochemistry of silage. Dans The biochemistry of silage. Marlow: Chalcombe Publications.
- Meca G, Zhou T, Li XZ & Mañes J (2013). Beauvericin degradation during bread and beer making. *Food Control* **34**: 1-8.
- Merrill AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA & Riley RT (2001). Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental Health Perspectives* **109**: 283-289.
- Merrill AH, Liotta DC & Riley RT (1996). Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends Cell Biol* **6**: 218-223.
- Middelhoven WJ & van Baalen AHM (1988). Development of the yeast flora of whole-crop maize during ensiling and during subsequent aerobiosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **42**: 199-207.
- Mirocha CJ, Chen J, Xie W, Xu Y, Abbas HK & Hogge LR (1996). Biosynthesis of fumonisin and aal derivatives by *Alternaria* and *Fusarium* in laboratory culture. *Adv Exp Med Biol* **392**: 213-224.
- Moat A, Foster J, Spector M (2002). *Microbial Physiology*, 4th Edition. Wiley.
- Mokoena MP, Chelule PK & Gqaleni N (2005). Reduction of fumonisin B1 and zearalenone by lactic acid bacteria in fermented maize meal. *Journal of food protection* **68**: 2095-2099.
- Molnar O, Schatzmayr G, Fuchs E & Prillinger H (2004). *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and applied microbiology* **27**: 661-671.
- Morgavi DP & Riley RT (2007). *Fusarium* and their toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact. *Animal Feed Science and Technology* **137**: 199-200.
- Mortensen GK, Strobel BW & Hansen HC (2006). Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three Danish agricultural soils. *Chemosphere* **62**: 1673-1680.

- Moss MO & Long MT (2002). Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Addit Contam* **19**: 387-399.
- Motomura M, Toyomasu T, Mizuno K & Shinozawa T (2003). Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiol Res* **158**: 237-242.
- Naumov GI, Nguyen HV, Naumova ES, Michel A, Aigle M & Gaillardin C (2001). Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *Int J Food Microbiol* **65**: 163-171.
- Niderkorn V, Boudra H & Morgavi D (2006). Binding of Fusarium mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 849-856.
- Niderkorn V (2007). Activités de biotransformation et de séquestration des fusariotoxines chez les bactéries fermentaires pour la détoxification des ensilages de maïs. Thèse, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
- Niderkorn V, Morgavi DP, Pujos E, Tissandier A & Boudra H (2007). Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants* **24**: 406-415.
- Niderkorn V, Morgavi DP, Aboab B, Lemaire M & Boudra H (2009). Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology* **106**: 977-985.
- Oliveira MS, Diel ACL, Rauber RH, Fontoura FP, Mallmann A, Dilkin P & Mallmann CA (2015). Free and hidden fumonisins in Brazilian raw maize samples. *Food Control* **53**: 217-221.
- Ondov BD, Bergman NH & Phillippy AM (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *Bmc Bioinformatics* **12**: 385.
- Onyango M, Wang Y, Nickel O, Zhao C, Zhang X, Hartke A, Hemberger J & Cemica F (2014). First Genome Sequence of Potential Mycotoxin-Degrading Bacterium *Devosia nanyangense* DDB001. *Genome Announc* **2**(5):e00922-14.
- Orsi RB, Corrêa B, Possi CR, Schammas EA, Nogueira JR, Dias SMC & Malozzi MAB (2000). Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research* **36**: 75-87.
- Overbeek R, Begley T, Butler RM, *et al.* (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Research* **33**: 5691-5702.
- Ozturk B, de Jaeger L, Smidt H & Sipkema D (2013). Culture-dependent and independent approaches for identifying novel halogenases encoded by *Crambe crambe* (marine sponge) microbiota. *Sci Rep* **3**: 2780.
- Pahlow G, Muck RE & Driehuis F (2003). Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R.; Muck, R.E.; Harrison, J.H. (Eds.) *Silage science and technology*. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil
- Park JW, Scott PM, Lau BPY & Lewis DA (2004). Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* **21**: 1168-1178.

- Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P & Beiko RG (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **30**: 3123-3124.
- Parvin S, Wang C, Li Y & Nishino N (2010). Effects of inoculation with lactic acid bacteria on the bacterial communities of Italian ryegrass, whole crop maize, guinea grass and rhodes grass silages. *Animal Feed Science and Technology* **160**: 160-166.
- Peng Y, Leung HCM, Yiu SM & Chin FYL (2012) IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* **28**: 1420-1428.
- Persichetti Júnior PAJ, Alméida Júnior GA, Costa C, Meirelles PRL, Silveira JPF, Panichi A, Silva MGB, Factori MA, Cavasano FA & Mendonça SA (2014). Nutritional value of high moisture corn silage in the diet of Holstein cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* **66**: 1495-1503.
- Petchkongkaew A, Taillandier P, Gasaluck P & Lebrihi A (2008). Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *J Appl Microbiol* **104**: 1495-1502.
- Peteri Z, Teren J, Vagvolgyi C & Varga J (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol* **24**: 205-210.
- Picot A (2010). Modulation de la production des fumonisines sur épis de maïs: influence des composantes physiologiques et biochimiques du grain et des événements de contamination multiple. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Biologie. Université Paris-Sud 11.
- Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, Piraux F, Caron D, Lannou C & Richard-Forget F (2011). The dent stage of maize kernels is the most conducive for Fumonisin biosynthesis under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 8382-8390.
- Pinto C, Pinho D, Sousa S, Pinheiro M, Egas C & C. Gomes A (2014). Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE* **9**: e85622.
- Pizzolitto RP, Salvano MA & Dalcero AM (2012). Analysis of fumonisin B1 removal by microorganisms in co-occurrence with aflatoxin B1 and the nature of the binding process. *International Journal of Food Microbiology* **156**: 214-221.
- Popiel D, Koczyk G, Dawidziuk A, Gromadzka K, Blaszczyk L & Chelkowski J (2014). Zearalenone lactonohydrolase activity in Hypocreales and its evolutionary relationships within the epoxide hydrolase subset of a/b-hydrolases. *BMC Microbiol* **14**: 82.
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glössl J, Luschnig C & Adam G. (2003). Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**: 47905-47914.
- Prestat E, David MM, Hultman J, *et al.* (2014). FOAM (Functional Ontology Assignments for Metagenomes): a Hidden Markov Model (HMM) database with environmental focus. *Nucleic Acids Research*.
- Rappe MS & Giovannoni SJ (2003). The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**: 369-394.
- Repedkiene J, Levinskaite L, Paskevicius A & Raudoniene V (2013). Toxin-producing fungi on feed grains and application of yeasts for their detoxification. *Pol J Vet Sci* **16**: 391-393.

- Ricelli A, Baruzzi F, Solfrizzo M, Morea M & Fanizzi FP (2007). Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 785-792.
- Richard E, Heutte N, Sage L, Pottier D, Bouchart V, Lebailly P & Garon D (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology* **45**: 2420-2425.
- Riley RT, Hinton DM, Chamberlain WJ, Bacon CW, Wang EM, Merrill AHJ & Voss KA (1994). Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. *Journal of Nutrition* **124**: 594-603.
- Roig M, Meca G, Ferrer E & Mañes J (2013). Reduction of the enniatins A, A1, B, B1 by an *in vitro* degradation employing different strains of probiotic bacteria: Identification of degradation products by LC-MS-LIT. *Toxicon* **70**: 44-53.
- Roige MB, Aranguren SM, Riccio MB, Pereyra S, Soraci AL & Tapia MO (2009). Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Rev Iberoam Micol* **26**: 233-237.
- Rosenblueth M, Martinez L, Silva J & Martinez-Romero E (2004). *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst Appl Microbiol* **27**: 27-35.
- Rossi F, Torriani S & Dellaglio F (1998). Identification and clustering of dairy propionibacteria by RAPD-PCR and CGE-REA methods. *J Appl Microbiol* **85**: 956-964.
- Rossi F & Dellaglio F (2007). Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 1707-1715.
- Rotter BA, Thompson BK, Prelusky DB, Trenholm HL, Stewart B, Miller JD & Savard ME (1996). Response of growing swine to dietary exposure to pure fumonisin B1 during an eight-week period: growth and clinical parameters. *Nat Toxins* **4**: 42-50.
- Ruyters S, Mukherjee V, Verstrepen KJ, Thevelein JM, Willems KA & Lievens B (2015). Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**: 39-48.
- Rychlik M, Humpf H-U, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H & Lorenz N (2014). Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Research* **30**: 197-205.
- Salawu MB, Warren EH & Adesogan AT (2001). Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 1263-1268.
- Sangare L, Zhao Y, Folly YM, Chang J, Li J, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y & Liu Y (2014). Aflatoxin B(1) degradation by a *Pseudomonas* strain. *Toxins (Basel)* **6**: 3028-3040.
- Sanseverino J, Eldridge ML, Layton AC, Easter JP, Yarbrough J, Schultz TW & Sayler GS (2009). Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters. *Toxicological Sciences* **107**: 122-134.
- Sato I, Ito M, Ishizaka M, Ikunaga Y, Sato Y, Yoshida S, Koitabashi M & Tsushima S (2012). Thirteen novel deoxynivalenol-degrading bacteria are classified within two genera with distinct degradation mechanisms. *FEMS Microbiol Lett* **327**: 110-117.

- Satora P, Tarko T, Sroka P & Blaszczyk U (2014). The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeast Research* **14**: 729-740.
- Schatzmayr G, Heidler D, Fuchs E, Nitsch S, Mohnl M, Täubel M, Loibner AP, Braun R & Binder EM (2003). Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotoxin Research* **19**: 124-128.
- Schatzmayr G, Zehner F, Täubel M, Schatzmayr D, Klimitsch A, Loibner AP & Binder EM (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular nutrition & food research* **50**: 543-551.
- Schmidt P, Novinski CO, Junges D, Almeida R & de Souza CM (2015). Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: A farm survey using infrared thermography. *Journal of Dairy Science* **98**: 6609-6619.
- Scudamore KA & Livesey CT (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**: 1-17.
- Seefelder W, Knecht A & Humpf HU (2003). Bound Fumonisin B1: Analysis of Fumonisin-B1 Glyco and Amino Acid Conjugates by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 5567-5573.
- Sekiguchi J, Shimamoto T, Yamada Y & Gaucher GM (1983). Patulin biosynthesis: enzymatic and nonenzymatic transformations of the mycotoxin (E)-ascladiol. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 1939-1942.
- Sharpton TJ (2014). An Introduction to the Analysis of Shotgun Metagenomic Data. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Shetty PH & Jespersen L (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology* **17**: 48-55.
- Shier WT (2000). The Fumonisin paradox: A review of research on oral bioavailability of Fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* **19**: 161-187.
- Shima J, Takase S, Takahashi Y, Iwai Y, Fujimoto H, Yamazaki M & Ochi K (1997). Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3825-3830.
- Silla Santos MH (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* **29**: 213-231.
- Sobek EA & Munkvold GP (1999). European corn borer (Lepidoptera: *Pyralidae*) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *Journal of Economic Entomology* **92**: 503-509.
- Sorensen JL, Nielsen KF, Rasmussen PH & Thrane U (2008). Development of a LC-MS/MS method for the analysis of enniatins and beauvericin in whole fresh and ensiled maize. *J Agric Food Chem* **56**: 10439-10443.

- Stefani FOP, Bell TH, Marchand C, De la Providencia IE, El Yassimi A, St-Arnaud M & Hijri M (2015). Culture-dependent and-independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils . *PLos ONE* **10**: e0128272.
- Storm IDML, Sørensen JL, Rasmussen RR, Nielsen KF & Thrane U (2008). Mycotoxins in silage. *Stewart Postharvest Review* **4**: 1-12.
- Storm IMLD, Rasmussen RR & Rasmussen PH (2014). Occurrence of pre- and post-harvest mycotoxins and other secondary metabolites in Danish maize silage. *Toxins* **6**: 2256-2269.
- Storm IMLD, Kristensen NB, Raun BML, Smedsgaard J & Thrane U (2010). Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *Journal of Applied Microbiology* **109**: 1017-1026.
- Strapp MP & Mandel M (1969). DNA base composition and taxonomy of phytopathogenic and other enterobacteria. *Microbiology* **56**: 113-123.
- Takahashi-Ando N, Kimura M, Kakeya H, Osada H & Yamaguchi I (2002). A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochem J* **365**: 1-6.
- Takahashi-Ando N, Ohsato S, Shibata T, Hamamoto H, Yamaguchi I & Kimura M (2004). Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3239-3245.
- Tay S-T, Lim S-L & Tan HW (2014). Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **14**: 439.
- Taylor MC, Jackson CJ, Tattersall DB, French N, Peat TS, Newman J, Briggs LJ, Lapalikar GV, Campbell PM, Scott C, Russell RJ & Oakeshott JG (2010). Identification and characterization of two families of F420 H₂-dependent reductases from *Mycobacteria* that catalyse aflatoxin degradation. *Mol Microbiol* **78**: 561-575.
- Teniola OD, Addo PA, Brost IM, *et al.* (2005). Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556(T). *Int J Food Microbiol* **105**: 111-117.
- Thibault N, Burgat V & Guerre P (1997). Les fumonisines: Nature, origine et toxicité. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France. **5**: 369-388.
- Torres AM, Barros GG, Palacios SA, Chulze SN & Battilani P (2014). Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Research International* **62**: 11-19.
- Uegaki R, Tsukiboshi T & Tohno M (2013). Changes in the concentrations of fumonisin, deoxynivalenol and zearalenone in corn silage during ensilage. *Animal Science Journal* **84**: 656-662.
- Upadhaya SD, Park MA & Ha JK (2010). Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: A review. *Asian Australas. J Anim Sci* **23**: 1250-1260.
- Upadhaya SD, Song JY, Park MA, *et al.* (2012). Isolation, screening and identification of swine gut microbiota with ochratoxin A biodegradation ability. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **25**: 114-121.

- Uzarowska A, Keller B, Piepho HP, Schwarz G, Ingvarsdén C, Wenzel G & Lubberstedt T (2007). Comparative expression profiling in meristems of inbred-hybrid triplets of maize based on morphological investigations of heterosis for plant height. *Plant Mol Biol* **63**: 21-34.
- Vaclavikova M, Malachova A, Veprikova Z, Dzuman Z, Zachariasova M & Hajslova J (2013). 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry* **136**: 750-757.
- Van der Westhuizen L, Shephard GS & van Schalkwyk DJ (2001). The effect of a single gavage dose of fumonisin B1 on the sphinganine and sphingosine levels in vervet monkeys. *Toxicon* **39**: 273-281.
- Varga J & Tóth B (2005). Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A review. *Acta Veterinaria Hungarica* **53**: 189-203.
- Varga J, Peteri Z, Tabori K, Teren J & Vagvolgyi C (2005) Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *Int J Food Microbiol* **99**: 321-328.
- Vekiru E, Hametner C, Mitterbauer R, Rechthaler J, Adam G, Schatzmayr G, Krska R & Schuhmacher R (2010). Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel nonestrogenic metabolite. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2353-2359.
- Vilar MJ, Yus E, Sanjuan ML, Dieguez FJ & Rodriguez-Otero JL (2007). Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *J Dairy Sci* **90**: 5083-5088.
- Vissers MM, Driehuis F, Te Giffel MC, De Jong P & Lankveld JM (2006). Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *J Dairy Sci* **89**: 850-858.
- Vissers MM, Driehuis F, Te Giffel MC, De Jong P & Lankveld JM (2007). Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *J Dairy Sci* **90**: 928-936.
- Waché YJ, Valat C, Postollec G, Bougeard S, Burel C, Oswald IP & Fravallo P (2009). Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *International Journal of Molecular Sciences* **10**: 1-17.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT & Merrill AH, Jr. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* **266**: 14486-14490.
- Wang H-X, Geng Z-L, Zeng Y & Shen Y-M (2008). Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction. *Environmental Microbiology* **10**: 2684-2691.
- Wegst W & Lingens F (1983). Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiology Letters* **17**: 341-344.
- Weinberg ZG & Muck RE (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews* **19**: 53-68.
- Weinberg ZG, Muck RE, Weimer PJ, Chen Y & Gamburg M (2004). Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. *Appl Biochem Biotechnol* **118**: 1-9.
- Whitlow LW, Hagler WM & Hopkins BA (1998). Mycotoxin occurrence in farmer submitted samples of North Carolina feedstuffs: 1989-1997. *J. Dairy Sci.* **81 (Abstr.)**: 1189.

- Woolford MK (1990). The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology* **68**: 101-116.
- Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V & Kuca K (2009). Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab Rev* **41**: 1-7.
- Xiao H, Madhyastha S, Marquardt RR, Li S, Vodela JK, Frohlich AA & Kemppainen BW (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* **137**: 182-192.
- Yang CS (1980). Research on esophageal cancer in China: a review. *Cancer Res* **40**: 2633-2644.
- Yu H, Zhou T, Gong J, Young C, Su X, Li XZ, Zhu H, Tsap R & Yang R (2010). Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection. *BMC Microbiology* **10**: 182.
- Yvon M, Thirouin S, Rijnen L, Fromentier D & Gripon JC (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 414-419.
- Zha Y, Hossain AH, Tobola F, Sedee N, Havekes M & Punt PJ (2013). *Pichia anomala* 29X: a resistant strain for lignocellulosic biomass hydrolysate fermentation. *FEMS Yeast Res* **13**: 609-617.
- Zhou T, He J & Gong J (2008). Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. *World Mycotoxin Journal* **1**: 23-30.
- Zhu W, Lomsadze A & Borodovsky M (2010). Ab initio gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Research* **38**: e132.

Annexes

Annexe1 : Protocole d'extraction d'ADN au CTAB

I. Objet et domaine d'application

Ce protocole peut s'appliquer pour extraire de l'ADN de microorganismes à partir de farines de maïs ou de cultures microbiennes directement.

II. Références

Noël et Labarère, 1987, Isolation of DNA from *Agrocybe aegerita* for the construction of a genomic library in *E. Coli* Mushroom Science 1987. Vol XII : 187-201.

III. Principe

L'ADN total est extrait à partir de farines de maïs (ou cultures microbiennes) en utilisant comme détergent le N céthyl NNN triméthyl ammonium bromure (CTAB). En présence de NaCl 0.7M, les acides nucléiques forment un complexe stable avec le CTAB. Ces complexes précipitent sélectivement quand la concentration saline est inférieure à 0.4M.

IV. Réactifs

-Tampon d'extraction (à préparer à l'avance, stérilisé 20 minutes à 121°C par autoclavage)

Tris pH8	100mM
CTAB	2% p/v
EDTA	20mM
NaCl	1,4M

- β - mercaptoethanol 2% v/v (ajouté juste avant usage)

-Chloroforme isoamyl alcool (24 :1 v/v)

-Ethanol absolu

-Ethanol 70% (préparé le jour même et stocké à -20°C)

-Acétate de sodium 3M pH 5,2 (préparé à l'avance et stocké à 4°C)

-Eau Milli Q stérile

-RNase stock (1mg/ml) (Cf :20µg/ml)

Appareillage

-Bain-marie à 56°C

-Hotte à flux laminaire

-Etuve à 37°C

V. Mode opératoire

A) Préparation des échantillons:

-Les échantillons peuvent être de deux types :

-cellules microbiennes (préparées selon le protocole « **étape de collection de cellules microbiennes** »)

-Maïs broyé (peser 100mg dans un tube eppendorf)

B) Extraction des acides nucléiques :

-Incuber le tampon d'extraction CTAB 2% à 65°C au préalable pendant ½ heure.

-Sous la hotte, resuspendre le maïs broyé ou les cellules microbiennes dans 700µl de tampon d'extraction chaud (+2%βmercapto soit 14µl), incuber 20 minutes à 56°C en mélangeant par retournement.

-Après retour à la température ambiante, ajouter 700µl de chloroforme alcool isoamylique (24 :1 v/v) toujours sous la hotte ; mélanger par retournements ; centrifuger (14000 rpm, RT, 10 minutes).

-Récupérer la phase aqueuse contenant les acides nucléiques (environ 600µl)

-Ajouter 20µg/ml (concentration finale) de RNase et laisser incuber pendant 30 minutes à 37°C (pour 600µl de surnageant ajouter 12µl de Rnase à 1mg/ml)

-Refaire une extraction avec 1 volume (612µl) de chloroforme alcool isoamylique (24 :1 v/v). Centrifuger (14000 rpm, RT, 5 minutes). Récupérer la phase aqueuse contenant les acides nucléiques.

C) Précipitation des acides nucléiques :

-Ajouter 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 goutte à goutte (60µl pour 600µl de surnageant)

-Homogénéiser par inversion (pas de vortex ou pipetage)

-Précipiter les acides nucléiques par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu (à calculer après addition de l'acétate de sodium) Attention jamais moins de 2 volumes.

-Homogénéiser par inversion (pas de vortex ou pipetage)

-A partir de maintenant il faut absolument travailler dans la glace.

-Laisser précipiter les acides nucléiques 45 minutes dans la glace (ou bien toute la nuit à -20°C)

-Centrifuger 30 minutes à 14000 rpm à 4°C.

-Éliminer le surnageant à la pipette délicatement (Attention le culot peut être transparent !)

D) Lavage des acides nucléiques :

- Ajouter délicatement une quantité suffisante d'éthanol à 70% (1ml). Cette solution doit être fraîchement préparée et être à une température de -20°C.
- Centrifuger pendant 15 minutes à 14000 rpm à 4°C.
- Éliminer tout le surnageant à la pipette.
- Sécher le culot, tube ouvert 5 à 10 minutes à l'air libre.
- resuspendre le culot dans 32 µl d'eau Milli Q stérile (souvent une incubation toute la nuit à 4°C est nécessaire afin de resuspendre correctement le culot d'ADN)

Annexe2 : Poster- Microbiome evolution during moist corn grain silage

MICROBIOME EVOLUTION DURING MOIST CORN GRAIN SILAGE

C. MARTINEZ TUPPIA^{1,2}, S. THEIL³, N. PONTS¹, F. RICHARD-FORGET¹, C. BARREAU¹, M. CASTEX², JM. SAVOIE¹

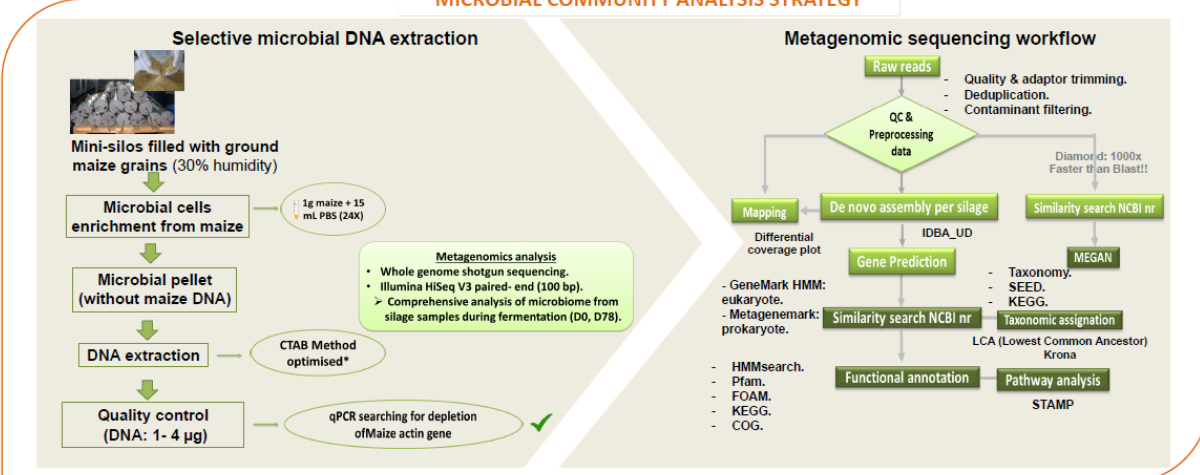
¹ INRA, UR1264 MycSA, Mycology & Food Safety, ² Lallemand SAS, Animal Nutrition Department, ³ INRA, UMR 1332, Biology of Fruit & Pabology

ccori.martinez@bordeaux.inra.fr

Maize is a major source for feeding monogastrics in Europe and widely used for cattle. Whole plants or grains can be fermented into silages which inclusion in diet leads to increased animal performances. Moist grain silage is a growing practice in Europe for maize storage in farms. In France, it can reach up to 50 % of the daily feed ration in pork and poultry breeding. Limited data is however available concerning the fermentation process of grain silage. The microbial diversity occurring in such type of silages and how these consortia can evolve remain to be elucidated.

Global approaches based on selective microbial DNA extraction coupled with high-throughput shotgun sequencing are promising tools to investigate the taxonomical and functional diversity of microbial consortia by assigning DNA sequences both to taxonomic groups and to enzymes and associated metabolic pathways. The aim of this work is to understand the structure and natural evolution of moist corn grain silage microbiome, including bacteria and yeast communities. This is a first step towards the management of a microbial strategy to improve the safety and nutritional value of moist corn grain silage.

MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS STRATEGY



RESULTS OF THE MICROBIOME ANALYSIS DURING FERMENTATION

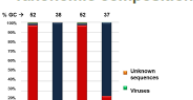
I. Global sequencing results

Silage	Fermentation time (days)	Sample	Total sequences (M)	%GC	Mapping on maize reference genome (%)
S1	0	S100	48.5	52	0.36
	78	S1078	48.8	38	0.12
S2	0	S200	41.6	52	0.34
	78	S2078	54.6	37	0.05

□ The efficiency of the microbial DNA enrichment method is demonstrated.

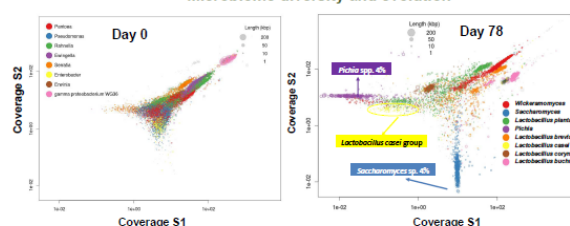
II. Microbiome composition and diversity analysis – Who are they?

Taxonomic composition

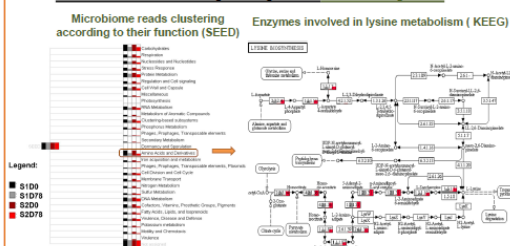


□ Predominance of bacteria at day 0 (D0) in both silage samples.
□ Switch to yeast predominance during fermentation.

Microbiome diversity and evolution



III. Functional diversity analysis – What they do?



□ Day 0: High bacterial diversity. Similar diversity profiles between the two silages.

□ Day 78: Shift of the microbial composition with a decreased in the microbiome diversity.

Changes in environmental factors during silage

Development of some microorganisms that are specific to each silage.

Contrasted evolution?

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

- A first Elucidation of maize grain silage microbiome and its dynamic during fermentation.
- Global approaches (NGS) allowed us investigating the functional diversity by targeting microbial activities and key genes.
- Promising option to explain and prospect key microorganisms to improve the safety of grain silage (e.g. mycotoxin degradation).

