

Des éléments biochimiques des grains de blé capables de réduire les niveaux de contamination en mycotoxines ?

THÉMATIQUE DE RECHERCHE :

Risque microbiologique
en santé animale
et alimentation humaine

*Les céréales sont susceptibles d'être contaminées par des substances secrétées par des moisissures, les mycotoxines. En Europe, les plus préoccupantes sont les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines, des mycotoxines produites au champ avant récolte par des espèces fongiques du genre *Fusarium*. La consommation répétée de faibles quantités de ces toxines, fréquemment retrouvées sur les grains, pourrait provoquer chez l'homme des intoxications alimentaires chroniques. Les mycotoxines de *Fusarium* sont particulièrement thermostables. Les procédés de décontamination des grains sont très limités. Les stratégies de maîtrise du risque ne peuvent alors être fondées que sur des actions de prévention de la contamination des grains, actions menées en pré-récolte. Une des voies les plus prometteuses pour réduire les niveaux de toxines repose sur l'utilisation de variétés céréalières moins sensibles à l'accumulation de ces molécules indésirables. Identifier et élucider le mode d'action d'éléments biochimiques des grains capables de bloquer la production de toxines est un des axes prioritaires des recherches menées au sein de l'unité de Mycologie et sécurité des aliments du centre de recherche Inra de Bordeaux-Aquitaine.*

DEMARCHE DE RECHERCHE

Nature et localisation des éléments biochimiques inhibiteurs.

Dans la perspective d'identifier les éléments biochimiques que *Fusarium* rencontre lorsqu'il infecte les grains de blé ou de maïs, les chercheurs de l'unité Mycologie et sécurité des aliments (MycSA) réalise en plein champ des cinétiques d'infection par *Fusarium*. Tout en suivant la cinétique de développement du champignon et de sa production de toxines, ils caractérisent l'évolution de la composition biochimique des grains au cours de leur remplissage.

Parallèlement, la localisation des entités "anti-toxines" est étudiée à l'échelle des tissus végétaux après fractionnement du grain. Sons, semoules et farines sont inoculés à l'aide d'un panel de *Fusarium*. Développement fongique et production de toxines sont quantifiés et comparés.

Purification et identification d'éléments inhibiteurs de la production de toxines à partir de tissus végétaux.

Les tissus végétaux du grain, susceptibles de contenir des éléments biochimiques inhibiteurs des voies de biosynthèse des toxines, sont soumis à différents schémas de fractionnement afin d'obtenir une fraction qui renferme l'activité inhibitrice la plus pure possible. Cette fraction est soumise à différentes analyses qui exploitent la technologie de spectrométrie de masse et permettent à son identification. ➔

➤ **Impact de molécules biochimiques candidates sur la biosynthèse de toxines par *Fusarium***

Grâce à l'enrichissement des connaissances sur les voies de biosynthèse des toxines, certaines molécules présentes dans les grains au moment où *Fusarium* produit ses toxines, s'avèrent, de par leur structure et propriétés chimiques, être de bons candidats susceptibles d'interférer avec la production de toxines. Sont ainsi suspectées toutes molécules possédant des propriétés pro ou antioxydantes. L'efficacité de ces molécules et l'étude des mécanismes d'inhibition sont analysées par des approches couplant techniques biochimiques et moléculaires.

ÉTAT DES CONNAISSANCES

Les résultats les plus significatifs sont pour l'instant ceux qui concernent la contamination des blés par les trichothécènes.

Les enveloppes externes du grain de blé : réservoir de composés inhibiteurs.

Ensemencés sur des sons de blés, les champignons de type *Fusarium* ne produisent que très peu de trichothécènes alors qu'ils se développent de façon significative. Ces mêmes sons de blés ajoutés à un milieu de culture optimal pour la production de toxines induisent une inhibition conséquente de la synthèse de trichothécènes. Autant d'indices pour suspecter la présence de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes dans les enveloppes externes des blés...

Les acides phénoliques monomères, de puissants effecteurs de la biosynthèse des trichothécènes.

Concentrés dans les enveloppes externes des grains, les acides phénoliques sous forme monomérique sont aussi présents au moment où la production de toxines par *Fusarium* s'initie et pour certains (en particulier l'acide férulique) en concentration importante. Les études menées par l'unité MycSA ont démontré que les acides férulique, *p*-coumarique, caféique, sinapique et chlorogénique inhibaient très efficacement la production de trichothécènes et ce pour des concentrations proches de celles présentes dans les céréales. Cette inhibition semble étroitement corrélée au potentiel antioxydant que possèdent ces molécules. Les acides phénoliques bloqueraient la synthèse de toxines en réduisant l'expression des principaux gènes codant les enzymes des voies de biosynthèse. Individuellement, les acides phénoliques jouent le rôle de molécules "anti-toxine". L'efficacité de mélanges d'acides phénoliques, tels que présents dans les grains est actuellement évaluée au sein de l'unité MycSA.

Quel rôle attribuer aux oligomères d'acides phénoliques ?

Une approche de purification, mettant en jeu plusieurs étapes chromatographiques, a permis d'isoler une fraction de sons de blé qui renferme une activité inhibitrice très significative. L'analyse de cette fraction par spectrométrie de masse a montré que son activité inhibitrice résultait de la présence d'une entité biochimique dont la structure, proche de celle de dimères d'acides phénoliques, est en cours de caractérisation. L'efficacité "anti-toxine" de cet élément biochimique s'avère nettement supérieure (près de 10 fois) à celles des monomères d'acides phénoliques. Pour confirmer le rôle potentiel des formes oligomériques d'acides phénoliques, les chercheurs de l'unité MycSA ont entrepris leur synthèse chimique et testeront l'efficacité des dimères ainsi synthétisés.

Les recherches menées au cœur de notre unité ont démontré le rôle potentiel des acides phénoliques dans la modulation des niveaux de mycotoxines dans les grains. Ces données sont en cours de validation *in planta*, en étroite collaboration avec les acteurs des filières céréales et en particulier les semenciers.

Are biochemical elements in wheat grains capable of reducing levels of mycotoxin contamination?

RESEARCH AREA :

Microbiological risks
 in animal health
 and human food
 and nutrition

Cereals are susceptible to contamination by substances secreted by moulds, or mycotoxins. In Europe, the most worrying substances are trichothecenes, zearalenone and fumonisines, which are mycotoxins produced in the field prior to harvest by fungal species in the Fusarium genus. The repeated consumption of small quantities of these toxins (that are frequently found on grains), may cause chronic food poisoning in humans. Fusarium mycotoxins are particularly heat-stable, so that range of processes available to decontaminate grain is very limited. In this context, risk control strategies can only be based on actions to prevent grain contamination prior to harvest. One of the most promising means of reducing toxin levels is based on using cereal varieties that are less susceptible to an accumulation of these undesirable substances. Identifying and elucidating the mode of action of biochemical elements in grain that can block toxin product is one of the priority areas of research carried out in the Mycology and Food Safety Research Unit at the Bordeaux-Aquitaine Research Centre.

RESEARCH APPROACH

Nature and localisation of inhibitory biochemical elements.

In order to identify the biochemical elements encountered by Fusarium when it infects wheat or maize grains, scientists in the Mycology and Food Safety Research Unit (MycSA) have carried out field experiments on the kinetics of *Fusarium* infection. While monitoring the development kinetics of the fungus and its toxin production, they characterised changes affecting the biochemical composition of grains during filling.

In parallel, the localisation of "anti-toxin" entities was studied at the level of plant tissues following grain fractionation. Bran, meals and flours were inoculated with a panel of *Fusarium*. Fungal development and the production of toxins were quantified and compared.

Purification and identification of elements inhibiting toxin production in plant tissues.

Plant tissues in grains that may contain biochemical elements inhibiting the biosynthetic pathways of toxins were subjected to different fractionation regimes in order to obtain a fraction containing the purest possible inhibitory activity. This fraction then underwent different analyses (involving mass spectrometry) to enable its identification.



➤ **Impact of candidate biochemical compounds on the biosynthesis of toxins by *Fusarium***

Thanks to greater knowledge of pathways for the biosynthesis of toxins, some of the compounds present in grains at the time when *Fusarium* produces its toxins have shown, through their structure and chemical properties, that they might be able to interfere with toxin production. Thus any compounds endowed with pro- or anti-oxidant properties have been suspected. The efficacy of these compounds, and study of the mechanisms of inhibition, have been analysed using approaches that couple biochemical and molecular techniques.

STATE OF THE ART

The most significant results obtained to date have concerned the contamination of wheat by trichothecenes.

The outer coats of wheat grains: a reservoir of inhibitory compounds.

When seeded on wheat bran, fungi of the *Fusarium* produced very few trichothecenes, but these developed in a significant fashion. The same wheat bran added to a culture medium providing optimum conditions for toxin production induced a marked inhibition of trichothecene synthesis. These clues have led scientists to suspect the presence of compounds inhibiting trichothecene biosynthesis in the outer coat of wheat grains.

Monomeric phenolic acids, potent effectors of trichothecene biosynthesis.

Concentrated in the outer coats of grains, phenolic acids in a monomeric form are also present at the initiation of toxin production by *Fusarium*, and some of them (particularly ferulic acid) at high concentrations. Studies performed by the MycSA Unit have demonstrated that ferulic, *p*-coumaric, caffeic, sinapic and chlorogenic acids very efficiently inhibited the production of trichothecenes at concentrations similar to those present in cereals. This inhibition appeared to be closely correlated to the antioxidant potential of these compounds. Phenolic acids thus blocked toxin synthesis by reducing the expression of the principal genes coding for enzymes in the biosynthetic pathways. Individually, phenolic acids act as "anti-toxin" compounds. The efficacy of mixtures of phenolic acids, as they are found in grains, is currently being assessed by the MycSA Unit.

What role can be attributed to phenolic acid oligomers?

A purification approach involving several chromatographic steps has made it possible to isolate a fraction of wheat bran exhibiting highly significant inhibitory activity. Analysis of this fraction by mass spectrometry showed that its inhibitory activity resulted from the presence of a biochemical entity, the structure of which (similar to that of phenolic acid dimers) is currently being characterised. The "anti-toxin" efficacy of this biochemical element has proved to be markedly superior (nearly 10-fold) to that of phenolic acid monomers. To confirm the potential role of oligomeric forms of phenolic acids, researchers in the MycSA Unit have now initiated their chemical synthesis and will be testing the efficacy of the dimers thus produced.

Research carried out in the Unit has demonstrated the potential role for phenolic acids in modulating the levels of mycotoxins in cereals. These data are currently being validated *in planta*, in close collaboration with actors in the cereals sector, and particularly with seed producers.