

EFFETS DE PESTICIDES SUR DEUX SOUCHES DE LEVURES : *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ET *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA*

EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON TWO YEAST STRAINS : *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA*

JAWICH Dalal^{1,3,4}, HILAN C.¹, SALIBA R.²,
LTEIF R.³ et STREHAIANO P.^{4*}

1 : Laboratoire de Fanar, Institut de Recherche Agronomique Libanais (IRAL),
B.P. 90-1965, Beyrouth, Liban

2 : Université Libanaise, Faculté d'Agronomie, Département des Sciences et des Technologies
Agroalimentaires, B.P. 13-5368 Beyrouth, Liban

3 : Université Saint Joseph, Faculté des Sciences, Campus des Sciences et Technologies,
Mar Roukos, Mkallès, BP 11-514 Riad El Solh, Beyrouth, Liban

4. Laboratoire de Génie Chimique, UMR-CNRS 5503,
5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse cedex, France

Résumé : L'effet de différentes doses (0 à 20 LMR) de six pesticides sur deux souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Metschnikowia pulcherrima* est dans un premier temps étudié sur leur croissance sur milieu gélosé. Le produit le plus actif (le penconazole) est alors étudié du point de vue de son activité en conditions fermentaires. Des différences de comportement très nettes entre les deux souches sont mises en évidence : *Saccharomyces cerevisiae*, très sensible en conditions sur milieu gélosé, est beaucoup moins affectée en conditions fermentaires alors que *Metschnikowia pulcherrima* montre en conditions fermentaires une très grande sensibilité tant du point de vue des vitesses que des rendements. Enfin, les deux souches montrent une capacité à fixer les molécules toxiques sans cependant les dégrader. Cette adsorption apparaît limitée et dès que la dose initiale dépasse 2 LMR la dose résiduelle dans le « vin » reste au-dessus du seuil admissible.

Abstract : The effect of different concentrations (0-20 LMR) of six pesticides on the aerobic growth of two yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*) was analysed. The penconazole was shown as the most efficient and its effect was then studied under fermentative conditions. *Saccharomyces cerevisiae* appeared very sensitive under aerobiosis while the fermentative cultures seemed poorly affected. On the opposite, *Metschnikowia pulcherrima* was poorly affected under aerobiosis but was severely affected under fermentative conditions. The yields as well as the reaction rates decreased when initial concentrations of penconazole were increased. At least, it was shown that both strains were able to adsorb a certain ratio of the pesticide; but the pesticide was not degraded. Also for an initial value greater than 2 LMR, the residual quantity of the pesticide was above the admitted level.

Keywords : pesticide, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, kinetics, adsorption.

Mots clés : pesticide, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, cinétiques fermentaires, adsorption.

INTRODUCTION

Les pesticides, principaux polluants environnementaux, peuvent laisser des résidus toxiques dans l'air, le sol et l'eau. Certains sont neurotoxiques, d'autres embryotoxiques, mutagènes, tératogènes ou carcinogènes et leur utilisation massive dans les secteurs agricole, industriel et médical constitue de ce fait une réelle menace à la fois pour l'environnement et pour la santé humaine et animale (POGACNIK et FRANKO, 1999). De nombreux fongicides organiques et systémiques sont utilisés pour combattre les champignons phytopathogènes en pulvérisation avant la récolte ou en bain avant l'entreposage des fruits et la présence de résidus sur les fruits peut avoir une incidence dommageable sur la technologie (problèmes fermentaires) ou la santé du consommateur MEZIERES *et al.*, 1988 ; BIZEAU et THOUVENOT, 1990).

Des travaux antérieurs ont étudié l'influence de certains produits phytopharmaceutiques sur la microflore naturelle des moûts, sur les cinétiques fermentaires et sur la composition et la qualité du vin (MONTEIL *et al.*, 1986 ; PILONE, 1986 ; MEZIERES *et al.*, 1988 ; DUBERNET *et al.*, 1990 ; CUINIER, 1996 ; CABRAS *et al.*, 1999), ainsi que l'aptitude des levures à accumuler ou à dégrader certaines molécules toxiques (LAL et LAL, 1987 ; VIVIANI-NAUER *et al.*, 1997 ; NISHIMURA *et al.*, 2002).

Le présent travail évalue la toxicité de six pesticides utilisés pour les traitements phytosanitaires — azinphos-méthyle, bénomyl (encore autorisé au Liban pour le traitement des fruits mais peu utilisé), cyhéxatin, chlorpyriphos-méthyle, diméthoate (autorisé au Liban et très utilisé sur les pommes) et penconazole — vis-à-vis de deux souches de levures *Metschnikowia pulcherrima* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ensuite, la molécule la plus toxique envers *S. cerevisiae* est retenue en vue d'étudier son incidence sur la cinétique fermentaire des deux levures et leur capacité éventuelle à l'accumuler ou la dégrader. *M. pulcherrima* est une levure impliquée dans la fabrication du cidre dès le départ des fermentations et est également une des composantes de la microflore indigène des moûts (DUEÑAS *et al.*, 1994 ; PANON, 1997). *S. cerevisiae* est largement utilisée en vinification ou en fermentation alcoolique industrielle (production d'alcool à partir des mélasses sucrières ou des hydrolysats d'amidon) en raison de sa tolérance à l'éthanol, aux concentrations élevées en sucre et son pouvoir fermentaire élevé (JACKSON, 1994). Par ailleurs, cette levure est souvent utilisée comme organisme modèle par exemple dans les études biochimiques et génétiques accompagnant la détermination du mode d'action des fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol dans les mycètes (HARGREAVES *et al.*, 1996).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATÉRIEL CHIMIQUE

Les pesticides testés présentent vis-à-vis de leur nature chimique, de leur activité et de la LMR fixée les caractéristiques suivantes :

- azinphos-méthyle : organophosphoré, insecticide, LMR de 2 ppm ;
- bénomyl : carbamate, fongicide, LMR de 2 ppm ;
- chlorpyriphos-méthyle : organophosphoré, insecticide, LMR de 0,5 ppm ;
- cyhéxatin : organostannique, acaricide, LMR de 2 ppm ;
- diméthoate : organophosphoré, insecticide, LMR de 1 ppm ;
- penconazole : triazole, fongicide, LMR de 0,2 ppm.

Les produits utilisés (standards analytiques dont la pureté est supérieure à 99 %) sont fournis par Riedel de Haën (Allemagne). Les solutions mères (1 000 mg.L⁻¹) sont préparées dans l'éthanol et celles utilisées pour l'analyse chimique dans l'hexane. Tous les solvants utilisés sont de pureté chromatographique (Fluka, HPLC grade).

II - MATÉRIEL BIOLOGIQUE

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* et celle de *Metschnikowia pulcherrima* ont été fournies par la « Mycothèque de l'Université de Louvain » (Belgique), où elles sont respectivement répertoriées sous les numéros MUCL 31497 et MUCL 29874.

III - TEST DE TOXICITÉ SUR GÉLOSE

10 mL de gélose YPDA (10 g.L⁻¹ de glucose [Himedia], 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure [Himedia], 10 g.L⁻¹ de bactopectone [Oxoid] et 20 g.L⁻¹ d'Agar [Himedia]) ont été répartis dans les boîtes de Petri. Chacune d'elles a ensuite reçu un apport de la solution de pesticide de manière à obtenir les concentrations 20 LMR (LMR : dose Limite Maximale Résiduelle), 10 LMR et 5 LMR pour chaque matière active. Un témoin est réalisé avec le milieu stérile exempt de pesticides : il sert à suivre le développement normal des levures. Un triplicat est réalisé pour chaque concentration testée et pour le témoin.

Les cultures « mère » des deux levures ont été préparées dans un milieu synthétique YPD (25 g.L⁻¹ de glucose [Himedia], 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure [Himedia] et 10 g.L⁻¹ de bactopectone [Oxoid]), agitées à 150 rotations / minute pendant 24 heures à 28 °C, ensuite ajustées avec de l'eau physiologique (0,85 % p/v) à 10³ cellules. mL⁻¹. Un volume de 100 µL est alors prélevé et étalé sur chaque boîte de Petri. Ce test a été répété une deuxième

fois d'une manière indépendante (avec deux nouvelles cultures).

Le pourcentage d'inhibition a été obtenu par la relation $100 \cdot (N_t - N_{pc}) / N_t$ où N_t représente le nombre des colonies du témoin, N_{pc} celui de la boîte contaminée par le pesticide « p » à la concentration « c ». Les concentrations inhibitrices de la croissance de 50 % des colonies (IC50) ont été estimées à l'aide du logiciel « Curve Expert » en portant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du pesticide.

IV - CONDUITE ET SUIVI DES FERMENTATIONS

Les expériences ont été réalisées à 25 °C dans des ballons jaugés de contenance 1 L, de volume utile 800 mL. Le milieu de culture est un moût de pomme Starking issu de culture biologique (123 g.L⁻¹ de fructose, 59 g.L⁻¹ de glucose et 13 g.L⁻¹ de saccharose et de pH 4,5) et pasteurisé (une heure à 70 °C). Chaque ballon reçoit un apport de pesticide sélectionné à partir du test de toxicité selon les concentrations correspondant à 10 LMR, 5 LMR, 2 LMR et 1 LMR et est ensuite inoculé par une culture préparée dans le même milieu (150 rotations / minute pendant 24 heures à 28 °C). Le taux d'inoculation est de 5.10⁶ cellules.mL⁻¹ (cellules viables). Un ballon exempt de pesticide permettant de suivre le déroulement normal de la fermentation a été gardé comme témoin. Pour chaque souche de levures, un duplicat a été réalisé pour chaque concentration et pour le témoin.

Un suivi quotidien de la fermentation a été réalisé par une mesure de la teneur en sucres totaux, du pH et une évaluation de la biomasse par dénombrement des colonies sur milieu (YPDA) en surface. La population est donc exprimée en UFC.mL⁻¹ (ou « unités formant des colonies » par mL). Des échantillons destinés aux dosages chimiques ont été prélevés après l'inoculation et tous les 4 jours au cours des fermentations ; ils ont été conservés à -20 °C et décongelés à température ambiante au moment de l'analyse. Les résultats ont été soumis à l'analyse des variances à l'aide du logiciel Statistica.

V - ANALYSE DES SUCRES

Fructose, glucose et saccharose ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le chromatographe utilisé (LKB 2150) est muni d'une colonne LC - NH2 (Waters ; longueur 25 cm, diamètre interne 4,6 mm, phase stationnaire de 5 µm épaisseur) et d'un détecteur par réfractométrie. Le tout est relié à un intégrateur C-R6A Chromatopac (Shimadzu). La phase mobile est formée par une solution d'acétonitrile à 83 % en volume dans l'eau distillée, le débit en mode isocratique est maintenu à 1,5 mL.min⁻¹. Le volume injecté est 20 µl. La solution aqueuse standard contient 38 g.L⁻¹

de D (+)-fructose, 30 g.L⁻¹ de D (+)-glucose et 6 g.L⁻¹ de D (+)-saccharose. La droite d'étalonnage est tracée à partir de 5 dilutions successives de ce mélange. Les échantillons sont filtrés sur des filtres de cellulose (Millipore) de porosité 0,45 µm et chacun est dilué jusqu'à la concentration adéquate pour le placer dans la zone de linéarité de l'étalonnage.

VI - ANALYSE DE L'ÉTHANOL

La teneur en éthanol est mesurée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Shimadzu GC 17A), munie d'une colonne remplie Carbowax 20M (Supelco) de 2 m de longueur et 2,1 mm de diamètre interne et d'un détecteur par ionisation de flamme ; le tout est relié à un intégrateur C-R6A Chromatopac (Shimadzu). La température de l'injecteur est 175 °C, celle du four est maintenue isotherme à 90 °C et celle du détecteur à 200 °C. Le gaz vecteur est l'azote à 20 mL.min⁻¹ de débit. Le n-propanol a été utilisé comme étalon interne. La solution mère de calibration utilisée est composée de 10 % v/v d'éthanol et 10 % v/v de n-propanol ; 5 dilutions successives ont servi à tracer la droite d'étalonnage. Les échantillons ont été centrifugés à 5 000 rpm pendant 15 minutes et ont subi la dilution nécessaire pour les placer dans la zone de linéarité de l'étalonnage.

VII - ANALYSE DES RÉSIDUS DE PESTICIDES

1) Préparation de l'échantillon et procédure d'extraction

La méthode d'extraction mise en œuvre est celle proposée par CABRAS (CABRAS *et al.*, 1999). Un échantillon de 5 mL est homogénéisé et ensuite centrifugé à 5000 rpm pendant 15 minutes pour séparer les levures du moût fermenté. Le culot obtenu par cette première centrifugation est mélangé avec 1 mL d'éthanol à 10 % (v/v) et centrifugé une deuxième fois. Le surnageant obtenu est ajouté au premier. Culot et surnageant ont subi une extraction séparée : chacun est additionné de 5 mL d'hexane et agité sur agitateur rotatif pendant 30 minutes. Ensuite, après séparation des deux phases, 1 µL de la phase organique est injecté dans le chromatographe.

2) Dosage des résidus

Ce dosage est également réalisé par chromatographie en phase gazeuse (Shimadzu GC 17A) sur colonne capillaire PTE-5 (Supelco; longueur 30 m, diamètre interne 0,53 mm, phase stationnaire de 0,25 µm d'épaisseur) avec une détection par capture d'électrons. Le tout est relié à un ordinateur ayant un logiciel spécifique (class-GC 10). La température de l'injecteur est 280 °C, la colonne est soumise à un gradient de température allant de 140 °C à 265 °C avec une vitesse de 10 °C.min⁻¹, le détecteur est maintenu à 310 °C. Le gaz vecteur est l'azote (15 mL.

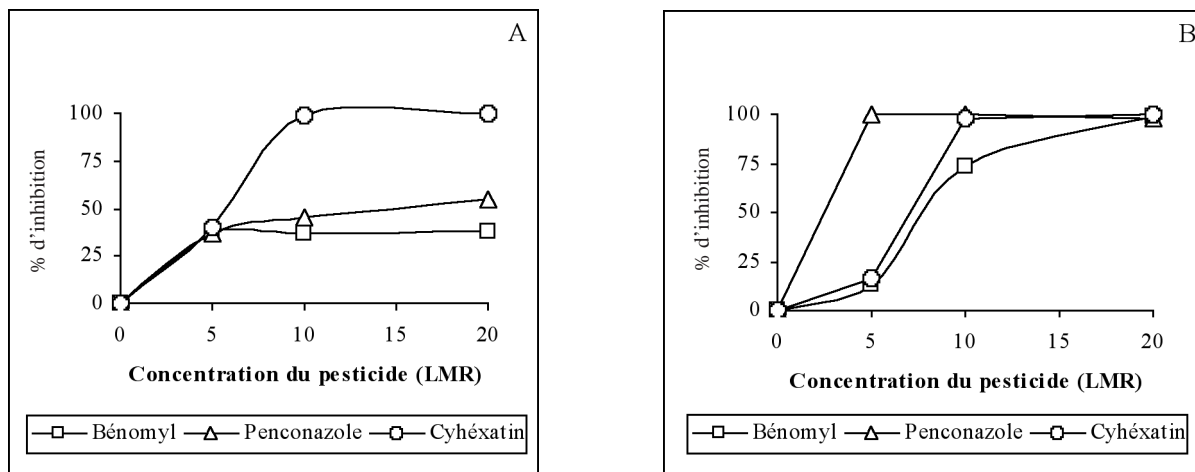


Figure 1 - Variation du pourcentage d'inhibition de la croissance en fonction des concentrations 5, 10 et 20 LMR de chaque pesticide pour *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

Percentage of growth inhibition as a function of the initial level (5, 10, 20 LMR) of the different pesticides for *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

min⁻¹). Le volume injecté est de 1 µL. Les solutions standards sont injectées à plusieurs concentrations pour déterminer la limite de détection, le temps de rétention, le taux de récupération et pour tracer la droite d'étalonnage correspondant à la molécule étudiée.

3) Calcul des paramètres cinétiques

« μ » étant le taux de croissance estimé par la pente de la droite logarithmique de croissance en phase exponentielle, le temps de génération « g » est obtenu par la relation : $g = \ln(2)/\mu$ soit $g = 0.693/\mu$

Le facteur de bioconversion du substrat en biomasse a été obtenu par le rapport entre la concentration de la biomasse produite (UFC.mL⁻¹) sur la concentration du substrat consommé (g.mL⁻¹), $(XF - X0)/(S0 - SF)$. XF et SF représentent respectivement la concentration de la biomasse et celle du substrat en fin de croissance cellulaire, X0 et S0 ces concentrations à l'inoculation.

La productivité en biomasse a été déterminée par le rapport de la concentration de la biomasse produite (UFC.mL⁻¹) sur le temps total de production (h) estimé atteint en fin de croissance cellulaire.

La productivité globale en éthanol exprimée en g.L⁻¹.j⁻¹ a été calculée par le rapport PF/tF où tF représente la durée de la fermentation.

La vitesse de consommation des sucres exprimée en g.L⁻¹.j⁻¹ a été calculée par le rapport $(S0 - SF)/tF$ où S0 représente la concentration en substrat à l'inoculation et SF et tF la concentration en substrat et le temps en fin de fermentation.

RESULTATS ET DISCUSSION

I - TEST DE TOXICITÉ SUR GÉLOSE

Parmi les six matières actives testées, trois molécules présentent un effet hautement significatif ($p < 0,01$) par rapport au témoin. Ce sont : le bénomyl, le cyhéxatin et le penconazole. L'effet toxique qu'elles exercent sur la croissance des levures se traduit par une diminution du nombre des colonies (inhibition) et un retard de leur apparition. Aussi bien pour *S. cerevisiae* que pour *M. pulcherrima*, le retard et le pourcentage d'inhibition augmentent avec la concentration du pesticide (figure 1). Pour *M. pulcherrima* le bénomyl a présenté un maximum de 39 % d'inhibition, le cyhéxatin 95 % et le penconazole 54 %, tous atteints à 20 LMR. Par ailleurs, les colonies obtenues en présence du penconazole étaient plus petites que celles observées sur le témoin ou en présence des autres pesticides. Pour *S. cerevisiae*, les inhibitions maximales sont 99 % pour le bénomyl et 100 % pour les deux autres ; elles sont obtenues à 20 LMR sauf pour le penconazole qui a provoqué une inhibition totale (absence de colonies) à toutes les concentrations testées. Les concentrations inhibitrices à 50 % de la croissance des levures (IC50) varient selon la levure et le pesticide (tableau I).

Pour la suite du travail, nous avons retenu seulement le penconazole, car il s'est montré le plus actif vis-à-vis de la levure *S. cerevisiae* (cette levure étant considérée comme la levure de référence en matière de fermentation alcoolique).

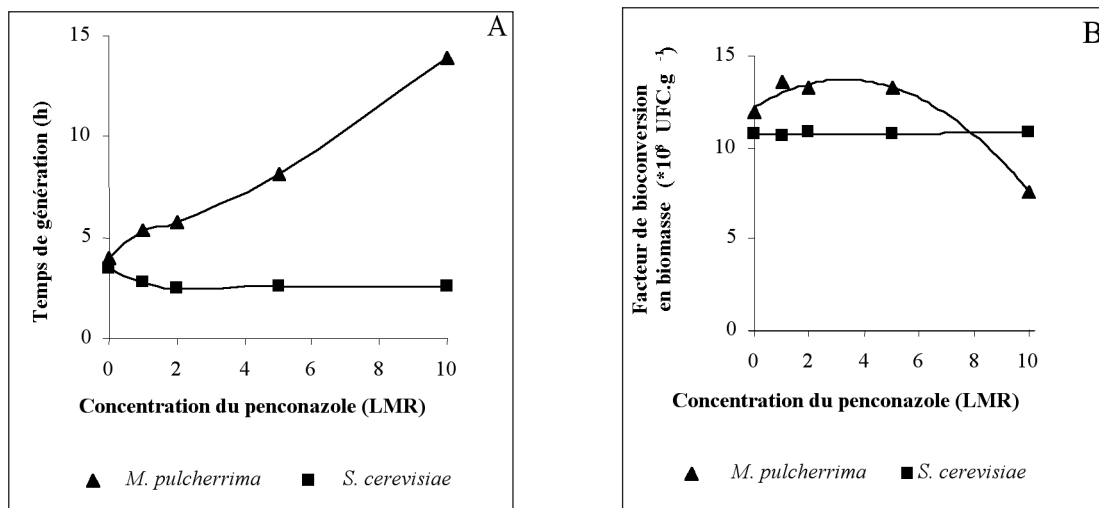


Figure 2 - Effet du penconazole sur le temps de génération (A) et sur le facteur de bioconversion du substrat en biomasse (B)

Effect of penconazole on the generation time (A) and on the substrate/biomass conversion yield (B)

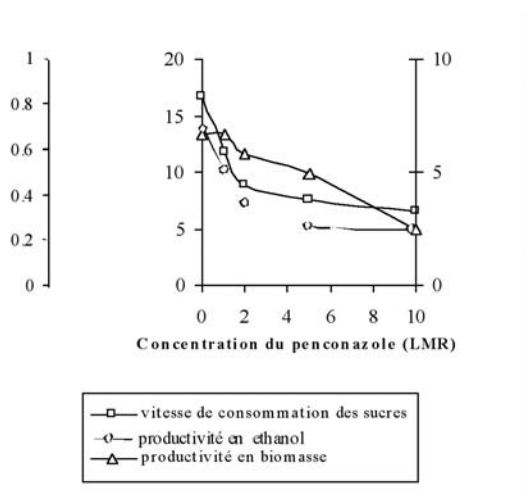


Figure 3 - Effet du penconazole sur les productivité en biomasse et en éthanol et sur la vitesse de consommation des sucres de *M. pulcherrima*

Effect of penconazole on the biomass and ethanol productivities and on the sugar consumption rate by *M. pulcherrima*

II. FERMENTATION

Si *S. cerevisiae* s'est montrée très sensible pendant le test de toxicité en croissance sur boîte de Petri (figure 1B ; tableau I) par contre, elle ne semble pas affectée par la présence du penconazole dans les conditions de fermentation. Ni le temps de génération (figure 2A), ni la consommation des sucres, ni la production d'alcool ne sont significativement affectés et les caractéristiques du « vin »

Tableau I - Concentrations inhibitrices de la croissance de 50 % des colonies (IC50) pour *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)
Concentrations for inhibiting the growth of 50 % of the yeast colonies (IC50) for *M. pulcherrima* (A) and *S. cerevisiae* (B)

Matières actives	IC ₅₀ (LMR)	
	<i>M. pulcherrima</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Bénomyl	ND *	8
Cyhéxatin	4,5	7
Penconazole	13	1,7

* ND : non déterminé car l'inhibition maximale observée est de 39 %

en fin de fermentation sont sensiblement identiques (degrés alcooliques atteints dans une gamme allant de 9,8 % avec 9 grammes de sucres résiduels pour 0 LMR à 9,5 % avec 10 grammes de sucres résiduels pour 10 LMR). Au contraire, l'effet toxique du penconazole s'est avéré très prononcé sur la croissance et la capacité fermentaire de *M. pulcherrima*. L'inhibition de la croissance des colonies mise en évidence lors du test de toxicité (sur boîte de Petri) s'est bien traduite par un effet très négatif au niveau des paramètres cinétiques pendant la fermentation, et ceci à toutes les concentrations adoptées. Le temps de génération augmente de façon quasi linéaire avec la concentration en pesticide (figure 2A) et nous observons une diminution brutale du facteur de bioconversion du substrat en biomasse (figure 2B), à 10 LMR. Cette sensibilité de la levure *M. pulcherrima* au penconazole dans les conditions de fermentation s'exprime éga-

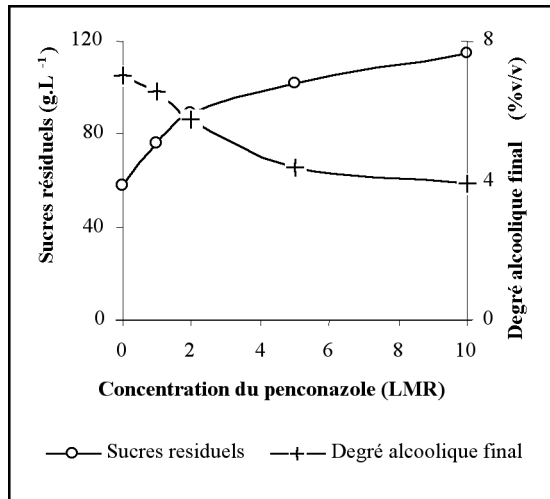


Figure 4 - Effet du penconazole sur la concentration des sucres résiduels et sur le degré alcoolique final avec *M. pulcherrima*

Effect of penconazole on residual sugar concentration and on final alcohol concentration with *M. pulcherrima*

lement au niveau des productivités (figure 3) : les vitesses moyennes de consommation des sucres, de production d'alcool et de biomasse diminuent sensiblement avec l'augmentation de la dose initiale de pesticide. Ceci se traduit par un taux élevé de sucres résiduels et un faible degré alcoolique final (figure 4).

De tels résultats contradictoires entre essais sur milieux gélosés en conditions de respiration et tests fermentaires ont souvent été cités dans le contexte interaction « levures-pesticides ». S'il a été montré que toute influence révélée

par un test de toxicité réalisé sur gélose pouvait correspondre à une gêne de l'activité des levures en fermentation (MONTEIL *et al.*, 1986), il demeure cependant que de nombreux paramètres entrent en jeu et peuvent modifier cette relation. Ainsi, le changement du milieu ou de l'une de ses caractéristiques, le passage d'une concentration sans effet du pesticide à une autre parfois proche (CUINIER, 1996 ; VIVIANI-NAUER *et al.*, 1997), le changement du substrat et le passage du métabolisme respiratoire à celui fermentaire peuvent tous mener à des résultats divergents (RIBEIRO *et al.*, 1999). Le penconazole agit en inhibant la synthèse des stérols, avec pour conséquence en œnologie un arrêt précoce de la fermentation, mais peu ou pas d'effet sur la phase de latence (CUINIER, 1996). Le mécanisme d'inhibition s'exerce au niveau de la membrane dont les propriétés de transfert seraient amoindries suite au manque de stérols (BUCHENAUER, 1987 ; BONALY, 1991). Dans nos essais, cet effet du penconazole sur *S. cerevisiae*, dont la capacité respiratoire est réputée faible (VASSEROT, 1996), est très marqué en conditions respiratoires et faible en conditions fermentaires, alors que nous observons le contraire avec *M. pulcherrima*.

Ainsi, si les essais *in vitro* effectués en laboratoire mettent en évidence l'empoisonnement direct des levures par les résidus de pesticides présents dans le moût (DUBERNET *et al.*, 1990) on peut aussi penser que ces substances peuvent modifier l'équilibre de la flore indigène parfois en faveur de levures néfastes, fortement résistantes, à capacité fermentaire médiocre et produisant de mauvais goûts (MEZIERES, 1988 ; CUINIER, 1996).

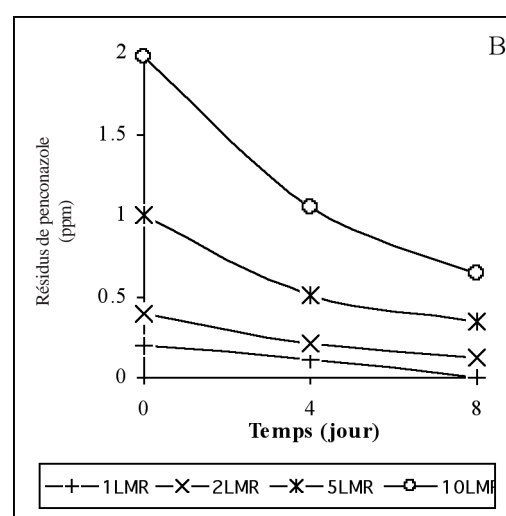
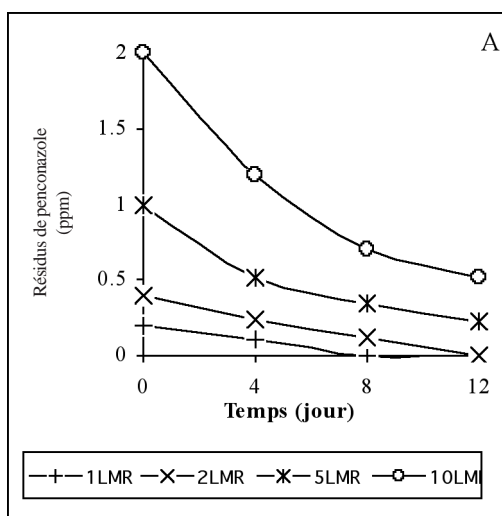


Figure 5 - Evolution des résidus de penconazole dans le moût en cours de fermentation par *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

Behaviour of penconazole in the must during the alcoholic fermentation by *M. pulcherrima* (A) and *S. cerevisiae* (B)

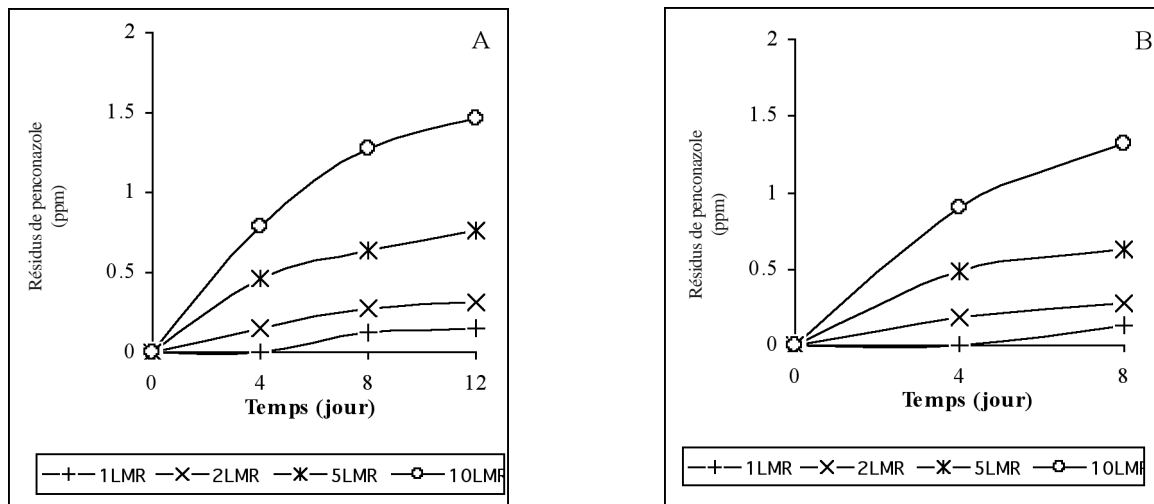


Figure 6 - Évolution des résidus de penconazole dans les levures en cours de fermentation pour *M. pulcherrima* (A) et *S. cerevisiae* (B)

Behaviour of penconazole in the yeast cells during the alcoholic fermentation by *M. pulcherrima* (A) and *S. cerevisiae* (B)

III. RÉSIDUS DE PENCONAZOLE ET BIOACCUMULATION

La troisième étape de notre travail a consisté à étudier le devenir de la molécule dans les milieuxensemencés avec ces deux souches de levure. En effet, il a été établi que, si d'un côté les pesticides peuvent affecter l'activité des levures, de l'autre, celles-ci peuvent diminuer les résidus de pesticides par adsorption et dégradation (CABRAS *et al.*, 1999). Il apparaît clairement (figure 5) que les deux levures étudiées induisent une réduction des résidus de penconazole dans le moût au cours de la fermentation. Mais on observe (figure 6) que les résidus disparus du milieu fermentaire sont retrouvés dans les levures, ce qui exclut toute possibilité de dégradation ou de métabolisation des molécules de penconazole. Celui-ci étant fortement liposoluble, il est facilement prélevé de la phase aqueuse (le moût) et fixé sur les bicouches lipidiques des membranes levuriennes (LAL et LAL, 1987 ; VIVIANI-NAUER *et al.*, 1997). Une fois incorporé, le pesticide est lié à des sites spécifiques localisés dans ces membranes ; ainsi, à partir d'une concentration « saturante » correspondant à l'occupation de tous les sites disponibles, l'accumulation cesse et la cellule redevient passive vis-à-vis du toxique (VIVIANI-NAUER *et al.*, 1997). Dans le cas présent, le schéma de la bioaccumulation est identique pour les deux levures et pour toutes les concentrations du penconazole : c'est une adsorption croissante en fonction du temps de contact levures-pesticide (figure 6). Les teneurs accumulées étant assez élevées (~65 % de la quantité initiale), les deux levures étudiées semblent efficaces en matière de décontamination du milieu fermentaire des résidus de penconazole. Les échantillons contenant le double de la LMR sont devenus consommables (dose résiduelle inférieure à la LMR), mais pour ceux conte-

nant 5 et 10 LMR une dépollution de 65 % ne ramène pas les résidus à une teneur acceptable.

CONCLUSION

Cette étude a permis la mise en évidence de l'incidence préjudiciable des pesticides sur les croissances en conditions aérobies et sur les cinétiques fermentaires de deux souches de levures (de genre et espèces différents) usuellement rencontrées dans les milieux en fermentation (vin, cidre). Une première évaluation de la toxicité des pesticides envers *M. pulcherrima* et *S. cerevisiae* est déterminée par un test effectué sur gélose. Des six pesticides testés, l'aziphos-méthyle (insecticide), le chorypyriphos-méthyle (insecticide) et le diméthoate (insecticide) n'ont pas montré d'effet significatif sur la croissance des deux souches de levures testées. Au contraire, la croissance des deux levures est significativement diminuée en présence de cyhéxatin (acaricide), de penconazole (fongicide) et de bénomyl (fongicide). En ce qui concerne l'effet du penconazole sur l'activité fermentaire nous observons que la levure *M. pulcherrima* est profondément perturbée par l'action de cette matière active (son activité fermentaire et sa croissance sont fortement diminuées) alors que *S. cerevisiae* apparaît plus résistante, les fermentations se déroulant normalement dans les limites des doses de penconazole étudiées (10 fois la LMR).

Par ailleurs, nous montrons que la disparition du penconazole du milieu fermentaire s'explique par un piégeage de la molécule par les cellules de levure, sans que l'on puisse dire s'il s'agit d'une adsorption de surface ou d'une fixation sur des sites intracellulaires. De ce point de vue les deux souches présentent un comportement identique.

Néanmoins cette « fixation » n'est pas totale et, dans nos essais, dès que la dose initiale dépasse 2 LMR la dose résiduelle dans le « vin » est encore supérieure à la dose admissible.

Dans la poursuite de cette étude nous nous intéresserons à certains aspects de l'action de ces molécules : rémanence de l'effet sur les cellules « filles », stades physiologiques de plus grande sensibilité, effets irréversibles sur l'ADN cellulaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIZEAU C. et THOUVENOT D., 1990. Mise en évidence de divers facteurs pouvant influencer la vitesse de fermentation du jus de pommes. *Cahier scientifique et technique*, 330-335.
- BONALY R., 1991. Ultrastructure des levures, 97-110. In : *Biotechnologie des levures*. ed. Masson, Paris, 426 p.
- BUCHENAUER H., 1987. Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds, 205-232. In *Modern selective fungicides*. ed. Longman scientific and technical, New York, 383 p.
- CABRAS P., ANGIIONI A., GARAU V.L., PIRISI F.M., FARRIS G.A., MADAU G. and EMONTI G., 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. *J. agriculture food chemistry*, **47**, 3854-3857.
- CUINIER C., 1996. Influence éventuelle des produits phytopharmaceutiques sur les fermentations et la qualité des vins. *Rev. fr. œnol.*, **159**, 41-43.
- DUBERNET M., FORTUNE G. et SIMON F., 1990. Enquête : produits de traitement de la vigne et accidents de fermentation. *Rev. fr. œnol.*, **123**, 35-43.
- DUNAS M., IRASTORZA A., FERNANDEZ K., BILBAO A., and HUERTA A., 1994. Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *J. food sci.*, **59**, 1060-1064.
- HARGREAVES J.A., KEON J.P.R. and CROXEN R., 1996. Molecular genetics of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, 117-125. In *Modern fungicides and antifungal compounds*. ed. Intercept, U.K., 578 p.
- JACKSON R.S., 1994. *Wine science, principles and applications*. Ed. Academic press, San Diego, California.
- LAL S. and LAL R., 1987. Bioaccumulation, metabolism and effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **16**, 753-757.
- MEZIERES G., REY et CARBONNEL M., 1988. Les résidus des produits de traitements dans la vendange et leur influence sur la vinification. *Rev. fr. œnol.*, **114**, 19-22.
- MICHEL A., BIZEAU C. et DRILLEAU J.F., 1990. Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre. *Belgian j. food chem. biotec.*, **45**, 98-104.
- MONTEIL H., BLAZY-MAUGEM F. et MICHEL G., 1986. Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Sci. alim.*, **30**, 349-360.
- NISHIMURA K., YAMAMOTO M., NAKAGONI T., TAKIGUCHI Y., NAGANUMA T. and USUKA Y., 2001. Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied microbiology and biotechnology*, **58**, 848-852.
- PANON G., 1997. Cultures mixtes et séquentielles de levures cidricoles : *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, *Hanseniaspora valbyensis* et *Metschnikowia pulcherrima*. Rôle de l'oxygène et suivi des paramètres de fermentation en milieu modèle. *Sci. alim.*, **17**, 193-217.
- PILONE G.J., 1986. Effect of triadimenol fungicide on yeast fermentations. *Am. J. enol. vitic.*, **37**, 304-306
- POGACNIK L. and FRANKO M., 1999. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection. *Biosensors & Bioelectronics*, **14**, 569-578.
- RIBEIRIO I.C., VERISSIMO I., MONIZ L., CARDOSO H., SOUSA M.J., SOARES A.M.V.M. and LEÃO C., 2000. Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides penconazole, cymoxanil and dichlofluanid. *Chemosphere*, **41**, 1637-1642.
- VIVIANI-NAUER A., HOFFMAN-BOLLER P. and GAFNER J., 1997. *In vitro* degradation of phthalimide in aqueous solutions and in yeast suspensions. *Am. J. enol. vitic.*, **48**, 63-66.
- VASSEROT Y., 1996. La fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae* : aspects biochimiques et physiologiques. *Rev. fr. œnol.*, **159**, 13-16.

Manuscrit reçu le 8 février 2005 ; accepté pour publication, après modifications le 31 mars 2005