

## MYCOBIOVIGNE

### Production et formulation d'agents de biocontrôle d'origine microbienne pour limiter la contamination par les mycotoxines à la vigne

Florian Boyer<sup>1</sup>, Vanessa Durrieu<sup>2</sup>, Florence Mathieu<sup>1</sup> and Selma P. Snini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Génie Chimique, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, INPT, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France.

#### Objectifs du projet

L'objectif principal de ce projet est de formuler des agents de biocontrôle d'origine microbienne (souches microbiennes et/ou métabolites microbiens) pour réduire la contamination vis-à-vis de 2 mycotoxines, l'ochratoxine A (OTA) et l'aflatoxine B1 (AFB1) à la vigne. L'OTA est déjà réglementée dans les produits de la vigne (2 ppb), alors que l'AFB1, mycotoxine cancérigène, est une mycotoxine émergente au vignoble, en lien avec le réchauffement climatique. La formulation des agents de biocontrôle est une condition *sine qua non* avant leur application au vignoble. De plus, au terme de l'étape de formulation, il est indispensable de s'assurer de l'efficacité *in vitro* de l'agent de biocontrôle formulé.

#### Démarche/Méthodologie

Pour le démarrage de ce projet, nous disposons d'une dizaine de souches d'actinobactéries, des bactéries du sol, déjà sélectionnées sur leur capacité à réduire des concentrations en OTA et en AFB1 produites *in vitro* par les champignons producteurs du genre *Aspergillus*, respectivement *A. carbonarius* et *A. flavus*. Compte tenu du caractère exploratoire du projet, nous avons choisi de débiter nos investigations sur l'effet des surnageants de culture de ces bactéries sur la croissance d'*A. flavus* et la concentration en AFB1. Ainsi, la première tâche du projet a consisté à produire des surnageants de culture d'actinobactéries puis de tester leur efficacité à réduire la concentration d'AFB1 dans les cultures d'*A. flavus*. Au terme de cette tâche, nous avons sélectionné une souche d'actinobactérie pour la suite du projet. Dans la seconde tâche du projet nous avons réalisé deux types d'essais de formulation de l'agent de biocontrôle, soit sous forme de poudre lyophilisée soit par encapsulation par atomisation. Cette étape de formulation est indispensable dans le développement d'une solution de biocontrôle pour sa conservation et son application. La dernière tâche du projet a été de valider *in vitro* que l'efficacité du surnageant est conservée après sa formulation.

#### Principaux résultats

Dans la Figure 1A sont présentés les premiers résultats obtenus pour l'étude de l'effet du surnageant d'une souche d'actinobactérie produit à différent temps d'incubation (4 jours (CFS4), 5 jours (CFS5) ou 6 jours (CFS6)) sur les concentrations d'AFB1 dans les cultures d'*A. flavus*. Les résultats montrent que tous les surnageants testés induisent une réduction significative des concentrations en AFB1 par rapport au témoin (Ctrl). Parmi les trois surnageants testés, celui produit à 4 jours (CFS4) présente le meilleur pourcentage de réduction lorsqu'il est utilisé aux concentrations de 0,75 et 1,5 g/L. C'est donc ce surnageant

qui a ensuite été utilisé pour les essais de formulation. Sur la Figure 1B sont présentés les résultats obtenus après la formulation du surnageant par deux voies différentes (la lyophilisation et l'atomisation) avec deux supports naturels différents (F1 et F2). Dans un premier temps, le surnageant a été lyophilisé (SL) ou atomisé (SA) sans support afin de mesurer l'impact de chacun des procédés sur l'activité du surnageant. Dans les deux cas l'activité du surnageant a été conservée mais réduite, permettant d'atteindre des pourcentages de réduction de la concentration d'AFB1 de 58% et 62%. La formulation par lyophilisation du surnageant quel que soit le support utilisé (F1 ou F2) a conduit à des pourcentages de réduction de la concentration d'AFB1 équivalents (59% et 51%). Cependant, la formulation par atomisation quel que soit le support utilisé (F1 ou F2) a conduit à des pourcentages de réduction de la concentration d'AFB1 inférieurs (34 et 31%) par rapport au surnageant atomisé seul. Cette réduction d'efficacité peut être due aux rendements d'atomisation qui ont démontré une perte de matière (surnageant + support) lors du procédé.

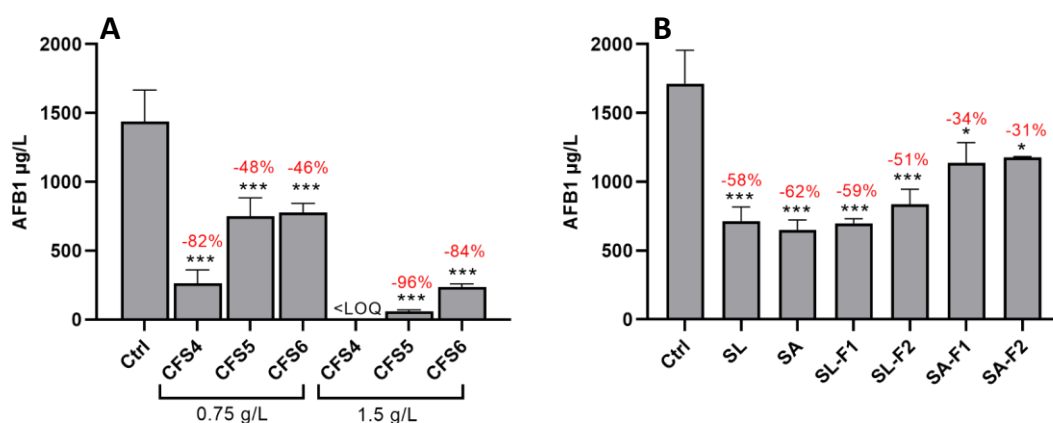


Figure 1 : A – Concentration d'AFB1 dans les cultures d'*A. flavus* sur milieu gélosé supplémenté avec du surnageant de culture d'actinobactérie produit à différents temps d'incubation (4 jours (CFS4), 5 jours (CFS5) ou 6 jours (CFS6)). B – Concentration d'AFB1 dans les cultures d'*A. flavus* sur milieu gélosé supplémenté avec du surnageant de culture d'actinobactérie produit à 4 jours et formulé par lyophilisation (SL-F1 et SL-F2) et atomisation (SA-F1 et SA-F2); SL = Surnageant Lyophilisé seul et SA = Surnageant Atomisé seul. Les concentrations d'AFB1 dans les essais sont comparées à la concentration d'AFB1 mesurée dans la condition de culture contrôlée (milieu de culture non supplémenté) et les pourcentages de réduction de la concentration en AFB1 sont indiqués en rouge. One-way ANOVA, Dunnett's post-hoc test, \*\*\*p-value < 0.001 \*p-value < 0.05, LOQ: limit of quantification

### Perspectives de suite ou de transfert

L'ensemble de ces résultats est très encourageant quant au développement d'une solution de biocontrôle pour lutter efficacement contre la contamination émergente en AFB1 au vignoble. En effet, les procédés de lyophilisation et d'atomisation associés ou non à des supports naturels permettent de conserver une très bonne efficacité d'un surnageant de culture pour réduire une concentration en AFB1. C'est une étape importante dans le sens où un agent de biocontrôle sous forme de surnageants ne peut pas être utilisé sans cette étape de formulation. De nombreux verrous doivent être encore levés avant de pouvoir passer à la réalisation de tests en vignobles comme par exemple la validation de la non toxicité de l'agent formulé, la production en quantités importantes de surnageants pour les applications, le choix du stade d'application le plus optimal par rapport à la survenue de la contamination fongique.