



HAL
open science

Les phytomicronutriments des céréales : un élément de résistance à la fusariose et à l'accumulation de mycotoxines

Vessela Atanasova-Penichon, Florence Forget Richard-Forget

► To cite this version:

Vessela Atanasova-Penichon, Florence Forget Richard-Forget. Les phytomicronutriments des céréales : un élément de résistance à la fusariose et à l'accumulation de mycotoxines. *Innovations Agronomiques*, 2014, 42, pp.63-76. hal-02637350

HAL Id: hal-02637350

<https://hal.inrae.fr/hal-02637350v1>

Submitted on 27 May 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Les phytomicronutriments des céréales : un élément de résistance à la Fusariose et à l'accumulation de mycotoxines

Vessela Atanasova-Penichon¹ et Florence Richard-Forget¹

¹ INRA, UR 1264 Mycologie et Sécurité des Aliments, 71 Edouard Bourleaux, CS 20032, F-33882 Villenave d'Ornon cedex

Correspondance : vessela.atanasova-penichon@bordeaux.inra.fr

Résumé

Les fusarioses de l'épi principalement causées par *Fusarium graminearum* et *Fusarium verticillioides* sont deux maladies majeures affectant les céréales européennes. Ces deux champignons constituent une menace pour la qualité sanitaire des récoltes du fait de leur capacité à produire des mycotoxines, dont les trichothécènes de type B et les fumonisines. La sélection variétale est un des leviers les plus prometteurs pour pouvoir espérer contrôler efficacement et durablement les teneurs en mycotoxines dans les céréales. L'obtention de géotypes suffisamment résistants pour garantir des niveaux de mycotoxines les plus faibles possibles implique cependant une meilleure compréhension des mécanismes de résistance des plantes à la Fusariose et à l'accumulation de mycotoxines. Une des composantes de cette résistance est liée à leur capacité à réduire l'accumulation de mycotoxines dans les grains. Cette capacité peut résulter de deux mécanismes : la transformation métabolique de la toxine en composés moins toxiques et l'inhibition de la biosynthèse de la toxine. Ce second mécanisme met en jeu les phytomicronutriments présents dans les grains capables de moduler les voies de biosynthèse.

Cet article a pour objectif de synthétiser les avancées scientifiques les plus récentes qui permettent de préciser quels sont les phytomicronutriments présents dans les grains jouant un rôle clef dans les mécanismes de résistance des plantes à la Fusariose et accumulation de mycotoxines.

Mots-clés : Fusarium, mycotoxines, céréales, phytomicronutriments, antioxydants, résistance

Abstract: Phytomicronutriments in cereals: their involvement in resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation

Gibberella and *Fusarium Ear Rot* mainly caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*, are two major diseases affecting European cereals. The two former fungi are a serious threat to food safety because of their ability to produce a wide range of mycotoxins, including type B trichothecenes and fumonisins. The breeding of tolerant genotypes is one of the most promising strategies to efficiently control mycotoxins in cereals. This objective cannot be achieved without a better understanding of plant resistance mechanisms to *Fusarium* and mycotoxin accumulation. One component of this resistance is related to the ability of plant tissues to reduce mycotoxin accumulation. This capacity results from two mechanisms: metabolic transformation of the toxin into less toxic compounds and the inhibition of toxin biosynthesis. This second mechanism involves the occurrence of phytomicronutriments that are able to modulate the biosynthesis of mycotoxins.

This article aims at gathering the latest scientific advances that makes it possible to specify which grain phytomicronutriments play a key role in the mechanisms of plant resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation.

Keywords: Fusarium, mycotoxins, cereals, phytomicronutriments, antioxidants, resistance

1. Introduction

1.1 Les différents types de Fusariose

Fusarium est un champignon filamenteux phytopathogène. Son nom vient du latin *fusus* de par la forme en fuseau de spores de *Fusarium graminearum*, l'espèce la plus répandue et identifiée pour la première fois en 1884 en Angleterre. Depuis lors, des études ont montré qu'aucune région du monde où l'on cultive des céréales n'était épargnée (Placinta *et al.*, 1999). La fusariose a fait l'objet de plusieurs revues se focalisant sur les céréales dites «à petits grains» (Goswami et Kistler, 2004) et sur le maïs (Munkvold, 2003 ; Picot *et al.*, 2010). Il existe plusieurs formes de fusariose pouvant affecter les différentes parties de la plante depuis les racines jusqu'à l'épi, en passant par la tige. La fusariose de l'épi, sujet de cette étude, comprend en fait deux maladies distinctes dont certaines caractéristiques épidémiologiques se regroupent. La première désignée sous le terme GER pour *Gibberella Ear Rot* affecte l'ensemble des céréales et est causée par les espèces fusariennes de la section *Discolor*, dont l'espèce majoritaire est *Fusarium graminearum* (Logrieco *et al.*, 2002). La seconde, désignée sous le terme FER pour *Fusarium Ear Rot* (FER), plus spécifique du maïs, est induite par les espèces de la section *Liseola*, souvent appelées complexe d'espèces «*Gibberella fujikuroi*», qui comprend notamment *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* et *Fusarium subglutinans*. Chez les céréales, les pertes économiques liées à la fusariose qui induit une diminution significative des rendements varient selon la culture, les années et la situation géographique. Les années où les conditions climatiques sont favorables à la Fusariose, les pertes de rendements peuvent atteindre 30%.

1.2 Les mycotoxines associées aux Fusarioses

Certaines espèces de *Fusarium* ont la capacité de produire des mycotoxines. Ces mycotoxines sont un problème supplémentaire pour les filières touchées par la fusariose. Ces molécules toxiques, issues du métabolisme secondaire fongique, sont nocives pour l'homme comme pour les animaux d'élevage. Plusieurs familles de mycotoxines peuvent être produites par les espèces de *Fusarium*. Elles sont désignées sous le nom de fusariotoxines. Parmi les fusariotoxines présentes sur céréales en Europe, les trichothécènes (TCT), les fumonisines (FB) et la zéaralénone (ZEA) sont les plus fréquemment rencontrées. La structure de ces mycotoxines ainsi que les espèces productrices sont reportées sur la Figure 1.

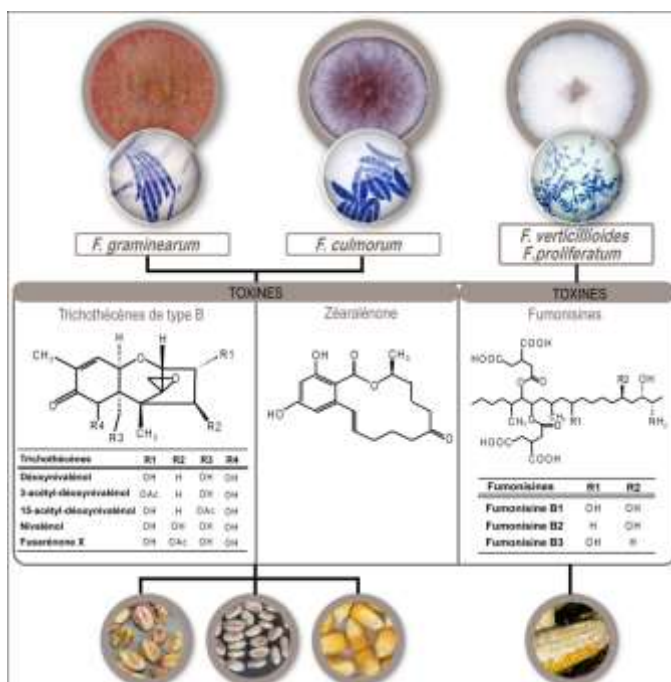


Figure 1 : Principales familles de fusariotoxines chez les céréales et leurs espèces productrices.

Les effets toxiques avérés ou suspectés associés aux fusariotoxines peuvent être très divers. Parmi les plus fréquemment décrits se trouvent des effets cancérigène, mutagène, immunomodulateur, hépatotoxique, oestrogénique. Les événements d'intoxication aiguës sont très peu probables en Europe. Par contre, l'impact d'une consommation de faibles doses, de façon répétitive, sur une longue période (toxicité chronique) demeure beaucoup plus préoccupant. Cette forte préoccupation est à l'origine de la publication dès 2006 d'un règlement de la Commission Européenne CE n° 1881/2006 (révisé, CE n° 1126/2007 le 28 septembre 2007) fixant les teneurs maximales en certaines mycotoxines dans les denrées alimentaires. En application depuis le 1^{er} octobre 2007, cette réglementation aggrave les conséquences économiques liées à la Fusariose. Les fusariotoxines sont des molécules particulièrement stables, résistantes aux procédés agro-alimentaires et se retrouvent dans les produits finis. Aussi la maîtrise de la contamination des céréales et produits dérivés implique de limiter leur production au champ, avant la récolte. Il est alors indispensable d'identifier et de maîtriser les facteurs capables de moduler l'infection par *Fusarium spp* ainsi que sa mycotoxinogénèse.

1.3 Résistance des céréales à la Fusariose et à l'accumulation des mycotoxines

Au champ, les niveaux de contamination en fusariose et en mycotoxines sont le résultat d'une triple interaction Hôte - Pathogènes - Environnement (Figure 2). Le facteur prépondérant est le facteur climatique. Les pratiques agronomiques et la sélection variétale sont les deux autres leviers majeurs sur lesquels il est possible de jouer pour limiter le risque de contamination des récoltes en mycotoxines. La sélection de variétés résistantes à *Fusarium*, par des méthodes de sélection traditionnelle associées à des méthodes de sélection assistée par marqueurs, serait une voie des plus prometteuses de la lutte contre la fusariose (Bily *et al.*, 2003 ; Atanasova-Penichon *et al.*, 2012 ; Picot *et al.*, 2013). Les progrès génétiques sont actuellement freinés par la connaissance incomplète des mécanismes de résistance des céréales à la fusariose et accumulation de mycotoxines.

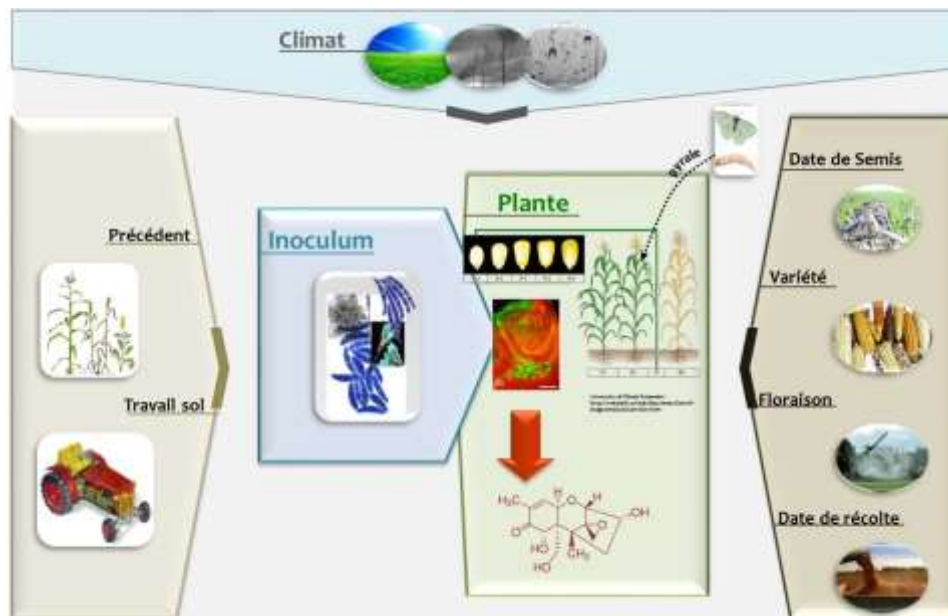


Figure 2 : Facteurs impactant la contamination des céréales en trichothécènes de type B.

La résistance à la fusariose incluant la variable toxine est une résistance à plusieurs composantes, décrite chez le blé, et transposable au maïs. Ces composantes décrites chez le blé sont au nombre de cinq :

- Type I : résistance à l'infection initiale.
- Type II : résistance à la propagation du mycélium.
- Type III : le champignon se développe sur l'épi, mais ne pénètre pas dans le grain.
- Type IV : la présence du champignon dans le grain n'engendre pas de pertes de rendement.
- Type V : résistance à l'accumulation de mycotoxines. Comme défini par Boutigny *et al.* (2008), elle peut être divisée en deux mécanismes : par sa composition biochimique, le grain est capable de dégrader ou détoxifier les mycotoxines par voie enzymatique (résistance de type V-1) ou d'inhiber leur biosynthèse (résistance de type V-2).

La glycosylation des trichothécènes, conduisant aux toxines dites "masquées", est le mécanisme de détoxification le plus documenté dans la littérature. Dès 1985, Miller et Arnason ont supposé l'existence de ce mécanisme dans des cultures cellulaires de blé (Miller *et al.*, 1985). Un autre mécanisme, plus récemment décrit est basé sur la formation de sulfates. Des exemples de métabolisation de la zéaralénone en zéaralénone-14-sulfate chez le maïs ont été mentionnés (De Boevre *et al.*, 2014). Deux autres voies de métabolisation sont susceptibles de conduire à une détoxification des trichothécènes, mais leur occurrence dans les grains n'a cependant jamais été démontrée. La première voie est l'acétylation. L'acétylation est un mécanisme exploité par *Fusarium* pour se protéger de ses propres mycotoxines. La deuxième voie est la déépoxydation, le groupement époxyde étant un des principaux acteurs de la toxicité des trichothécènes. En effet, la dé-époxydation de DON et de NIV induit une diminution de leur toxicité par un facteur 50 (Eriksen *et al.*, 2004).

En ce qui concerne la résistance de type V-2 et l'identification de composés endogènes des grains capables d'inhiber la production de mycotoxines, plusieurs études suspectent l'implication des phytomicronutriments aux propriétés antioxydantes comme les composés phénoliques, les caroténoïdes (isoprénoïdes) et les tocophérols.

Cet article a pour objectif de synthétiser les avancées scientifiques les plus pertinentes concernant le rôle potentiel des phytomicronutriments dans la résistance à la Fusariose et accumulation de mycotoxines. Les travaux détaillés concernent le pathosystème maïs/*F. graminearum*. Cependant, des exemples sur blé et blé/*F. graminearum* et maïs/*F. verticillioides* grains sont abordés. Les résultats acquis ou en cours d'acquisition qui nous ont semblé les plus prometteurs appartiennent à trois domaines : (i) les données issues des études *in vitro* sur les effets des phytomicronutriments sur la croissance mycélienne et la biosynthèse des mycotoxines par *Fusarium*, (ii) les données sur la composition en phytomicronutriments des céréales et les résultats sur des études *in planta*, concernant l'évolution de la composition biochimique du grain au cours du temps et (iii) la mise en évidence de liens entre résistance et teneurs en phytomicronutriments.

2. Les phytomicronutriments aux propriétés antioxydantes : modulateurs *in vitro* du développement fongique et de la toxino-génèse

Les trichothécènes sont synthétisés à partir du trichodiène par une série de réaction d'oxydation (Desjardins *et al.*, 1993). Il est ainsi logique d'imaginer que des modifications du potentiel redox du milieu de culture peuvent interférer avec le métabolisme secondaire du champignon et moduler les niveaux de trichothécènes produits (Ponts, 2005). Ainsi, compte tenu des propriétés antioxydantes des composés phénoliques, plusieurs études ont été consacrées à leur effet antifongique et antimycotoxine. Les acides phénoliques sont fongitoxiques vis-à-vis de nombreux champignons, incluant *Fusarium* (Guiraud *et al.*, 1995 ; Ponts *et al.*, 2011). *In vitro*, Guiraud *et al.* (1995) ont déterminé une CI50 (concentration inhibant 50% de la croissance fongique) d'environ 5 mM (soit 970 µg/g) pour l'acide férulique vis-à-vis de *F. coeruleum*, *F. moniliforme* ou *F. solani*. Vis-à-vis de *F. graminearum* et *F.*

culmorum, la CI50 de l'acide férulique est respectivement de 668 µg/g et 329 µg/g (McKeehen *et al.*, 1999). Assabgui *et al.* (1993) rapportent des valeurs similaires de CI50 de 647 µg/g vis-à-vis de *F. graminearum*. Dans l'étude de Ponts *et al.* (2011) ainsi que dans des travaux plus récents réalisés dans le cadre du projet EcoFusa (financé par le CASDAR, 2011-2013), des valeurs similaires ont été obtenues concernant les CI50 de divers acides phénoliques vis-à-vis de *F. graminearum* et *F. culmorum* et ont permis de classer les acides phénoliques en fonction de leur CI50, du moins inhibiteur au plus inhibiteur : acide p-hydroxybenzoïque < acide gallique < acide protocatéchuique < acide sinapique < acide caféique < acide syringique < acide p-coumarique < acide férulique. Autrement dit, les dérivés de l'acide cinnamique ont une action inhibitrice de la croissance plus importante que les dérivés de l'acide benzoïque (à part l'acide syringique). Il est intéressant également de noter que les souches de *F. culmorum* (CI50 entre 1,6 et 5,3 mM) sont beaucoup plus sensibles à l'acide férulique que les souches de *F. graminearum* (CI50 entre 1 et 3 mM).

Outre les propriétés antifongiques des phytomicronutriments citées ci-dessus, il a été montré que les antioxydants des céréales possèdent des propriétés "anti mycotoxines". Ainsi, des études *in vitro* (Boutigny, 2007) ont montré que les dérivés de l'acide cinnamique (acides sinapique, caféique, p-coumarique, chlorogénique et férulique) ont tous un effet inhibiteur de la biosynthèse des TCT B alors que les dérivés de l'acide benzoïque, à l'exception de l'acide syringique, ont un effet activateur. D'autres travaux ont montré que des composés antioxydants pouvaient avoir un effet inhibiteur de la production de mycotoxines, telles que les aflatoxines (Passone *et al.*, 2005) ou encore les fumonisines (Torres *et al.*, 2003 ; Atanasova-Penichon *et al.*, 2014). Il est important de noter que les effets des molécules citées ci-dessus sur la mycotoxinogénèse sont souche ainsi que molécule dépendants. Cependant, comme l'ont suggéré Guiraud *et al.* (1995) et confirmé par des études récentes (Boutigny, 2007 ; Ponts *et al.*, 2011), la toxicité des acides phénoliques vis-à-vis des champignons semble être liée à leurs propriétés antioxydantes fortes (Rice-Evans *et al.*, 1996) ainsi qu'à leurs propriétés lipophiles. Ces dernières se traduisent par l'aptitude des molécules à pénétrer dans les cellules. Il apparaît que les acides phénoliques les plus lipophiles ont un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse alors que les moins lipophiles auraient un effet stimulateur. Un seuil de lipophilicité pourrait exister ; au-delà de ce seuil, un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse serait induit par les composés les plus lipophiles. De plus, il semble que la toxicité des acides phénoliques soit aussi liée à leur interaction avec diverses enzymes fongiques intra ou extracellulaires, incluant les phénol-oxydases (Guiraud *et al.*, 1995). Les acides phénoliques sont décrits comme de puissants inhibiteurs d'activités hydrolytiques (El Modafar *et al.*, 2000 ; Paul *et al.*, 2003). Il a été suggéré par Adams et Moss (1995) que les antioxydants pourraient agir au niveau de la membrane cellulaire, entraînant une altération de la perméabilité membranaire.

Les caroténoïdes et les tocophérols sont des constituants des céréales possédant aussi de fort potentiel antioxydant, mais peu d'études ont été consacrées à leur effet antifongique et anti mycotoxine. Les résultats des études publiées sont contradictoires, dépendant des mycotoxines ciblées. Ainsi, Masood *et al.* (1994) ont montré l'effet inhibiteur de la capsanthine (caroténoïde majeur du paprika) vis à vis de la biosynthèse de l'aflatoxine, alors qu'une étude plus récente (Santos *et al.*, 2010) suggère son absence d'effet sur la biosynthèse de l'ochratoxine. Des travaux récents ont montré que des doses sublétales d' α -tocophérol (0,1 mM) inhibent l'accumulation de fumonisines par *F. verticillioïdes* (Picot *et al.*, 2013) et que le β -carotène à 50 µg/ml inhibe de 50-60% les niveaux de TCTB produits par *F. culmorum* (Boutigny, 2007).

3. Les phytomicronutriments des céréales

Les phytomicronutriments des céréales sont essentiellement de trois types : composés phénoliques, caroténoïdes et tocophérols. Parmi les composés phénoliques, les acides phénoliques sont les phénylpropanoïdes majeurs et nous focaliserons notre discussion sur cette famille de phytomicronutriments. Ces acides sont dérivés directement soit de l'acide cinnamique soit de l'acide

benzoïque et sont situés à des carrefours métaboliques importants puisque précurseurs des différents composés phénoliques. Les acides phénoliques existent sous deux formes. Ils peuvent être solubles (libres) ou insolubles (liés). Les acides phénoliques solubles peuvent être libres ou alors conjugués par liaison ester ou par liaison glycosidique alors que les acides phénoliques insolubles sont liés à la paroi par des liaisons esters ou éthers. Ces composés sont localisés dans la vacuole et essentiellement au niveau des couches externes du grain, c'est-à-dire dans le péricarpe et la couche à aleurone mais également dans le germe. Ils sont très peu présents dans l'endosperme (Sen *et al.*, 1994). Dans une étude comparative menée sur blé, avoine, riz et maïs (Adom et Liu, 2002), les grains de maïs ont été reportés comme les plus riches en acides phénoliques totaux. Leur concentration est proche de 15 $\mu\text{mol/g}$, exprimée en équivalent acide gallique. Cette concentration est double de celle observée sur grains de blé. Selon Adom et Liu (2002), 15 % des acides phénoliques du maïs seraient présents sous forme soluble, 85 % liés aux parois par liaisons ester ou éther. Parmi les acides phénoliques solubles, l'acide férulique est de loin la forme majoritaire (Adom et Liu, 2002 ; Bakan *et al.*, 2003 ; Santiago *et al.*, 2007), suivi de l'acide *p*-coumarique. Les acides caféique et *p*-hydroxybenzoïque sont aussi présents en très faibles quantités, de l'ordre de 0.2 $\mu\text{g/g}$ de grain dégermé contre 200 $\mu\text{g/g}$ pour la somme des isomères d'acide férulique (Bakan *et al.*, 2003). Outre les acides phénoliques, deux autres molécules plus complexes sont présentes dans le maïs en quantités importantes (Figure 3B). Il s'agit de dérivés de la putrescine, la diferuoylputrescine et la *p*-coumaroylputrescine (DFP et CFP) (Atanasova-Penichon *et al.*, 2012).

Les acides phénoliques insolubles (liés), extraits après hydrolyse alcaline, sont représentés majoritairement par l'acide férulique et, en plus faible concentration, les acides *p*-coumarique, caféique, vanillique et syringique. Selon Li *et al.* (2007), la concentration en acide férulique lié pourrait atteindre les 3 g/kg pour certains génotypes. Dans cette fraction insoluble, se trouvent aussi de nombreuses formes dimérisées de l'acide férulique qui représentent environ 25% des phytomicronutriments du maïs (Figure 3B). Les quatre dimères d'acide férulique les plus importants sont : DFA 8-5', DFA 5-5', DFA 8-0-4' et DFA 8-5' (Bakan *et al.*, 2003 ; Atanasova-Penichon *et al.*, 2012).

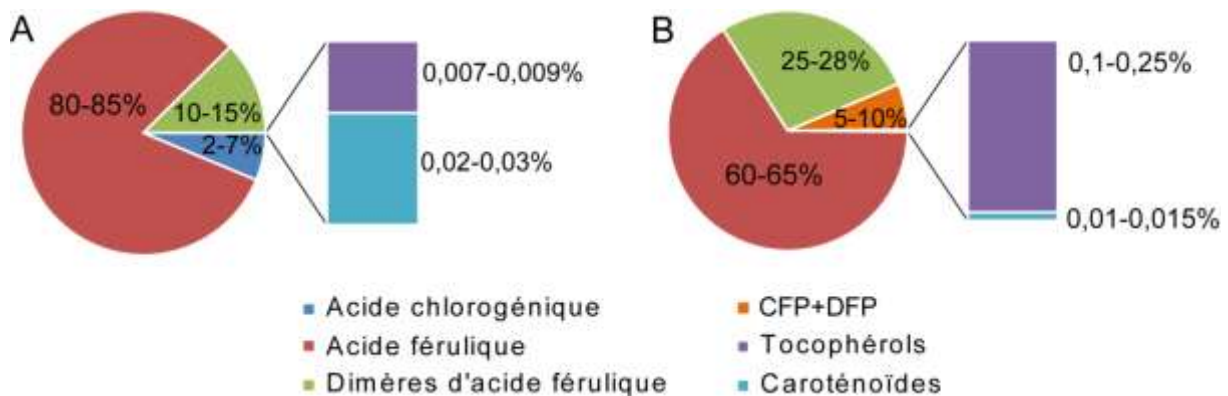


Figure 3 : Composition en phytomicronutriments des grains de maïs au stade où la mycotoxinogénèse s'initie (stades de gonflement et pâteux) (A) et au stade de maturité (B).

Parmi les phytomicronutriments liposolubles des céréales, on peut citer les tocophérols et les caroténoïdes. Ces derniers regroupent les carotènes et les xanthophylles. Des travaux récents menés sur le maïs (Picot *et al.*, 2013) ont montré que les phytomicronutriments liposolubles représentent à peine 0,2% des phytomicronutriments du maïs (Figure 3B). La lutéine et la zéaxanthine sont les caroténoïdes majoritaires dans les céréales (Abdel-Aal *et al.*, 2007; Ndolo et Beta, 2013) avec une prédominance de la lutéine qui varie entre 5-20 $\mu\text{g/g}$; le β -carotène est de l'ordre de 0.1 $\mu\text{g/g}$. C'est

dans le maïs que sont retrouvés le plus de caroténoïdes (30-35 µg/g). La lutéine est de loin la forme majoritaire et représente environ 60% des isoprénoïdes totaux suivie par la zéaxanthine qui représente environ 25-30%. Il est intéressant de noter que les teneurs en caroténoïdes varient selon les différentes parties du grain et surtout que ces teneurs sont différentes entre les céréales à petits grains et le maïs. Par exemple, l'endosperme est la partie des grains la plus riche en caroténoïdes et les concentrations sont plus élevées dans les maïs (32 µg/g) par rapport aux céréales à petits grains (2-14 µg/g). Au contraire, les concentrations en caroténoïdes, lutéine et zéaxanthine dans le germe sont plus élevées dans les céréales à petits grains que dans le maïs (Ndolo et Beta, 2013).

Concernant les tocophérols, leurs teneurs varient entre 0 et 20 µg/g selon la céréale considérée. Comme dans le cas des acides phénoliques et des caroténoïdes, les concentrations les plus élevées ont été détectées dans le maïs (15-20 µg/g) suivi du blé (0-20 µg/g) et du riz (2-6 µg/g) (Shammugasamy *et al.*, 2013).

4. Les phytomicronutriments rencontrés par *Fusarium spp.* lors de sa progression dans l'épi

Pendant longtemps, les études sur la composition des grains en métabolites secondaires susceptibles de moduler la biosynthèse de toxines par *Fusarium* se sont focalisées sur des analyses réalisées au stade mature, sur des épis prélevés à la récolte ou encore dans les soies à différents stades de développement (Reid *et al.*, 1992). Or au cours du remplissage, la composition du grain en phytomicronutriments est susceptible d'être fortement modifiée. Le champignon infecte les épis bien avant la récolte et la composition du substrat grain à laquelle il est confronté est vraisemblablement différente de celle du grain mature. Aucune donnée sur la composition du grain aux stades précoces, correspondant à la période d'expression de la biosynthèse de mycotoxines par *Fusarium* n'a été publiée à notre connaissance. Afin de combler ce manque d'information, l'INRA et ses partenaires se sont intéressés à identifier le stade où la toxino-génèse s'initie et ainsi de mettre en évidence les phytomicronutriments des grains de maïs que *F. graminearum* et *F. verticillioides* sont susceptibles de rencontrer. Grâce à deux études *in planta* sur maïs inoculé avec *F. graminearum* et *F. verticillioides* respectivement, le stade où la toxino-génèse s'initie a été défini entre 20 et 30 jours après floraison, c'est-à-dire entre les stades de gonflement et pâteux (Picot *et al.*, 2011; Atanasova-Penichon *et al.*, 2012). Les phytomicronutriments solubles et liés majeurs présents à ce stade sont détaillés en Figure 3A. L'acide férulique lié est le composé majoritaire et représente 80-85% des phytomicronutriments analysés (solubles et liés), suivi des dimères d'acide férulique (10-15%) et de l'acide chlorogénique (2-7%). Une attention plus particulière a été portée sur les phytomicronutriments solubles, notamment l'acide chlorogénique puisqu'il représente près de 80 % de la totalité des acides phénoliques solubles aux stades précoces. En effet, les phytomicronutriments solubles sont les plus susceptibles d'interférer avec *Fusarium*. Les caroténoïdes et les tocophérols sont présents à des concentrations beaucoup plus faibles que les acides phénoliques et représentent seulement 0.02-0.03% des phytomicronutriments totaux quantifiés à ce stade du développement des grains (Figure 3A). Cependant, les faibles concentrations de ces molécules ne les excluent pas comme d'éventuels inhibiteurs de la biosynthèse des fusariotoxines, car leur potentiel antioxydant est beaucoup plus fort que celui des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique.

Une autre question à laquelle les chercheurs de l'INRA et ses partenaires ont voulu répondre concerne l'évolution de ces phytomicronutriments au cours du remplissage du grain. Le premier résultat novateur et fondamental a été la mise en évidence d'une fluctuation très importante des teneurs en acides phénoliques solubles et liés ainsi que de celles des tocophérols et caroténoïdes au cours du remplissage du grain et que des différences très nettes de teneurs entre variétés identifiées aux stades précoces pouvaient être totalement estompées aux stades matures (Picot *et al.*, 2011; Atanasova-Penichon *et al.*, 2012). Sur la Figure 4, sont reportées les évolutions des teneurs en acides phénoliques

liés : acide férulique et dimères d'acide férulique, et solubles : acide chlorogénique, ainsi que celles des xanthophylles, caroténoïdes et tocophérols au cours du remplissage des grains. L'acide chlorogénique au même titre que l'ensemble des acides phénoliques libres monomères (non présentés sur la Figure 4) est présent dans le grain aux stades précoces jusqu'au stade pâteux, ce qui suggère que dès l'infection de l'épi, *F. graminearum* ou *F. verticillioïdes* rencontrent ces acides phénoliques dans leur environnement. Les diminutions des teneurs en acides phénoliques solubles pourraient être expliquées par le fait qu'une partie de ces molécules ait été engagée dans des réactions de polymérisation et se trouve intégrée à la paroi du grain en cours de maturation, et joue ainsi le rôle de ponts entre polysaccharides et polysaccharides et lignine. Il est très difficile de comparer ces résultats à des données issues de la littérature sur maïs ou autres céréales. En effet, à notre connaissance, l'acide chlorogénique n'a jamais été décrit comme un acide phénolique majoritaire des grains du fait d'analyses qui ont été essentiellement réalisées à partir de grains matures. Les xanthophylles et caroténoïdes suivent la même cinétique que les acides phénoliques solubles. Concernant la cinétique de l'acide férulique lié, une augmentation existe aux stades précoces suivie d'une diminution au cours du remplissage du grain qui est moins importante que celle des acides phénoliques libres. Quant à la cinétique des dimères d'acide férulique, au stade précoce, elle est similaire à celles des acides phénoliques solubles et des caroténoïdes ; par contre, une augmentation est observée au stade mature. Cette augmentation pourrait être expliquée avec l'implication de ces molécules dans la formation des parois cellulaires.

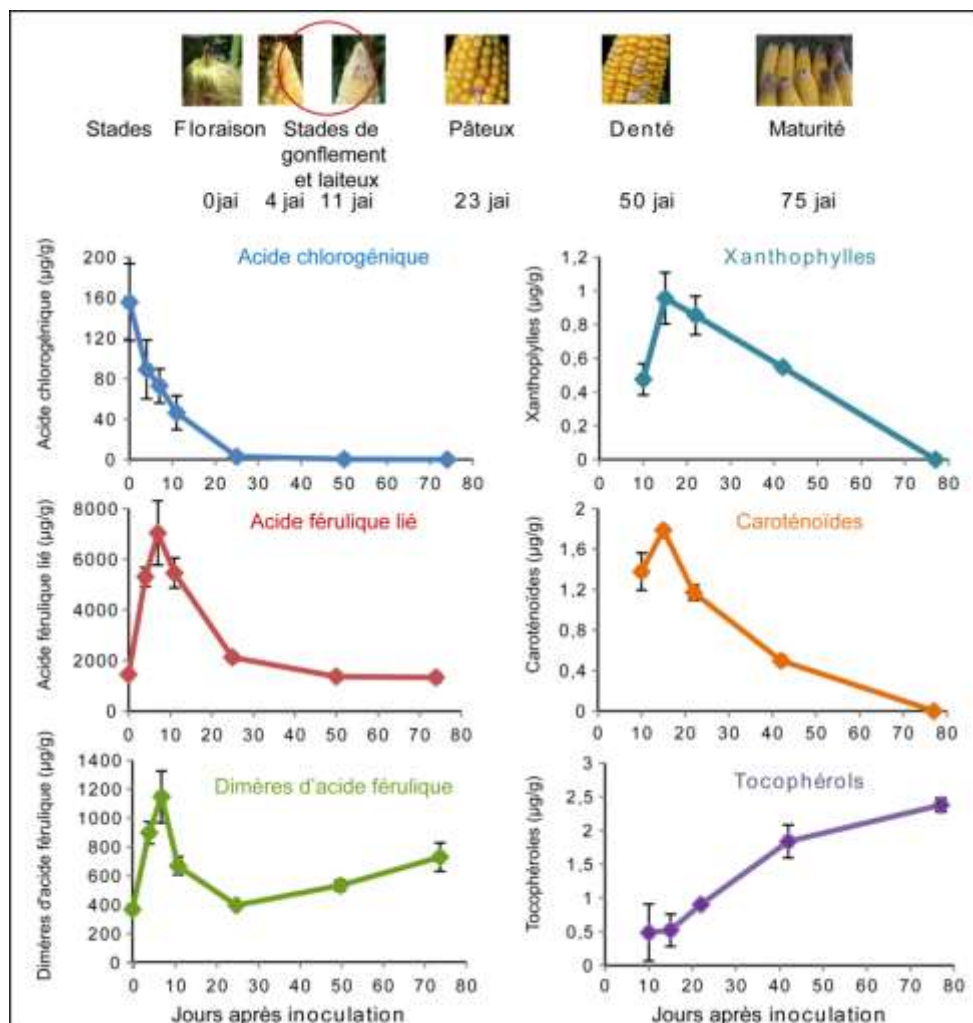


Figure 4 : Cinétiques des concentrations en phytomicronutriments du maïs au cours du remplissage des grains.

Ces évolutions ont été retrouvées pour les deux années d'expérimentation, suggérant qu'elles correspondent à une caractéristique intrinsèque à chacune des variétés observées et ne dépend pas des facteurs environnementaux. Un des résultats obtenus au cours de cette étude *in planta* a suggéré le rôle potentiel des phytomicronutriments et plus particulièrement de l'acide chlorogénique en tant que possibles inhibiteurs de la voie de biosynthèse des trichothécènes et marqueurs de résistance. Afin de vérifier cette hypothèse, il s'est avéré indispensable de compléter cette étude avec un panel de plusieurs génotypes.

5. Relation entre les teneurs en phytomicronutriments des grains de maïs au stade précoce et la résistance à la fusariose

Plusieurs études s'accordent sur le fait que l'utilisation de génotypes résistants pour lutter contre la fusariose et l'accumulation de mycotoxines est une des voies les plus prometteuses. La résistance à la fusariose et à l'accumulation de mycotoxines est un mécanisme très complexe, polygénique. Plusieurs composantes ont été identifiées dont la résistance à l'infection par *Fusarium*, la résistance à la progression de l'agent pathogène fongique et la résistance à l'accumulation de trichothécènes. Ces mycotoxines sont considérées comme des facteurs d'agressivité. Elles ne sont pas indispensables à l'infection mais leur production favorise la progression de *F. graminearum* dans les tissus végétaux. Chez le blé, il a été montré que le DON inhibait la formation du cal à la base des épillets, permettant à *F. graminearum* de se propager d'un épillet à l'autre. Parvenir à bloquer *in planta* la production de toxines permettrait ainsi de limiter le développement fongique et donc l'étendue des symptômes. Les résultats sur l'identification des mécanismes de modulation *in vitro* s'avèrent alors très intéressants car ils permettent de cibler les éléments biochimiques du grain qui pourraient, par leur structure et propriétés physicochimiques, moduler l'accumulation de toxines *in planta*. Les métabolites secondaires à propriétés antioxydantes apparaissent comme des candidats très pertinents ainsi que les activités enzymatiques impliquées dans les mécanismes d'oxydoréduction. Des études récentes (Picot *et al.*, 2013 ; Atanasova-Penichon *et al.*, 2014) ont pris en compte plusieurs génotypes de sensibilité différente à la fusariose et mis en évidence une richesse en acide chlorogénique, acide férulique et dimères d'acide férulique nettement supérieure dans les stades de remplissage précoce des grains des génotypes les plus résistants (Figure 5). La validation de l'acide chlorogénique comme marqueur de résistance est actuellement en cours.

Des travaux similaires menés chez le blé dur ont aussi soulevé le rôle potentiel de flavonols. Ces résultats sont en cours de vérification avec le phénotypage d'une descendance entre une variété sensible et une résistante.

Les composés phénoliques sont présents chez toutes les plantes et leurs rôles dans les mécanismes de résistance ont été décrits par de nombreux chercheurs (Nicholson et Hammerschidt, 1992). Ils interviendraient dans les mécanismes de défense des plantes en tant que constituants des parois cellulaires, en tant que composés antimicrobiens constitutifs des plantes ou induits en réponse à l'infection et en tant que molécule signal. La paroi végétale constitue une véritable barrière physique de défense contre les pathogènes. En réponse à l'infection, les acides phénoliques seraient synthétisés rapidement par la plante et polymérisés dans les parois cellulaires (Matern et Kneusel, 1988). Les acides phénoliques estérifiés aux polysaccharides consolident et stabilisent les parois cellulaires. Plusieurs études ont suggéré une relation entre le contenu en acides phénoliques (acide férulique, acide *p*-coumarique) des grains et le niveau de résistance à la fusariose chez le blé (McKeehen *et al.*, 1999 ; Siranidou *et al.*, 2002) et chez le maïs (Assabgui *et al.*, 1993).

Concernant la relation entre sensibilité à la fusariose et teneurs en tocophérols et caroténoïdes, les résultats n'ont pas permis de lier les teneurs en ces phytomicronutriments à la résistance. Au contraire,

les analyses statistiques ont montré des teneurs plus élevées en caroténoïdes dans les génotypes sensibles à la fusariose. D'ailleurs, les études sur ce sujet revendiquent des résultats assez contradictoires. Des résultats similaires à ceux décrits par les chercheurs de l'INRA ont été obtenus par Delgado *et al.* (2014) qui montrent une corrélation positive entre les teneurs en mycotoxines et la lutéine. Une autre étude, réalisée sur 380 échantillons de cinq variétés de riz montrent l'existence de corrélation négative ($r = -0,62$) entre les concentrations en aflatoxines et les tocophérols, ce qui suggère que ces phytomicronutriments pourraient être des marqueurs possibles de résistance chez le riz (Iqbal *et al.*, 2014).

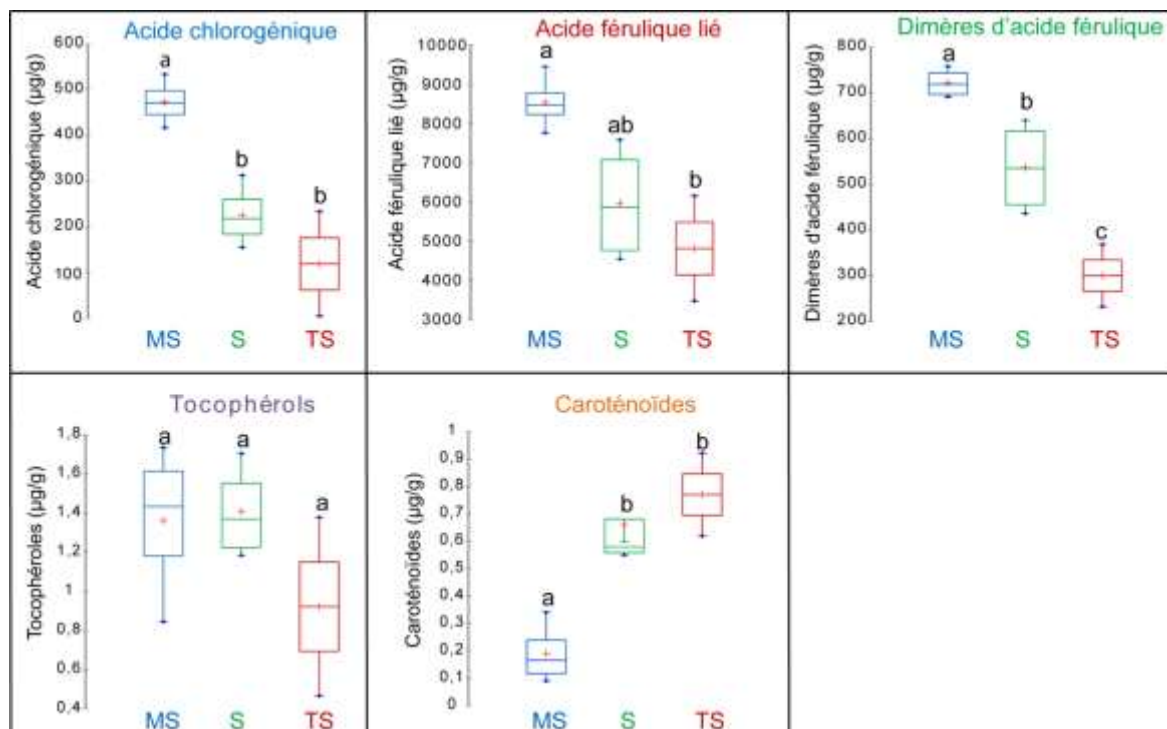


Figure 5 : Teneurs en acide chlorogénique, acide férulique lié, dimères d'acide férulique, tocophérols et caroténoïdes dans trois groupes de génotypes de maïs au stade laitieux possédant une sensibilité différente à la Fusariose : moyennement sensible (MS, $n = 3$), sensible (S, $n = 4$) et très sensible (TS, $n = 3$). Les différentes lettres indiquent les groupes significativement différents (Duncan, $\alpha = 0,05$).

Pour aller plus loin dans la recherche de métabolites des plantes inhibiteurs de la toxinogénèse, les projets de recherche futurs vont mettre en œuvre des approches beaucoup moins ciblées, non orientées autour d'une famille de composés chimiques et surtout non focalisées sur des molécules de structure connue : le développement d'approche métabolomique (analyse de l'ensemble des métabolites polaires et apolaires) devrait permettre de préciser la ou les signature(s) métabolomique(s) d'un grain associé à un génotype résistant.

Conclusion et perspectives

Les études récentes ou en cours de réalisation ont permis de produire des résultats tant fondamentaux qu'appliqués qui permettront de progresser dans la recherche de génotypes résistants à la fusariose et à l'accumulation de mycotoxines sur céréales. Il est cependant important de garder en mémoire que les résultats obtenus sont issus d'inoculations artificielles, une modalité qui limite l'impact des interactions que *F. graminearum* met en œuvre avec les autres espèces de *Fusarium*, autres genres fongiques et

bactériens, intégrant la complexité de la microflore de l'épi de céréale. La prise en compte de conditions de contamination naturelle sera indispensable pour valider les avancées permises par ces études.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de défense des plantes en réponse à un stress environnemental, en l'occurrence, la fusariose de l'épi, des études transcriptomiques et métabolomiques pourraient permettre l'identification de nouvelles fonctions ou composés biochimiques impliqués dans ces mécanismes. Une étude transcriptomique pourrait conduire à la détermination des gènes impliqués dans la résistance à la fusariose et permettrait d'affiner les cartes de marqueurs QTL. C'est ainsi que dans le cadre de l'interaction orge-*F. graminearum*, Boddu *et al.* (2006) ont mis en évidence l'implication des acides aminés aromatiques et composés indoliques. Une première étude consacrée à la réponse du maïs à *F. graminearum* a aussi, par approche différentielle, permis l'identification d'un gène, codant pour une ent-copalyl diphosphate synthase, qui pourrait être impliquée plus spécifiquement dans cette interaction (Harris, 2005). Une approche métabolomique permettrait une recherche sans *a priori* de potentiels marqueurs biochimiques de sélection. C'est ainsi que pour deux variétés différentes de blé quant à leur degré de résistance à la fusariose et pour deux conditions (épis inoculés et témoins), Hamzehzaghani *et al.* (2005) ont réalisé un profil métabolomique incluant plus de 700 composés. De cette étude sont ressortis 55 composés en concentrations plus élevées sur les épis inoculés. Seuls cinq de ces composés se sont trouvés être différents entre les deux variétés. Parmi ces cinq composés, l'acide m-triméthylsiloxycinnamique, issu de l'acide cinnamique de la voie des phénylpropanoïdes, a été identifié comme à la fois le plus abondant chez la variété de blé tolérante mais également régulé positivement après inoculation par *F. graminearum*. Ces résultats confortent l'idée que la voie des phénylpropanoïdes et plus spécifiquement les acides phénoliques sont impliqués dans les mécanismes de résistance à la fusariose de l'épi, comme déjà mis en évidence chez d'autres pathogènes (Dixon *et al.*, 2002 ; Lattanzio *et al.*, 2006).

Actuellement, l'utilisation de génotypes résistants à l'accumulation de mycotoxines constitue la voie préférentielle pour limiter la contamination des céréales par les toxines de *Fusarium*. Les études actuelles ouvrent de nouvelles perspectives pour la sélection de variétés résistantes à l'accumulation de fusariotoxines en se basant sur l'identification de marqueurs de sélection variétale.

Références bibliographiques

- Abdel-Aal E.S.M., Youn, J.C., Rabalski I., Hucl P., Fregeau-Rei, J., 2007. Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 787-794.
- Adams M.R., Moss M.O. 1995. Food Microbiology. In: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 498 p.
- Adom K.K., Liu R.H., 2002. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and food chemistry* 50, 6182-6187.
- Assabgui R.A., Reid L.M., Hamilt, R.I., Arnason J.T., 1993. Correlation of kernel (E)-ferilic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 83, 949-953.
- Atanasova-Penichon V., Bernillon S., Marchegay G., Lornac A., Pinson-Gadais L., Ponts N., Zehraoui E., Barreau C., Richard-Forget F., 2014. Bioguided Isolation, Characterization, and Biotransformation by *Fusarium verticillioides* of Maize Kernel Compounds That Inhibit Fumonisin Production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 1148-1158.
- Atanasova-Penichon V., Pons S., Pinson-Gadais L., Picot A., Marchegay, G., Bonnin-Verdal M.-N., Ducos C., Barreau C., Roucoll, J., Sehabiague P., Carolo P., Richard-Forget F., 2012. Chlorogenic Acid and Maize Ear Rot Resistance: A Dynamic Study Investigating *Fusarium graminearum* Development, Deoxynivalenol Production, and Phenolic Acid Accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 1605-1616.

- Bakan B., Bily A.C., Melcion D., Cahagnier B., Regnault-Roger C., Philogene B.J.R., Richard-Molard D., 2003. Possible role of plant phenolics in the production of Trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2826-2831.
- Bily A.C., Reid L.M., Taylor J.H., 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93, 712-719.
- Boddu J., Cho S., Kruger W., Muehlbauer G.J., 2006. Transcriptome analysis of the barley-*Fusarium graminearum* interaction. *The American Phytopathological Society* 19, 407-417.
- Boutigny A.-L., 2007. Etude de l'effet de composés du grain de blé dur sur la régulation de la voie de biosynthèse des trichothécènes B purification de composés inhibiteurs, analyse des mécanismes impliqués. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux, France.
- Boutigny A.-L., Richard-Forget F., Barreau C., 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* 121, 411-423.
- De Boevre M., Landschoot S., Audenaert K., Maene P., Di Mavungu J.D., Eeckhout M., Haesaert G., De Saeger S., 2014. Occurrence and within field variability of *Fusarium* mycotoxins and their masked forms in maize crops in Belgium. *World Mycotoxin J.* 7, 91-102.
- Delgado R.M., Sulyok M., Jirsa O., Spitzer T., Krska R., Polisenka I., 2014. Relationship between lutein and mycotoxin content in durum wheat. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 31, 1274-1283.
- Desjardins A.E., Hohn T.M., McCormick S.P., 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews* 57, 595-604.
- Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.-J., Redd, M.S.S., Wang L., 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3, 371-390.
- El Modafar C., Tantaoui A., El Boustani E., 2000. Effect of caffeoylshikimic acid of date palm roots on activity and production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* cell wall-degrading enzymes. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 148, 101-108.
- Eriksen G.S., Pettersson H., Lundh T., 2004. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology* 42, 619-624.
- Goswami R., Kistler H., 2004. Heading for disaster *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, 515-525.
- Guiraud P., Steiman R., Seiglemurandi F., Benoitguyod J.L., 1995. Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic-compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, 29-33.
- Hamzehzarghani H., Kushalappa A.C., Dion Y., Rioux S., 2005. Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against fusarium head blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66, 119-133.
- Harris S.D., 2005. Morphogenesis in germinating *Fusarium graminearum* macroconidia. *Mycologia* 97, 880-887.
- Iqbal S.Z., Mustafa H.G., Asi M.R., Jinap S., 2014. Variation in vitamin E level and aflatoxins contamination in different rice varieties. *Journal of Cereal Science* 60, 352-355.
- Lattanzio V., Lattanzio V.M.T., Cardinali A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: advances in research*. Editor Imperato, F, 23-67.
- Li W.D., Wei C.L., White P.J., Beta T., 2007. High-amylose corn exhibits better antioxidant activity than typical and waxy genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 291-298.
- Logrieco A., Mule G., Moretti A., Bottalico A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 597-609.

- Masood A., Dogra J.V.V., Jha A.K., 1994. The influence of coloring and pungent agents of red chilli (*Capsicum annum*) on growth and aflatoxin production by *Aspergillus-flavus*. Letters in Applied Microbiology 18, 184-186.
- Matern U., Kneusel R.E., 1988. Phenolic-compounds in plant-disease resistance. Phytoparasitica 16, 153-170.
- McKeehen J., Busch R., Fulcher R., 1999. Evaluation of wheat (*Triticum aestivum L.*) phenolic acids during grain development and their contribution to Fusarium resistance. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 1476-1482.
- Miller J.D., Young J.C., Sampson D.R., 1985. Deoxynivalenol and Fusarium head blight resistance in spring cereals. Phytopathology 113, 359-367.
- Munkvold G.P., 2003. Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears. European Journal of Plant Pathology 109, 705-713.
- Ndolo V.U., Beta T., 2013. Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. Food Chemistry 139, 663-671.
- Nicholson R.L., Hammerschidt R., 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Ann Rev Phytopathol 30, 369-389.
- Passone M.A., Resnik S.L., Etcheverry M.G., 2005. *In vitro* effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B-1 accumulation by peanut *Aspergillus section Flavi*. Journal of Applied Microbiology 99, 682-691.
- Paul S.S., Kamra D.N., Sastry V.R.B., Sahu N.P., Kumar A., 2003. Effect of phenolic monomers on biomass and hydrolytic enzyme activities of an anaerobic fungus isolated from wild nil gai (*Baselophus tragocamelus*). Letters in Applied Microbiology 36, 377-381.
- Picot A., Atanasova-Pénichon V., Pons S., Marchegay G., Barreau C., Pinson-Gadais L., Roucolle J., Daveau F., Caron D., Richard-Forget F., 2013. Maize Kernel Antioxidants and Their Potential Involvement in Fusarium Ear Rot Resistance. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 3389-3395.
- Picot A., Barreau C., Pinson-Gadais L., Caron D., Lannou C., Richard-Forget F., 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. Critical Reviews in Microbiology.
- 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. Applied and Environmental Microbiology 77, 8382-8390.
- Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. Animal Feed Science and Technology 78, 21-37.
- Ponts N., 2005. Influence de stress oxydatifs sur la biosynthèse de mycotoxines de *Fusarium spp.* contaminantes de l'épi de Maïs. Thèse de doctorat, Université Bordeaux, France.
- Ponts N., Pinson-Gadais L., Boutigny A.L., Barreau C., Richard-Forget F., 2011. Cinnamic-Derived Acids Significantly Affect *Fusarium graminearum* Growth and *In Vitro* Synthesis of Type B Trichothecenes. Phytopathology 101, 929-934.
- Reid L.M., Mather D.E., Arnason J.T., 1992. Changes in phenolic constituents of maize silk infected with *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Botany 70, 1697-1702.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med 20, 933-956.
- Santiago R., Reid L.M., Arnason J.T., Zhu X., Martinez N., Malvar R.A., 2007. Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to Gibberella stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). Journal of Agricultural and food chemistry 55, 5186-5193.
- Santos L., Kasper R., Gil-Serna J., Marin S., Sanchis V., Ramos A.J., 2010. Effect of Capsicum carotenoids on growth and ochratoxin A production by chilli and paprika *Aspergillus spp.* isolates. International Journal of Food Microbiology 142, 354-359.

Sen A., Bergvinson D., Miller S.S., Atkinson J., Fulcher R.G., Arnason J.T., 1994. Distribution and Microchemical Detection of Phenolic Acids, Flavonoids, and Phenolic Acid Amides in Maize Kernels. *Journal of Agricultural and food chemistry* 42, 1879-1883.

Shammugasamy B., Ramakrishnan Y., Ghazali H.M., Muhammad K., 2013. Combination of saponification and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1300, 31-37.

Siranidou E., Kang Z., Buchenauer H., 2002. Studies on Symptom Development, Phenolic Compounds and Morphological Defence Responses in Wheat Cultivars Differing in Resistance to Fusarium Head Blight. *Journal of Phytopathology* 150, 200-208.

Torres A.M., Ramirez M.L., Arroyo M., Chulze S.N., Magan N., 2003. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *International Journal of Food Microbiology* 83, 319-324.