

# THESE

Présentée à

## L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DE SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES, SCIENCES DE  
L'ENVIRONNEMENT

Par

Nadia PONTS

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

DISCIPLINE : BIOLOGIE SPECIALITE ALIMENTATION & NUTRITION

---

### **Influence de Stress Oxydatifs sur la Biosynthèse de Mycotoxines de *Fusarium spp.* Contaminantes de l'Epi de Maïs**

---

Soutenue le 19 décembre 2005, après avis de :

Mme OUELLET	Thérèse	<i>Directeur de Recherche</i>	Rapporteur
(ECORC, Ottawa, Canada)			

Et

M. LANGIN	Thierry	<i>Directeur de Recherche</i>	Rapporteur
(Université Paris Sud, Orsay, France)			

Devant la commission d'examen formée de :

M. DESCHAMPS	Alain	<i>Professeur</i>	Président
Mme RICHARD-FORGET	Florence	<i>Directeur de Recherche</i>	Directeur de Thèse
M. CANDRESSE	Thierry	<i>Directeur de Recherche</i>	Examineur
M. OLIVIER	Jean-Marc	<i>Directeur de Recherche</i>	Examineur



## *Remerciements*

---

J'adresse mes plus sincères remerciements à Florence Richard-Forget qui, tout au long de ces trois années de thèse, a su me prodiguer ses enseignements de toutes sortes tout en me laissant profiter d'une liberté d'action et de décision certaine. Travailler à la réalisation du projet de recherche qui m'avait été confié fut pour moi un plaisir. Et même si parfois la recherche scientifique est déprimante, il est certain qu'elle est plus souvent excitante. Et comme Florence me l'a si bien appris, il faut valoriser ses résultats... La déprime passe alors très vite... Qu'aurais-je fait sans vous ?

Je tiens également à remercier Laetitia Pinson-Gadais, sans qui *Fusarium* ne serait pas *Fusarium*... Je suis incapable de compter le nombre de fois où elle m'est venue en aide. Ses compétences sont très précieuses. Elle m'a transmis son affection particulière pour *Fusarium* (mais ça, je ne sais pas si c'est réellement un bienfait). Merci beaucoup Laetitia, ce fut un réel plaisir.

Toutes mes félicitations à Christian Barreau pour avoir résisté un hiver à mon comportement atypique en terme de thermorégulation de l'air de notre bureau... Que la vie est dure dans une équipe exclusivement féminine... Par-dessus tout, un grand merci pour l'ensemble des discussions, des conseils, des suggestions. Merci pour sa disponibilité. Je le remercie également d'avoir écouté mes râleries récurrentes sans jamais montrer d'impatience. En ce qui me concerne, la co-occupation de ce bureau s'avère être une riche idée. En revanche, sans doute étiez-vous plus paisible avant le Grand Déménagement...

Je remercie tout particulièrement Marie-Noëlle Verdal-Bonnin. Notre collaboration a commencé il y a maintenant longtemps ! Son assistance à la réalisation de nombreuses expériences a (presque) fait oublier la lourdeur du dispositif expérimental. Il est plus que certain que, sans elle, mes heures de sommeil auraient été bien plus réduites que ce qu'elles n'ont été. Un grand merci également à Gisèle Marchegay qui a plus que participé à cette thèse puisque sans elle, il est probable que je me serai perdue dans les méandres du célèbre « outil achat ». Merci à Françoise pour sa gestion des ressources bibliographiques (c'est vrai qu'il va falloir discipliner les utilisateurs tout de même). Merci à Marie-France pour son assistance administrative (et je n'aime vraiment pas les procédures administratives).



## *Remerciements*

---

Je remercie chaleureusement Christine qui, en plus de prendre soin jour après jour de mes chers *Fusarium*, a contribué au bon fonctionnement de mes zygomatiques au cours de ces trois dernières années (aussi bien au laboratoire qu'en-dehors, et je souhaite que ça continue). Mes pauses repas et mes pauses café se sont également vues animées par Anne-Laure (plus on est de fous plus on rit) et Vessela (j'aime beaucoup l'humour bulgare). Merci à Amadou et Bernard pour m'avoir fait me sentir moins seule dans ce monde de biologistes.

Merci à tous les membres de l'unité, l'ancienne version comme la nouvelle : ma foi, la vie au sein de MycSA m'est plutôt agréable...

Enfin, je remercie particulièrement Thérèse Ouellet pour son accueil si chaleureux pendant ces quelques mois d'expatriation. Grâce à elle, la France ne paraissait pas vraiment loin. Les discussions furent vivifiantes, enrichissantes et passionnantes. Il est certain qu'elles ont contribué à l'écriture de cette thèse en me poussant à envisager les choses sous des angles divers. Je remercie également Thérèse d'avoir accepté de juger mon travail. Ce fut un honneur. J'espère vous revoir très bientôt.

Mes remerciements s'adressent également à Li, Ray, Margareth (le chocolat polonais fut un atout rédactionnel indéniable), Kashia et Sylviane. Grâce à eux, je me suis sentie comme chez moi. J'espère vous revoir très vite. Merci également à Linda Harris et à son équipe pour m'avoir permis de m'initier au monde (merveilleux ?) des biopuces. En particulier, merci beaucoup à Dave Sprott pour tout le travail accompli. Merci également à Anne pour son aide précieuse.

Pour terminer, je rends un hommage tout particulier à mes parents sans qui rien n'aurait été possible. Je n'aurais pu rêver de meilleure éducation que la leur, et je sais que le sacrifice d'eux-mêmes fut grand. Je suis redevable de toutes ces années heureuses pendant lesquelles ils m'ont supportée sans faillir. Je suis honorée de leur offrir cette thèse. Merci à ma fabuleuse Maman et à mon extraordinaire Papa. Soyez sûrs que si un bon génie m'offrait le vœu de choisir mes parents, je ne ferais aucun autre choix que vous.



## *Publications et Communications Scientifiques*

---

### **Publications à comité de lecture**

Ponts, N., L. Pinson-Gadais, F. Richard-Forget. (2003). « H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on Trichothecenes B (DON, ADON) production by *Fusarium graminearum* in liquid culture » Aspects of Applied Biology (68) : 223-228.

Ponts, N., L. Pinson-Gadais, M.N. Verdal-Bonnin, C. Barreau, F. Richard-Forget. (En cours de publication). « Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum* » FEMS Microbiology Letters

Ponts, N., L. Favre, L. Pinson-Gadais, A.L. Boutigny, C. Barreau, F. Richard-Forget. (En cours de publication). « Effect of anti-oxidant phenolic acids on *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol biosynthesis » Journal of Applied Microbiology

### **Participation à des congrès/colloques**

Ponts, N., L. Pinson-Gadais, F. Richard-Forget. « Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de trichothécènes B (DON, ADON) par *Fusarium graminearum* en culture liquide ». Communication orale. Proceedings of « Les Journées Jean Chevaugnon-V<sup>e</sup> rencontres de phytopathologie/mycologie ». Aussois, Savoie, France. 18-22 janvier 2004. pp82

Ponts, N., C. Barreau, L. Harris, T. Ouellet, L. Pinson-Gadais, A. Saparno, F. Richard-Forget. « Production *in vitro* de DON et de 15-ADON par *Fusarium graminearum* : cinétiques d'expression de gènes *Tri* en conditions de stress oxydatif ». Communication orale. « Journées Jean Chevaugnon-VI<sup>e</sup> rencontres de phytopathologie/mycologie ». Aussois, Savoie, France. 15-19 janvier 2006.





## *Abréviations*

---

ADN	Acide desoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADON	Acetyldeoxynivalenol
ACN	Acétonitrile
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
A <sub>w</sub>	Activité thermodynamique de l'eau
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DAD	Diodes Array Detector
DON	Deoxynivalenol
EC	European Commission
ECD	Electron Capture Detector
ESI	Electrospray Ionisation
FB	Fumonisine B
FX	Fusarenone X
GC	Gaz Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPODE	Hydroperoxyde
LOX	Lipoxygénase
MS	Mass Spectrometry
NIV	Nivalenol
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppb	Parties Par Billion
ppm	Parties Par Million
QTL	Quantitative Trait Locus
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Rotation par minute
RT	Reverse Transcription
SPE	Solid Phase Extraction
<i>spp.</i>	species
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCT	Trichothécène
TCTB	Trichothécènes de type B
TI	Trap Ion
YE	yeast extract (extrait de levure)
ZEN	Zearalenone



Ce qui sauve, c'est de faire un pas. Encore un pas.

Antoine de Saint-Exupéry

Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles si je veux connaître les papillons.

Le petit Prince



# Table des Matières

---

<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>33</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>39</b>
<b>I. FUSARIUM : UN REDOUTABLE PHYTOPATHOGENE</b>	<b>41</b>
<b>II. CONNAISSANCES ELEMENTAIRES SUR LES FUSARIOTOXINES</b>	<b>47</b>
<b>III. OBJECTIFS : COMPRENDRE ET LIMITER LE RISQUE MYCOTOXIQUE ; EXEMPLE DES TRICOTHECENES</b>	<b>57</b>
<b>IV. INTERACTIONS PLANTE/PATHOGENE : UN AXE DE RECHERCHE POUR LA PREVENTION DU RISQUE MYCOTOXIQUE</b>	<b>63</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>77</b>
<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUE</b>	<b>79</b>
I.1. SOUCHES FUSARIENNES	79
I.2. POTENTIELS TOXINOGENES <i>IN VITRO</i> DES SOUCHES	79
<b>II. EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES</b>	<b>81</b>
<b>III. CULTURES LIQUIDES</b>	<b>83</b>
III.1. CULTURES STANDARD	83
III.2. MINI-CULTURES	83
<b>IV. ANALYSE DES TCTB</b>	<b>85</b>
IV.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS	85
IV.2. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OU HPLC)	85
<b>V. DOSAGE DU PEROXYDE D'HYDROGENE (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	<b>87</b>
<b>VI. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES CATALASE (CAT) ET SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD) INTRACELLULAIRES</b>	<b>89</b>
VI.1. CARACTERISATION DES SYSTEMES ENZYMATIQUES CATALASE (CAT)	89
VI.2. CARACTERISATION DES SYSTEMES ENZYMATIQUES SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)	93
<b>VII. PROCEDURES PARTICULIERES</b>	<b>95</b>



## *Table des Matières*

---

VII.1. EFFETS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> SUR LA VITESSE DE GERMINATION DES SPORES ET LA BIOSYNTHESE DE DON/ADON PAR <i>F. GRAMINEARUM</i> -----	95
VII.2. SUPPLEMENTATION DES MILIEUX EN COMPOSES PRO- OU ANTI-OXYDANTS -----	95
VII.3. PROCEDURE DE DETERMINATION DES CONCENTRATIONS EN ACIDES PHENOLIQUES (ACIDES <i>P</i> -COUMARIQUE, FERULIQUE, SYRINGIQUE, CAFEIQUE OU <i>P</i> -HYDROXYBENZOÏQUE) INHIBANT 50 % DE LA CROISSANCE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> -----	97
VII.4. SUPPLEMENTATION DES MILIEUX AVEC DES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE-----	97
<b>VIII. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES TCTB PAR <i>F. GRAMINEARUM</i> -----</b>	<b>101</b>
VIII.1. EXTRACTION DES ARN TOTAUX -----	103
VIII.2. ANALYSES PAR RT-PCR AVEC DETECTION DE FLUORESCENCE EN TEMPS REEL (REAL-TIME RT-PCR) -----	109
VIII.3. ANALYSES PAR BIOPUCES -----	113
<b><u>CHAPITRE 1 : MISE EN PLACE DE METHODES ET PROCEDURES EXPERIMENTALES</u>-----</b>	<b>123</b>
<b>I. ANALYSE DES TRICHOTHECENES DE TYPE B -----</b>	<b>125</b>
I.1. METHODE ALTERNATIVE : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLEE A UN DETECTEUR A BARRETTE DE DIODES (HPLC-DAD)-----	127
I.2. DE L'EXTRACTION/PURIFICATION DES TCTB SUR MATRICE LIQUIDE GYEP -----	131
<b>II. VARIABILITE DES NIVEAUX DE PRODUCTION DE TCTB PAR <i>FUSARIUM</i> EN CULTURES LIQUIDES -----</b>	<b>135</b>
II.1. EXPRESSION VARIABLE DU POTENTIEL TOXINOGENE SELON LE MODE DE CULTURE (MILIEU ET PROCEDURE) -----	135
II.2. VARIABILITE ENTRE LOTS DE CULTURE -----	137
II.3. VARIABILITE INTRA LOTS DE CULTURE -----	139
<b>III. PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES ET EXPRESSION VARIABLE DU POTENTIEL TOXINOGENE-----</b>	<b>141</b>
III.1. PROFILS OBTENUS PAR HPLC-UV <sub>230</sub> -----	143
III.2. ANALYSE PAR HPLC-ESI-TI-MS-----	145





## Table des Matières

---

III.3. SYNTHÈSE ----- 155

IV. METHODES & PROCEDURES EXPERIMENTALES : CONCLUSION----- 157

**CHAPITRE 2 : EFFETS DU PEROXYDE D'HYDROGENE (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ET DE COMPOSES ASSOCIES SUR LA BIOSYNTHESE DE TRICHOTHECENES DE TYPE B PAR FUSARIUM ----- 161**

**I. EFFETS DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SUR LA BIOSYNTHESE DE TRICHOTHECENES DE TYPE B ----- 163**

I.1. EFFETS DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ET AUTRES COMPOSES OXYDANTS SUR LA BIOSYNTHESE DE TCT DE TYPE B ----- 165

I.2. PROPRIETES ANTI-OXYDANTES DE L'ACIDE *P*-COUMARIQUE ET AUTRES ACIDES PHENOLIQUES ET BIOSYNTHESE DE TCT DE TYPE B PAR *F. GRAMINARUM*----- 195

**II. EFFETS DE PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE SUR LA BIOSYNTHESE DE TRICHOTHECENES DE TYPE B PAR *F. GRAMINEARUM*----- 227**

II.1. FONGITOXICITE(S) DE L'ETHANOL OU DE L'HEXANE 0,65 % ET DES HYDROPEROXYDES ET AUTRES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE PAR DES LIPOXYGENASES DE SPECIFICITE POSITIONNELLE 13 OU 9 ----- 233

II.2. MODULATION(S) DE LA PRODUCTION DE TCTB PAR L'AJOUT D'ETHANOL OU D'HEXANE 0,65 % ET D'HYDROPEROXYDES ET AUTRES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE ----- 235

**III. EFFETS DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ET AUTRES COMPOSES PRO/ANTI OXYDANTS : CONCLUSION -- 239**

**CHAPITRE 3 : METABOLISME OXYDATIF FONGIQUE ET BIOSYNTHESE DE TCTB ----- 247**

**I. ACCUMULATION DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> FONGIQUE EXTRACELLULAIRE ET PRODUCTION DE TRICHOTHECENES DE TYPE B PAR *F. CULMORUM* ET *GRAMINEARUM* ----- 249**

I.1. ETUDE DE L'EXISTENCE D'UN LIEN STATISTIQUE ENTRE ACCUMULATION DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> FONGIQUE EXTRACELLULAIRE ET PRODUCTION DE TOXINES ----- 251

I.2. FORCE DU LIEN STATISTIQUE----- 253

I.3. SYNTHÈSE ----- 261



# Table des Matières

---

<b>II. ACTIVITES ENZYMATIQUES (CATALASE ET SUPEROXYDE DISMUTASE) ET BIOSYNTHESE DE TRICHOTHECENES DE TYPE B</b> -----	<b>263</b>
II.1. CINETIQUES ENZYMATIQUES CAT ET SOD -----	263
II.2. MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENTES ISOFORMES DE CAT CHEZ <i>F. GRAMINEARUM</i> ET <i>F. CULMORUM</i> -----	265
II.3. SYNTHÈSE-----	269
<b>III. IMPORTANCE DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> FONGIQUE EXTRACELLULAIRE POUR LA BIOSYNTHESE DE DON/ADON PAR <i>F. GRAMINEARUM</i></b> -----	<b>273</b>
<b>IV. METABOLISME OXYDATIF FONGIQUE ET BIOSYNTHESE DE TCTB : DISCUSSION</b>	<b>277</b>
<b><u>CHAPITRE 4 : VARIATIONS DU PROFIL DU TRANSCRIPTOME DE <i>F. GRAMINEARUM</i> DE CHEMOTYPE DON/15ADON EN CONDITIONS DE STRESS OXYDATIF</u></b> -----	<b><u>283</u></b>
<b>I. APPROCHE LOCALE : RT-PCR EN TEMPS REEL</b> -----	<b>287</b>
I.1. GENE CONSTITUTIF ET REFERENCE INTERNE DANS LE CADRE DE STRESS OXYDATIFS : LE GENE <i>B-TUB</i> CODANT LA B-TUBULINE -----	289
I.2. CINÉTIQUE D'EXPRESSION DES GENES <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri6</i> , <i>Tri10</i> , <i>Tri12</i> ET <i>Tri101</i> AU COURS DE LA BIOSYNTHESE DE DON ET DE 15ADON PAR <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32 EN CULTURES STANDARD -----	293
I.3. MODULATION DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES GENES <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri6</i> , <i>Tri10</i> , <i>Tri12</i> ET <i>Tri101</i> EN CONDITIONS DE STRESS OXYDATIFS -----	299
I.4. COMMENTAIRES ET RECOMMANDATIONS METHODOLOGIQUES -----	303
<b>II. APPROCHE GLOBALE : MICROARRAYS (BIOPUCES)</b> -----	<b>305</b>
II.1. LES ETAPES -----	307
II.2. LES DIFFICULTES -----	309
II.3. SYNTHÈSE-----	313
<b>III. TRANSCRIPTOME DE <i>F. GRAMINEARUM</i> : CONCLUSION</b> -----	<b>315</b>
<b><u>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u></b> -----	<b><u>319</u></b>
<b>I. METHODES ET PROCEDURES EXPERIMENTALES : PROGRES ET PERSPECTIVES</b> ----	<b>321</b>



## *Table des Matières*

---

<b>II. STRESS OXYDATIFS ET PRODUCTION DE TRICHOTHECENES DE TYPE B</b> -----	<b>329</b>
<b>III. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE ET STRESS OXYDATIF</b> -----	<b>341</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b> -----	<b><u>349</u></b>
<b><u>ANNEXES</u></b> -----	<b><u>390</u></b>



## Table des Illustrations

### FIGURES

FIGURE 1 : EXEMPLES DE BLE (A) ET DE MAÏS (B) FUSARIES.-----	34
FIGURE 2 CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> , <i>CULMORUM</i> , <i>VERTICILLIOIDES</i> ET <i>PROLIFERATUM</i> . -----	44
FIGURE 3 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA ZEARALENONE.-----	48
FIGURE 4 : STRUCTURE CHIMIQUE DES FUMONISINES B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> ET B <sub>3</sub> .-----	48
FIGURE 5 : STRUCTURE CHIMIQUE DE 5 TRICHOHECENES DE TYPE B-----	50
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL INDUITE PAR LES TCTB DANS LES CELLULES DE MAMMIFERES. (D'APRES ROCHA <i>ET AL.</i> , 2005)-----	52
FIGURE 7 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE DES ISOPRENOÏDES CONDUISANT A LA BIOSYNTHESE DE FARNESYL PYROPHOSPHATE (FPP).-----	60
FIGURE 8 : VOIE METABOLIQUE SIMPLIFIEE CONDUISANT AUX BIOSYNTHESES DES TCTA ET TCTB (D'APRES TAG <i>ET AL.</i> , 2001). -----	60
FIGURE 9 : STRUCTURE DES REGIONS GENOMIQUES CONTENANT LES GENES <i>TRI</i> CONNUS. -----	60
FIGURE 10 : MODELE D'INTERACTION ENTRE L'HOTE, LE PATHOGENE ET LEUR ENVIRONNEMENT COMMUN. -----	62
FIGURE 11 : EVENEMENTS CELLULAIRES INTERVENANT DANS LA MISE EN PLACE DE LA REPONSE HYPERSENSIBLE CHEZ LA PLANTE (D'APRES MEHDY <i>ET AL.</i> , 1994, MITTLER & LAM 1996).-----	68
FIGURE 12 : GRADIENT ACETONITRILE/EAU UTILISE POUR L'ANALYSE DES TCTB. -----	84
FIGURE 13 : PROGRAMME D'AMPLIFICATION. -----	110
FIGURE 14 : PRODUCTIONS EN TCTB PAR 12 SOUCHES DE <i>FUSARIUM SPP. GRAMINEARUM</i> ET <i>CULMORUM</i> EN MINI-CULTURES GYEP DE 10 JOURS.-----	134
FIGURE 15 : PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES DES EXTRAITS A ET B ISSUS DE CULTURES GYEP AGEES DE 21 JOURS DE <i>F. GRAMINEARUM</i> PRODUCTEUR DE 15ADON. -----	142
FIGURE 16 : SCHEMA DE FRAGMENTATION DU DON M/Z 296 EN MODE D'IONISATION NEGATIF. -----	148
FIGURE 17 : SCHEMA DE FRAGMENTATION DU 15ADON M/Z 338 EN MODE D'IONISATION NEGATIF. -----	148
FIGURE 18 : SPECTRE DE X1A M/Z 250 EN MODE D'IONISATION NEGATIF. -----	150
FIGURE 19 : INTERPRETATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES TRICHOHECENES. -----	152
FIGURE 20 : SCHEMA DE FRAGMENTATION DE X <sub>1</sub> B M/Z 268 EN MODE D'IONISATION NEGATIF. -----	154
FIGURE 21 : HYPOTHESE DE FRAGMENTATION SIMPLE DU TRICHODERMOL ET DE L'ISOTRICHOTRIOL. ----	156
FIGURE 22 : PROPOSITION D'UN MODELE RESUMANT LES INTERACTIONS PLANTE- <i>FUSARIUM</i> LORS DE LA MISE EN PLACE DE LA REPONSE HYPERSENSIBLE -----	162
FIGURE 23 : PRODUCTION DE NIV/FX PAR <i>F. CULMORUM</i> EN MILIEU GYEP SUPPLEMENTE OU NON PAR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5 mM A DIFFERENTS TEMPS DE CULTURE.-----	168
FIGURE 24 : LA BRANCHE ALLENE OXYDE SYNTHASE DE LA VOIE DES OXYLIPINES.-----	226
FIGURE 25 : ACCUMULATION DE BIOMASSE FONGIQUE APRES 7 JOURS EN MINI-CULTURES GYEP EN PRESENCE OU ABSENCE D'ETHANOL OU D'HEXANE. -----	232





## Table des Illustrations

---

FIGURE 26 : ACCUMULATION DE BIOMASSE FONGIQUE APRES 7 JOURS EN MINI-CULTURES GYEP EN PRESENCE OU ABSENCE DE DIVERS PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE. -----	234
FIGURE 27 : ACCUMULATION DE DON ET 15ADON APRES 7 JOURS EN MINI-CULTURES GYEP EN PRESENCE OU ABSENCE D'ETHANOL OU D'HEXANE. -----	234
FIGURE 28 : ACCUMULATION DE DON ET 15ADON APRES 7 JOURS EN MINI-CULTURES GYEP EN PRESENCE OU ABSENCE DE DIVERS PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE. -----	236
FIGURE 29 : CINETIQUE DE PRODUCTION DE DON/15ADON ET DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EXTRACELLULAIRE PAR <i>F. GRAMINEARUM</i> EN CULTURES STANDARD GYEP. -----	248
FIGURE 30 : DIFFERENCES DES CINETIQUES DE PRODUCTION EN TCTB ET EN H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EN FONCTION DES SOUCHES CONSIDEREES. -----	252
FIGURE 31 : PROFILS DE PRODUCTION DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> POUR 6 SOUCHES <i>F. CULMORUM</i> DE CHEMOTYPE DON. --	254
FIGURE 32 : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ACCUMULE DANS LES MILIEUX DE CULTURE GYEP AU COURS DE LA PRODUCTION DE NIV ET DE FX PAR <i>F. CULMORUM</i> INRA 337 EN CULTURES GYEP SUPPLEMENTEES OU NON PAR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EXOGENE. -----	258
FIGURE 33 : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> FONGIQUE EST-IL NEGATIVEMENT LIE A L'ACCUMULATION DE TOXINES? -----	260
FIGURE 34 : ACTIVITES ENZYMATIQUES CAT ET SOD EXTRAITES DES MYCELIUMS DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32 AU COURS DE LA CINETIQUE DE PRODUCTION DE DON ET DE 15ADON. -----	264
FIGURE 35 : ISOELECTROFOCALISATION SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DES ISOFORMES DE CAT CONTENUES DANS DES EXTRAITS BRUTS DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32 DE CHEMOTYPE DON. 266	
FIGURE 36 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PROFILS ISOELECTROPHORETIQUES DES EXTRAITS BRUTS DE <i>F. GRAMINEARUM</i> ET <i>CULMORUM</i> DE CHEMOTYPES DON OU NIV. -----	268
FIGURE 37 : CINETIQUES D'ACCUMULATION DE DON/15ADON ET RENDEMENTS EN H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> OBTENUS POUR LA SOUCHE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32 EN CULTURES STANDARD GYEP. -----	272
FIGURE 38 : RENDEMENTS EN DON/ADON ET EN H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> APRES 5 ET 15 JOURS DE CULTURE EN MILIEUX SUPPLEMENTES AVEC DE LA CATALASE EXOGENE. -----	274
FIGURE 39 : EXPRESSION DU GENE <i>B-TUB</i> CODANT LA B-TUBULINE AU COURS DES 5 PREMIERS JOURS DE CROISSANCE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32. -----	288
FIGURE 40 : EFFET DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5 mM SUR LA CINETIQUE D'EXPRESSION DU GENE <i>B-TUB</i> CODANT LA B-TUBULINE AU COURS DES 5 PREMIERS JOURS DE CROISSANCE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32. ---	290
FIGURE 41 : EFFET DE CATALASE SUR LA CINETIQUE D'EXPRESSION DU GENE <i>B-TUB</i> CODANT LA B-TUBULINE AU COURS DES 5 PREMIERS JOURS DE CROISSANCE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32. ---	292
FIGURE 42 : EXPRESSION DES GENES <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri6</i> , <i>Tri10</i> ET <i>Tri12</i> APPARTENANT AU CLUSTER <i>Tri</i> AU COURS DES 5 PREMIERS JOURS DE CROISSANCE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32. -----	294
FIGURE 43 : EXPRESSION DU GENE <i>Tri101</i> N'APPARTENANT PAS AU CLUSTER <i>Tri</i> AU COURS DES 5 PREMIERS JOURS DE CROISSANCE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32. -----	296
FIGURE 44 : MODULATION DES EXPRESSIONS DES GENES <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri6</i> , <i>Tri10</i> , <i>Tri12</i> ET <i>Tri101</i> AU COURS DES 5 PREMIERS JOURS DE CROISSANCE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32 EN PRESENCE DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5 mM. -----	298



## Table des Illustrations

---

FIGURE 45 : MODULATION DES EXPRESSIONS DES GENES <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri10</i> , <i>Tri12</i> ET <i>Tri101</i> APRES 3 JOURS DE CROISSANCE DE <i>F. GRAMINEARUM</i> CBS185.32 EN PRESENCE DE CATALASE. -----	300
FIGURE 46 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE SIMPLIFIEE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS IMPLIQUES DANS LES REGULATIONS DES GENES <i>Tri</i> .-----	342
FIGURE 47 : INTERACTIONS PLANTE- <i>FUSARIUM</i> LORS DE LA MISE EN PLACE DE LA REPONSE HYPERSENSIBLE. -----	344

## ENCADRES

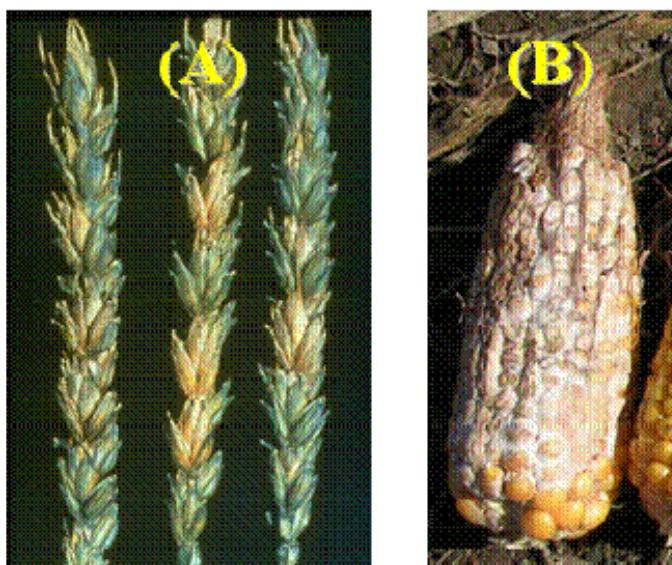
ENCADRE 1 : IMPORTANCE ECONOMIQUE DU MAÏS ( <i>ZEAMAYS</i> ). -----	40
ENCADRE 2 : CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DE <i>FUSARIUM SPP. GRAMINEARUM</i> , <i>CULMORUM</i> , <i>VERTICILLIOIDES</i> ET <i>PROLIFERATUM</i> .-----	44

## TABLEAUX

TABLEAU 1 : LIMITES MAXIMALES DE CONTAMINATION DES DENREES CEREALIERES PAR LE DON ET L'ENSEMBLE (FB1+FB2). (REGLEMENT (CE) N°856/2005 DU 6 JUIN 2005 APPLICABLE A PARTIR DU 1 <sup>ER</sup> JUILLET 2006).-----	54
TABLEAU 2 : FONCTIONS DES GENES <i>Tri</i> IDENTIFIES.-----	62
TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES SOUCHES FUSARIENNES UTILISEES.-----	80
TABLEAU 4 : SOLUTIONS ASSOCIEES A LA METHODE D'EXTRACTION D'ARNs TOTAUX SUR COUSSIN DE CESIUM. -----	104
TABLEAU 5 : COMPOSITION DU TAMPON DE CHARGE A ARN.-----	106
TABLEAU 6 : SOLUTIONS UTILISEES DANS LA PROCEDURE DE REALISATION DES BIOPUCES.-----	112
TABLEAU 7 : TEMPS DE RETENTION ET VALEURS DE REFERENCE DE LA METHODE D'ANALYSE DES TCTB PAR HPLC-UV. -----	128
TABLEAU 8 : COEFFICIENTS DE RECUPERATION (EN POURCENTAGES) DES TCTB EN FONCTION DE LA METHODE PREPARATIVE ET DE LA TOXINE CONSIDEREES. -----	128
TABLEAU 9 : INTENSITES DES REPONSES A $\lambda = 230$ NM-----	142
TABLEAU 10 : LISTE DES DIFFERENTS IONS OBTENUS POUR LE DON ET LE 3ADON EN MODE D'IONISATION POSITIF. -----	144
TABLEAU 11 : LISTE DES FRAGMENTS OBTENUS POUR LE DON ET LE 15ADON EN MODE D'IONISATION NEGATIF.-----	146
TABLEAU 12 : LISTE DES FRAGMENTS OBTENUS POUR LE COMPOSE X1A EN MODE D'IONISATION NEGATIF. -----	150
TABLEAU 13 : LISTE DES FRAGMENTS OBTENUS POUR LE COMPOSE X1B EN MODE D'IONISATION NEGATIF. -----	154
TABLEAU 14 : EFFETS DIFFERENTS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> SUR LA PRODUCTION DE TCTB PAR <i>FUSARIUM</i> EN FONCTION DE L'ESPECE ET/OU DU CHEMOTYPE CONSIDERE. -----	168



# ***Avant-Propos***



**Figure 1 : Exemples de blé (A) et de maïs (B) fusariés.**

Sources :

(A) [www.inra.fr/Internet/Produits/HYP3/images/6032312.jpg](http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYP3/images/6032312.jpg)

(B) A. Saparno, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa (ON) CANADA (communication personnelle)

## *Avant-Propos*

---

**F***usarium* est un champignon filamenteux phytopathogène qui se développe au champ sur de nombreuses plantes et notamment sur les céréales et le maïs. Le terme « fusariose » désigne un ensemble de symptômes de maladie visibles par observation directe sur la plante hôte : fonte des semis, nécrose des tissus végétaux et nécrose des épis (Figure 1). En cas d'épidémie<sup>1</sup> de fusariose, les pertes économiques liées à la diminution des rendements à la récolte peuvent se révéler dramatiques. De façon plus précise, la fusariose des épis de blé et celle des épis de maïs sont respectivement désignées par les expressions « *Fusarium* Head Blight » (FHB) et « *Gibberella* ou *Fusarium* Ear Rot » (GER ou FER).

*Fusarium* est également associé à la production de mycotoxines (métabolites secondaires), encore appelées fusariotoxines. En particulier, l'espèce *graminearum* du genre *Fusarium*, pathogène majoritairement présent sur le maïs en Europe, est décrite comme productrice des toxines de la famille des trichothécènes de type B. Les toxicités aiguës des fusariotoxines sont largement démontrées pour l'Homme et les animaux, et de nombreux indices laissent supposer l'existence de toxicités chroniques associées à ces molécules. En conséquence, en sus des considérations économiques liées à la santé des animaux d'élevage, les mycotoxines de *Fusarium* représentent un problème latent en santé publique du fait de leur introduction dans les chaînes agroalimentaires et alimentaires (Miller, 1995, D'Mello, *et al.*, 1999).

L'apparition/intensité des symptômes de fusariose et les niveaux de contamination en toxines ne sont pas strictement corrélés : constater l'absence de symptômes de fusariose ne permet pas d'écarter le risque mycotoxique. Ainsi, la présence de *Fusarium* sur les céréales et le maïs représente un problème double impliquant des stratégies de lutte à deux volets. Le premier aspect est la lutte contre la fusariose, c'est-à-dire contre l'apparition de la maladie. Ensuite, comme nous l'avons évoqué plus haut, l'absence de symptômes de fusariose n'implique pas l'absence des fusariotoxines. Limiter l'occurrence des fusariotoxines représente donc un enjeu à part entière où il faut considérer les caractéristiques du pathosystème dans son ensemble.

---

<sup>1</sup> Progression de la maladie dans l'espace et le temps.





## *Avant-Propos*

---

Notre travail s'inscrit dans la lutte contre la contamination de la plante hôte par les toxines de *Fusarium*. Limiter les contaminations par les fusariotoxines implique la prise en compte de nombreux paramètres, dont les conditions de biosynthèse de ces métabolites par le champignon dans son environnement, au champ. Le grain représente une des composantes de l'environnement de *Fusarium* au cours des processus d'infection de la plante et de production de ses toxines. Identifier des composés de l'épi susceptibles de limiter la biosynthèse des mycotoxines de *Fusarium* est l'axe de recherche que nous avons choisi afin de limiter la contamination du maïs par les fusariotoxines.

De façon plus précise, nous nous sommes intéressés aux composés oxydants qui déclenchent la réponse hypersensible de défense de la plante en réponse aux attaques de pathogènes virulents. Notre approche s'est focalisée sur le pathosystème *F. graminearum*/maïs (avec quelques élargissements à *Fusarium culmorum* qui est également une espèce virulente sur maïs) : les effets particuliers de composés oxydants tels le peroxyde d'hydrogène sur la production des toxines de *F. graminearum* ont été particulièrement étudiés.

Nos résultats ont tout d'abord contribué à l'amélioration des procédures expérimentales utilisées. Cette étape a ensuite été suivie par une phase d'exploration des modulations de la voie de biosynthèse des toxines de *F. graminearum* de la famille des trichothécènes de type B en conditions de stress oxydatifs induits en particulier par le peroxyde d'hydrogène.

Avant de rentrer « dans le vif du sujet » nous débuterons avec un état des lieux des connaissances générales liées à *Fusarium* et à ses mycotoxines ; nous nous intéresserons également aux composés de la plante particulièrement induits lors d'attaques pathogènes et qui ont un rôle dans l'activation des mécanismes de défense.



# *Introduction*

### **Encadré 1 : Importance Economique du maïs (*Zea mays*).**

(Source : [www.agpm.com](http://www.agpm.com))

Le maïs à lui seul représente 41 % de la production céréalière mondiale, au même niveau que le blé (40 %) et loin devant les autres céréales (l'orge est en troisième position avec 9 % de la production totale).

Sa culture est ancienne – les plus anciennes traces remontent à 5000 ans av. J.C., au Mexique – et le maïs ne semble être que le résultat de l'amélioration végétale par croisements opérée par l'homme (aucune variété sauvage connue n'a perduré jusqu'à nos jours). La conséquence de ces améliorations au fil des siècles est l'existence à l'heure actuelle de centaines de types de maïs aux cycles végétatifs divers adaptés à de nombreuses conditions climatiques et agronomiques. De ce fait, la zone de culture du maïs est vaste : du continent américain à l'Asie en passant par l'Europe et l'Afrique. Les USA à eux seuls assurent 40 % de la production mondiale et la France se situe au 3<sup>e</sup> rang mondial des pays producteurs – elle se situe au 1<sup>er</sup> rang européen – avec une production en particulier localisée dans les régions Aquitaine, Bretagne et Pays de Loire.

En Europe, le maïs est essentiellement utilisé en alimentation animale (grains ou fourrage). En alimentation humaine, le maïs doux est particulièrement consommé au Mexique et en Afrique Centrale (base de l'alimentation locale) ainsi qu'en Amérique du nord (USA et Canada) où les épis de maïs sucré sont très prisés. Le maïs entre également dans la composition de nombreux produits alimentaires transformés (céréales pour petit déjeuner, salades composées etc.). En industrie chimique, l'amidon de maïs et ses dérivés sont utilisés en papeterie, conception de plastiques biodégradables, industrie pharmaceutique etc. (chimie verte). Le maïs est également utilisé dans le domaine des biocarburants d'importance économique croissante.

### **I. Fusarium : un redoutable phytopathogène**

Les infections par *Fusarium* peuvent être dévastatrices sur de nombreuses plantes d'intérêt économique élevé, entraînant de lourdes conséquences financières. De 1998 à 2000, aux USA, les pertes liées à *Fusarium spp.* ont été estimées à 2,7 milliards de dollars américains pour les seuls états du nord et les grandes plaines (Wood, 2002). Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne le maïs (*Zea mays*) qui est la plante la plus cultivée au monde et la première céréale produite devant le blé et l'orge<sup>2</sup>. *F. graminearum* est l'espèce fusarienne sur maïs dont la zone de présence géographique est la plus vaste (Cromey, *et al.*, 2001). L'importance du maïs en Bretagne, Pays de Loire et Aquitaine (France) rend les économies régionales très sensibles à l'occurrence de *Fusarium* (Encadré 1). Malheureusement, il n'existe à ce jour aucun type de maïs résistant aux infections par *Fusarium spp.*

Une conséquence immédiate de l'infection par *Fusarium* est la perte de rendement causée par la nécrose des tissus végétaux (Yates, *et al.*, 2005). La présence du champignon peut également altérer la composition des grains ce qui entraîne par la suite des diminutions des niveaux de qualité et d'efficacité de leurs transformations industrielles. Par exemple, il a été mis en évidence que l'invasion du grain de blé par *Fusarium spp.* peut entraîner des dégradations de la paroi cellulaire et des protéines, ce qui a pour conséquence directe l'altération de la qualité du processus de panification en boulangerie. En industrie de la fabrication de la bière, utiliser des grains d'orge infectés par *Fusarium* affecte les rendements et la qualité du maltage. Enfin, d'une façon plus directe, semer des graines de céréales infectées par *Fusarium spp.* induit des symptômes de fusariose visibles chez les plantules (fonte des semis) avec par la suite réduction du nombre d'épi et du rendement en grains par épi (pour revue Pirgozliev, *et al.*, 2003). Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne *F. verticillioides* décrit comme un endophyte facultatif du maïs, ce qui le rend relativement insensible aux traitements fongicides (Miller, 1991, Bacon, *et al.*, 2001).

---

<sup>2</sup> Source : [www.agpm.com](http://www.agpm.com)



## *Introduction*

---

Toutes les espèces de *Fusarium* ne sont pas des endophytes et le semis de graines contaminées n'est pas la seule source d'inoculum. En effet, *Fusarium spp.* se comportent en saprophytes lorsque les conditions environnementales l'exigent, pendant les mois d'hivers par exemple. *Fusarium spp.* sont capables de survivre dans le sol et les résidus de culture sans que leur virulence<sup>3</sup> en soit affectée. Au champ, ceci constitue une source d'inoculum non négligeable (Cotten & Munkvold, 1998, Schaafsma, *et al.*, 2001). La dissémination des spores par le vent ou les insectes est également source de contamination (Sutton 1982).

Une fois que les spores sont présentes sur la plante, il existe différentes voies de pénétration des *Fusarium spp.* On peut citer l'infection via des blessures infligées par des ravageurs et/ou en empruntant le canal des soies chez le maïs et les anthères chez le blé (Sutton 1982, Miller, *et al.*, 2004, Schmale, *et al.*, 2005, Schmale, *et al.*, 2005). Il semble que les soies représentent le chemin le plus efficacement emprunté par *F. graminearum* pour contaminer les grains de maïs (Munkvold, *et al.*, 1997).

Il est possible de distinguer deux types de spores de *Fusarium* qui tous deux conduisent à la contamination des grains de céréales (Sutton 1982). En effet, *Fusarium spp.* peuvent posséder deux modes de reproduction : un mode asexué (anamorphe), avec production de conidies et/ou de chlamydospores, et un mode sexué (téléomorphe) avec production d'ascospores. Il est établi que les ascospores comme les conidies sont infectieuses mais la contribution relative de chacun des deux types dans l'établissement de la fusariose est toujours non élucidée. Il semble que le développement des périthèces<sup>4</sup> soit associé à l'agressivité de *F. graminearum* (Desjardins, *et al.*, 2001, Urban, *et al.*, 2003). En revanche, la virulence du pathogène ne semble pas liée à son mode de reproduction sexué. En effet, il a récemment été mis en évidence que la capacité des conidies de *F. graminearum* à provoquer la fusariose du blé n'est pas affectée lorsque le développement d'ascospores est bloqué (Desjardins, *et al.*, 2004). Ces données sont en accord avec le cycle de vie de *F. graminearum* dans la représentation proposée par Bily, (2003). A la fin du printemps, les conidies dispersées

---

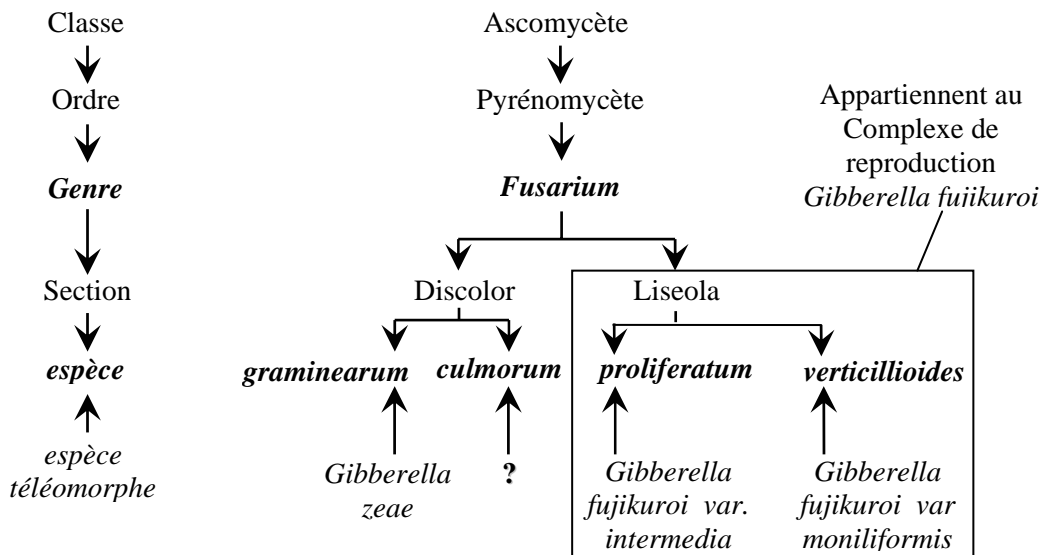
<sup>3</sup> La virulence est la capacité d'un pathogène à infecter un hôte donné sans prendre en compte le degré de gravité de l'infection.

<sup>4</sup> Organe reproducteur des champignons pyrénomycètes, en forme de bouteille microscopique, s'ouvrant par un orifice étroit, et dans lequel se développent les asques.

**Encadré 2 : Classification simplifiée de *Fusarium spp. graminearum, culmorum, verticillioides* et *proliferatum*.**

Si tous s'accordent à classer le genre *Fusarium* parmi les ascomycètes, la classification des espèces constituant le genre est très discutée. Il y a plusieurs façons de considérer la classification de *Fusarium spp.* et les outils d'identification sont multiples. L'identification peut être faite sur la base d'observations morphologiques – l'identification nécessite alors un excellent niveau d'expertise – et/ou en utilisant des outils moléculaires de plus en plus nombreux basés sur le polymorphisme de diverses séquences codantes ou non codantes, et enfin en se basant sur les profils métaboliques dont les mycotoxines. Une conséquence de l'existence possible de deux formes d'aspects différents rajoute une nuance à l'identification sur bases morphologiques puisque qu'il est possible d'observer les individus sous leur apparence anamorphe (observation des conidies) ou celle téléomorphe (ascospores et périthèces), même si la première est largement répandue puisqu'elle est plus simple à observer dans des conditions artificielles de laboratoire.

La figure 2 propose une classification des espèces *graminearum*, *verticillioides* et *proliferatum*, qui sont les espèces majoritairement contaminantes du maïs, ainsi que la place de *F. culmorum*, une espèce pathogène du maïs en Europe seulement, dans cette classification. Tout comme *F. graminearum*, *F. culmorum* appartient à la section Discolor et peut produire des mycotoxines, mais aucune forme sexuée n'a été identifiée à ce jour. (Samuels, *et al.*, 2001, Seifert, 2001, Selosse & Durrieu, 2004, Kristensen, *et al.*, 2005).



**Figure 2 Classification simplifiée de *F. graminearum, culmorum, verticillioides* et *proliferatum*.**

Les systèmes de compatibilité indiqués (*Gibberella zeae* et *Gibberella fujifuroi* var. *intermedia* ou *moniliformis*) sont uniques pour chaque espèce : il n'a pas été mis en évidence deux systèmes de compatibilité différents au sein d'une même espèce et un système de compatibilité donné est unique et propre à chaque espèce. La reproduction sexuée n'a lieu qu'entre espèces compatibles appartenant à un même complexe de reproduction.



## Introduction

---

par voie aérienne (vent, pluie et/ou insectes) ou présentes dans les résidus de culture se déposent sur les plantules et sont responsables de l'infection primaire. Les ascospores participeraient surtout aux infections secondaires (Markell & Francl, 2003).

Il existe quelques espèces de *Fusarium* pour lesquelles une forme sexuée n'a pas (pas encore ?) été mise en évidence. C'est le cas par exemple de *F. culmorum* appartenant à la section taxonomique *Discolor*, section à laquelle appartient également *F. graminearum* dont le téléomorphe bien identifié est *Gibberella zea* (Encadré 2).

Presque toutes les espèces fusariennes qui possèdent une forme sexuée identifiée sont hétérothalliques, c'est-à-dire qu'il est nécessaire que deux partenaires de types sexuels différents soient croisés pour qu'il y ait reproduction sexuée. Les types sexuels des espèces fusariennes du complexe de reproduction *Gibberella fujikuroi*, en particulier *Fusarium proliferatum* et *Fusarium verticillioides*, sont particulièrement bien décrits (Wineland, 1924, Kuhlman, 1982, Leslie, 1991, Leslie, 1995, O'Donnell, *et al.*, 1998). Les formes sexuées de *Fusarium spp. verticillioides* et *proliferatum* sont respectivement *Gibberella fujikuroi* var. *moniliformis* et *G. fujikuroi* var. *intermedia*.

*Gibberella zea*, le téléomorphe de *F. graminearum*, est le seul cas d'homothallisme du genre connu à ce jour. La signification biologique de cet homothallisme est encore inconnue.

Un autre aspect de la biologie de *Fusarium* qui nous intéresse particulièrement, nous l'avons évoqué en avant-propos, est l'aptitude qu'ont certaines espèces fusariennes à produire un ou plusieurs types de mycotoxines (ou fusariotoxines).

Le rôle écologique des fusariotoxines n'est pas clairement démontré mais plusieurs études ont émis l'hypothèse d'un rôle éventuel dans l'agressivité<sup>5</sup> de *Fusarium in planta*. Les propriétés phytotoxiques de certaines toxines sont parfois évoquées. Des effets biocides dirigés contre d'éventuels compétiteurs sur la plante hôte peuvent également participer à l'efficacité de l'invasion par *Fusarium*. Ces hypothèses pourraient impliquer un rôle dans l'épidémie de la fusariose, mais ce n'est pas la seule conséquence de la présence de fusariotoxines sur les céréales et le maïs. En effet, ces

---

<sup>5</sup> L'agressivité d'un pathogène détermine la gravité de l'infection causée sur son hôte : dans le cas de *Fusarium*, plus la souche pathogène est agressive, plus les symptômes de fusariose seront importants. L'agressivité, par définition, concerne donc uniquement une souche virulente.



## *Introduction*

---

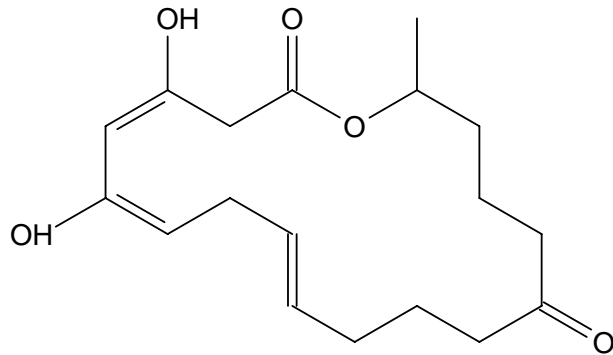
métabolites secondaires sont toxiques pour les animaux et les Hommes (Steyn, 1995, Butkeraitis, *et al.*, 2004, Munaut & Van Hove, 2004, Ogido, *et al.*, 2004, Cetin & Bullerman, 2005, Cetin & Bullerman, 2005, Goyarts, *et al.*, 2005, Tran, *et al.*, 2005).

## **II. Connaissances élémentaires sur les fusariotoxines**

Les différentes espèces du genre *Fusarium* peuvent produire trois grandes familles de mycotoxines : les trichothécènes (TCT), la zéaralénone et ses dérivés (ZEN) et les fumonisines de type B (FB). Sur *Zea mays*, les espèces fusariennes largement prévalentes sont *graminearum*, *verticillioides* et *proliferatum*. Les *Fusarium spp. graminearum* peuvent produire des TCT de type B (TCTB) et/ou de la ZEN tandis que les *Fusarium spp. verticillioides* et *proliferatum* peuvent produire des FB. Ces différentes espèces fusariennes peuvent être des co-contaminants du maïs avec pour conséquence majeure la possibilité de co-occurrence des différentes familles de toxines citées (Gonzalez, *et al.*, 1999).

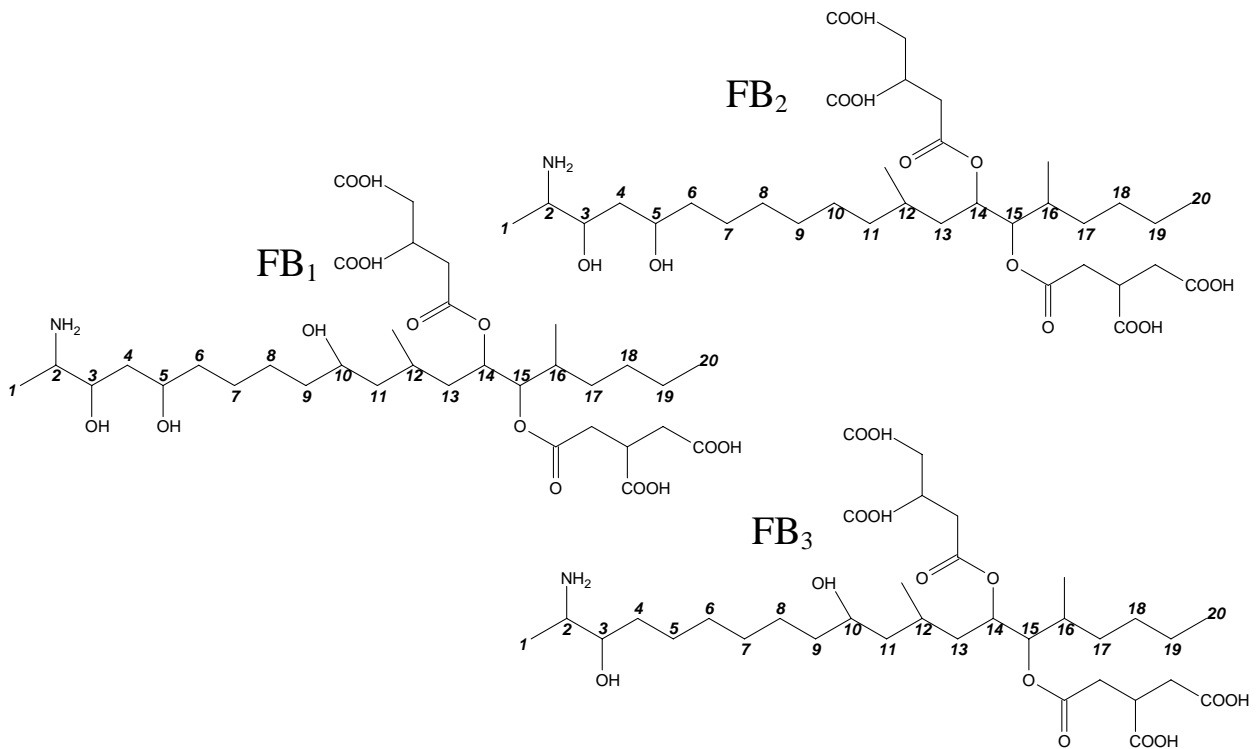
A l'inverse des biosynthèses des aflatoxines et de l'ochratoxine A produites par *Aspergillus spp.* et *Penicillium spp.* qui ont lieu après la récolte – on parle alors de mycotoxines de stockage – la biosynthèse de fusariotoxines se produit majoritairement au champ. Une fois ces toxines synthétisées, leur présence va perdurer tout au long de la chaîne de transformation des denrées céréalières jusqu'au produit fini. En effet, les fusariotoxines sont très stables et leur présence sur les grains et produits céréaliers n'est pas totalement éliminée par les étapes de nettoyage des grains et par leurs transformations industrielles (fermentations, cuissons...) (Bennet & Richard, 1996, Lauren & Smith, 2001, Bullerman, *et al.*, 2002, Ryu, *et al.*, 2002, Hazel & Patel, 2004).

Historiquement, des espèces du genre *Fusarium* ont été mises en cause lors d'évènements d'aleucie toxique alimentaire (ATA) graves, en Russie en 1913 et en 1932, en URSS pendant les années 1942-1948 (Joffe, 1978) ainsi qu'au Japon et en Corée (l'akakabi-byo décrit par Ueno, 1973 ; pour revue Yoshizawa, 2003). De façon plus ancienne, des rapports médicaux d'archives suggèrent l'occurrence d'ATA



**Figure 3 : Structure chimique de la zéaralénone.**

*Réalisé avec le logiciel KnowItAll® 5.0 (Bio-Rad,  
<http://www.knowitall.com/academic/welcome.html>)*



**Figure 4 : Structure chimique des fumonisines B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub>.**

*Réalisé avec le logiciel KnowItAll® 5.0 (Bio-Rad,  
<http://www.knowitall.com/academic/welcome.html>)*

## *Introduction*

---

en Angleterre au 16<sup>e</sup> et au 18<sup>e</sup> siècle (Matossian, 1981) ainsi qu'en Russie au début du 19<sup>e</sup> siècle (Steyn & Stander, 1999). Cependant, le rôle de *Fusarium spp.* et de ses toxines dans ces accidents alimentaires est resté dans l'ombre jusqu'aux années 70. L'implication du rôle toxique des trichothécènes n'a en effet été mis en évidence que tardivement (Preda, 1981, Joffe, 1983). Depuis, des études toxicologiques sur modèles animaux et quelques rares études épidémiologiques prenant en compte les comportements alimentaires ont confirmé et précisé les toxicités des fusariotoxines.

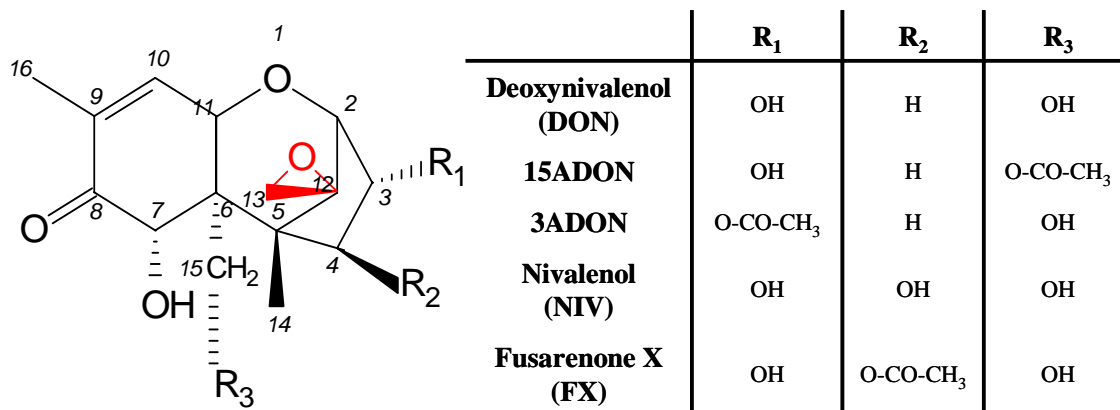
Nous l'avons précisé plus haut, le pathosystème choisi comme modèle pour l'ensemble de nos travaux est le couple *F. graminearum*/maïs. *F. graminearum* est producteur de trichothécènes de type B et de zéaralénone. Nos travaux se sont focalisés sur les biosynthèses des trichothécènes de type B. Cependant, la prévalence naturelle des trois familles de fusariotoxines sur maïs nous incite à évoquer leurs toxicités individuelles avec un accent particulier sur les trichothécènes de *F. graminearum*<sup>6</sup>.

La zéaralénone (Figure 3) et ses dérivés (comme le zéaralénol) sont issus de la condensation des acétates (Blackwell, *et al.*, 1985). Les toxicités cellulaires de ces composés sont très étudiées : cytotoxicité (Hacking, 1983, Mastri, *et al.*, 1986, Calvert, *et al.*, 2005, Cetin & Bullerman, 2005), inhibition de la synthèse protéique et de la synthèse des acides nucléiques (Abid-Essefi, *et al.*, 2004), induction de l'apoptose et arrêt du cycle cellulaire (Abid-Essefi, *et al.*, 2003). Des propriétés oestrogéniques de ces composés ont également été largement décrites (Leffers, *et al.*, 2001).

Les fumonisines sont des amino-polyalcools dérivés de l'alanine essentiellement produits par *Fusarium spp. proliferatum* et *verticillioides* (Branham & Plattner, 1993). Leur squelette est composé d'une longue chaîne de 20 carbones estérifiée en C14 et C15 (Figure 4). Les fumonisines les plus fréquemment rencontrées sont les FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> et FB<sub>3</sub> dont les structures ne diffèrent que par le nombre et/ou les positions de groupements hydroxyles.

---

<sup>6</sup> Dans une moindre mesure et en Europe seulement, l'occurrence des trichothécènes de type B sur maïs peut également être attribuable à *F. culmorum*. [183] Munkvold, GP (2003) Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. European Journal of Plant Pathology 109: 705-713.



**Figure 5 : Structure chimique de cinq trichothécènes de type B**

*Réalisé avec le logiciel KnowItAll® 5.0 (Bio-Rad,  
<http://www.knowitall.com/academic/welcome.html>)*

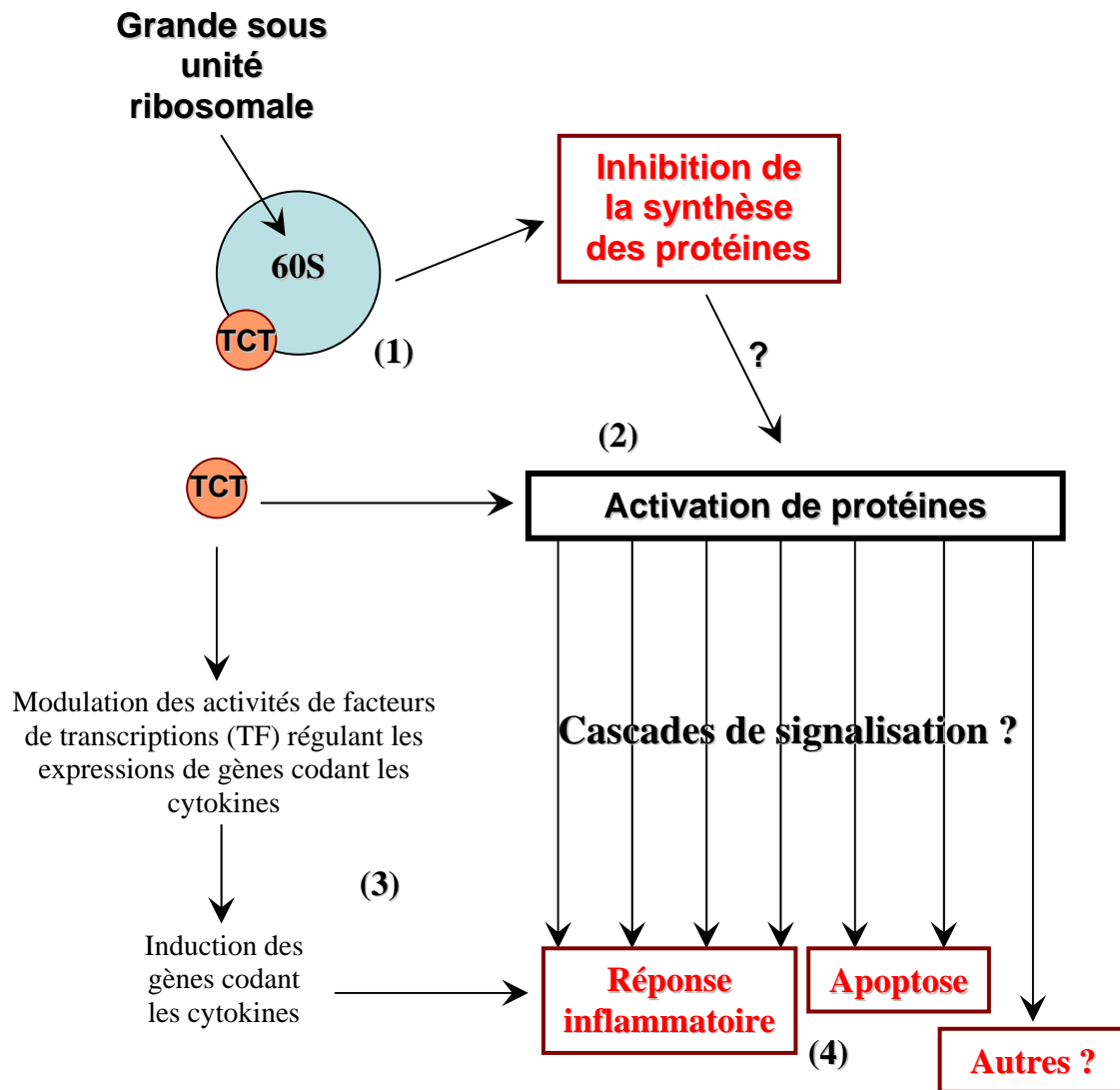
## Introduction

---

La contamination naturelle du maïs par les fumonisines ainsi que la toxicité de ces molécules a été largement étudiée depuis les années 80 (Sydenham, *et al.*, 1990, Thiel, *et al.*, 1992, Gamanya & Sibanda, 2001, Marasas, 2001, Van der Westhuizen, *et al.*, 2003). La FB<sub>1</sub> est la fumonisine la plus abondante sur *Zea mays* et semble également être la plus toxique pour les organismes animaux (Henry & Wyatt, 2001). Diverses études toxicologiques en ont démontré les propriétés hépatotoxiques et hépatocarcinogéniques chez le rat (Gelderblom, *et al.*, 1992, Gelderblom, *et al.*, 1992, Gelderblom, *et al.*, 2001, Gelderblom, *et al.*, 2001, Hard, *et al.*, 2001). Il semble également que la FB<sub>1</sub> soit génotoxique (Atroshi, *et al.*, 1999, Rumora, *et al.*, 2002) et neurotoxique (Osuchowski, *et al.*, 2005, Osuchowski, *et al.*, 2005). Quelques études épidémiologiques menées en Afrique du Sud et en Chine ont démontré l'implication des fumonisines dans le cancer de l'œsophage chez l'Homme (Chu & Li, 1994, Shephard, *et al.*, 1996). Enfin, de nombreux travaux ont démontré que les fumonisines altèrent le métabolisme lipidique des cellules et bloquent la voie métabolique des sphingolipides (Wang, *et al.*, 1991, Merrill, *et al.*, 1996, Carratù, *et al.*, 2003, Marasas, *et al.*, 2004, Osuchowski, *et al.*, 2005). Les rôles importants des sphingolipides et dérivés dans la croissance et la différenciation cellulaire, l'apoptose, et l'immunité peuvent expliquer, au moins en partie, les propriétés carcinogéniques des fumonisines (Tolleson, *et al.*, 1996, Schmelz, *et al.*, 1998).

Les trichothécènes sont des sesquiterpènes substitués par un groupement époxyde entre les positions C12 et C13 (Figure 5). Il existe 4 types de TCT notés de A à D : le groupe A représente le noyau de base sans substitution particulière, le groupe B possède une liaison cétone en C8, le groupe C possède un 2<sup>e</sup> groupement époxyde entre les positions C8 et C15 et, le groupe D est cyclisé entre C4 et C15. Le groupement époxyde des trichothécènes ainsi que la double liaison C9-C10 présente chez les TCTA, TCTB et TCTC est importante pour la toxicité des composés (Desjardins, *et al.*, 1993). Nous ne nous intéressons qu'aux TCT synthétisés par *F. graminearum* (et *F. culmorum*) c'est-à-dire les TCTB.

Les TCTB comprennent, entre autre, le deoxynivalenol (DON), aussi appelé vomitoxine, ses formes 15- et 3-acétylées, le nivalenol (NIV), et la fusarenone X (FX). Le DON est le TCTB le plus fréquemment rencontré sur maïs.



**Figure 6 : Représentation schématique de la transduction du signal induite par les TCTB dans les cellules de mammifères. (d'après Rocha, *et al.*, 2005)**

- (1) Inhibition de la synthèse protéique : les TCT interfèrent avec le site peptidyl transférase de la grande sous unité ribosomale ;
- (2) Voies des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) : le DON peut induire la phosphorylation de certaines MAPK entraînant leur activation. Les MAPK sont ensuite impliquées dans de nombreuses cascades de signalisation ;
- (3) Induction de la réponse inflammatoire : en plus d'activer des MAPK, le DON est un inducteur de la transcription des cytokines ce qui induit la réponse inflammatoire.
- (4) Induction de l'apoptose : Conséquence de l'inhibition de la synthèse des protéines et de l'activations de MAPK.



## Introduction

---

D'une manière générale, les trichothécènes provoquent chez les organismes animaux des retards de croissance, des troubles de la fertilité, des troubles de l'immunité, des troubles de l'alimentation et des vomissements (origine du terme vomitoxine) (Rotter, *et al.*, 1996). Les TCT sont également phytotoxiques (pour revue Rocha, *et al.*, 2005). Ils perturbent la germination des graines et causent, entre autres, flétrissement, chlorose foliaire et nécrose tissulaire. Ces symptômes sont les conséquences de l'inhibition de la synthèse protéique et de la prolifération cellulaire dans les cellules eucaryotes en général.

Les effets cellulaires des TCTB sont différents selon le règne considéré. De récentes études ont démontré que les TCT induisent, avec différentes efficacités, l'apoptose dans les cellules animales (le DON étant le plus efficace des TCTB) (pour revue Rocha, *et al.*, 2005 ; figure 6) tandis que le DON inhibe la mort cellulaire programmée chez *Arabidopsis thaliana* (Diamond, *et al.*, 2004).

En termes de niveaux de toxicité, de nombreux travaux ont indiqué que l'acétylation du DON a pour effet de réduire sa toxicité pour les organismes animaux, tandis que son hydroxylation semble l'augmenter (Kimura, *et al.*, 1998, Kimura, *et al.*, 1998, Alexander, *et al.*, 1999, McCormick, *et al.*, 1999, Muhitch, *et al.*, 2000). Ces données semblent confirmées par une récente étude indiquant que le NIV<sup>7</sup> est plus toxique pour les cellules animales que le DON (Minervini, *et al.*, 2004). L'inverse est observé en terme de phytotoxicité puisque le DON semble plus toxique pour les plantes que le NIV (Shimada & Otani, 1990). Cependant, il semble que, *in planta*, les composantes toxiques des TCTB peuvent être directement hôte dépendant. En effet, il apparaît que sur le blé la biosynthèse de DON donne un avantage sélectif quant à l'agressivité de *Fusarium spp.*, tandis que sur le maïs, *Fusarium spp.* qui produisent du NIV sont plus agressives (Nicholson, *et al.*, 2004).

Ces quelques données illustrent l'abondance des connaissances quant aux toxicités individuelles des FB et des TCTB. Toutefois, leur co-occurrence naturelle potentielle implique que pour évaluer les niveaux réels de toxicité des produits céréaliers contaminés il serait nécessaire de considérer de possibles effets synergiques en sus des toxicités de chacune des toxines. Quelques rares études semblent indiquer des effets

---

<sup>7</sup> Le nivalenol est C4 hydroxylé, au contraire du DON.

**Tableau 1 : Limites maximales de contamination des denrées céréalieres par le DON et l'ensemble (FB1+FB2). (Règlement (CE) N°856/2005 du 6 juin 2005 applicable à partir du 1<sup>er</sup> juillet 2006).**

Produit	Teneur maximale en µg/kg	
	DON	FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub>
Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	1250	
Blé dur et avoine bruts	1750	
Maïs brut	- <sup>(1)</sup>	2000 <sup>(2)</sup>
Farine de céréales y compris la farine de maïs, le gruau de maïs et le maïs moulu	750	1000 <sup>(2)</sup>
Pain, pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit déjeuner	500	
Pâtes sèches (blé) ou aliments à base de maïs autres que farine, gruau et maïs moulu	750	400 <sup>(2)</sup>
Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (matière sèche)	200	200 <sup>(2)</sup>

Les céréales brutes sont les céréales mises sur le marché en vue de subir une première transformation, c'est-à-dire tout traitement physique ou thermique autre que le séchage du grain.

(1) Si aucune teneur spécifique n'est fixée au 1er juillet 2007 la teneur de 1750 µg/kg s'appliquera.

(2) Teneur qui sera appliquée au 1er octobre 2007 si aucune autre teneur n'est décidée d'ici là

## *Introduction*

---

agonistes ou antagonistes en fonction des toxines et des doses considérées. Malheureusement les données à disposition qui décrivent ces effets sont rares (SCF, 2002).

Les nombreuses études des toxicités individuelles des fusariotoxines montrent que celles-ci sont bien réelles. Les accidents historiques associés à l'accumulation des données sur différents modèles animaux ainsi qu'aux résultats de récentes études épidémiologiques en apportent largement la preuve. En utilisant l'ensemble de ces travaux, le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH) a établi des doses journalières tolérables (DJT) pour plusieurs toxines de *Fusarium* et en particulier pour le DON, dont la DJT a été fixée à 1 µg/kg de masse corporelle, le NIV dont la DJT a été fixée à 0,7 µg/kg de masse corporelle, et l'ensemble (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>+FB<sub>3</sub>) dont la DJT a été fixée à 2 µg/kg de masse corporelle ; ces valeurs ont servi à établir un règlement émis par la Commission Européenne (CE, 2005) définissant des limites maximales de contamination des denrées céréalieres par le DON et l'ensemble (FB<sub>1</sub>+FB<sub>2</sub>) (Tableau 1). L'enjeu économique est désormais clair pour les acteurs de la filière céréalière : si la teneur en fusariotoxines dépasse les limites fixées par la Commission Européenne – rappelons que l'élimination des fusariotoxines des denrées céréalieres par des processus acceptables en agroalimentaire est impossible à ce jour – les denrées céréalieres ne seront pas commercialisées et ne représenteront qu'une perte financière sèche. Le règlement (CE) N° 856/2005 stipule en effet que les lots de céréales rejetés ne doivent pas être utilisés en alimentation animale ni mélangés avec des lots moins contaminés afin d'en réduire le niveau global de contamination. Une issue possible, envisageable pour le maïs (encadré 2), pourrait être l'utilisation en chimie verte des lots contaminés (papeterie, biocarburants, etc.).

Afin de limiter la présence des fusariotoxines sur les céréales et les produits céréaliers, la seule stratégie possible, conséquence de la grande stabilité de ces composés, consiste à limiter leurs biosynthèses au champ ; ceci implique d'identifier et de maîtriser les facteurs qui modulent la mycotoxinogenèse par *Fusarium spp.*



L'espèce *graminearum* est largement répandue à travers le monde et son potentiel à produire des TCTB, en plus de son caractère phytopathogène, la rend particulièrement importante en termes de menace phytosanitaire. Nos travaux se sont donc très largement intéressés à la biosynthèse de trichothécènes de type B par *F. graminearum*.

### **III. Objectifs : comprendre et limiter le risque mycotoxique ; exemple des trichothécènes**

Il est désormais établi que certaines espèces de *Fusarium* peuvent produire des mycotoxines. Ceci ne veut pas dire que tous les représentants de l'espèce dont il est question produisent des mycotoxines, ni même que ceux qui en produisent le font de façon systématique et/ou avec les mêmes intensités. On parle de potentiel toxigène plus ou moins exprimé.

Cette notion de potentiel toxigène nécessite quelques précisions.

Il existe des *Fusarium* producteurs et d'autres non producteurs de toxines. Ce caractère de *Fusarium spp.* est avant tout le reflet des séquences génomiques. L'analyse des séquences de régions variables du génome de différentes espèces permet de définir leur aptitude ou non à produire des trichothécènes en distinguant de plus les producteurs de TCTA des producteurs de TCTB (Mulé, *et al.*, 1997, O'Donnell, *et al.*, 1998). Certains auteurs sont allés plus loin dans l'analyse des variations de séquences génomiques en distinguant au sein des *F. spp. graminearum* et *culmorum* – ces espèces fusariennes sont désignées comme productrices potentielles de TCTB – deux groupes distincts qui diffèrent par leurs chemotypes, c'est-à-dire en fonction de la nature des TCTB synthétisés. *Fusarium* est de chemotype « DON » lorsqu'il est producteur de DON et/ou de ses formes 3- et 15-acétylées, ou de chemotype « NIV » lorsqu'il est producteur de NIV et/ou de FX (Kim, *et al.*, 2003, Li, *et al.*, 2005, Quarta, *et al.*, 2005).



## *Introduction*

---

L'existence génétique de ces deux chemotypes est la confirmation d'observations biochimiques expérimentales quant à l'existence de deux types qualitatifs de productions de TCTB (L. Pinson-Gadais, communication personnelle).

Le caractère producteur/non producteur d'une espèce est donc inscrit dans son génome, et une espèce non productrice ne produit jamais la toxine considérée. Le cas des espèces productrices est plus subtil. En effet, il existe au sein d'une même espèce des souches capables de synthétiser de grandes quantités de toxines et d'autres des quantités infimes. Tous les cas sont envisageables. Il devient alors possible de qualifier des souches fortes, moyennes ou faibles productrices. Toutefois, ce concept reste subjectif et empirique puisqu'il n'existe pas de consensus établissant des valeurs numériques absolues définissant les frontières entre des productions fortes, moyennes ou faibles dans des conditions données. Malgré cet obstacle, Bakan, *et al.*, (2002) ont distingué, sur la base de leur polymorphisme génétique, deux groupes de souches de chemotype DON en fonction de leur aptitude quantitative à produire des toxines. Les essais menés au sein du laboratoire MycSA semblent confirmer ces résultats dans la mesure où des souches qualifiées par de faibles productions en toxines n'ont jamais été observées se comportant comme de fortes productrices. En revanche, chez des souches connues pour produire des quantités importantes en toxines il n'est pas rare d'observer des diminutions importantes du rendement en toxines. La production de toxines est en effet largement modulée par de nombreux paramètres de l'environnement dans lequel le champignon croît (variations dans l'expression du génome et interférences épigénétiques).

Cette notion de variation dans les niveaux d'expression des potentiels toxigènes est intimement liée aux régulations des étapes de la biosynthèse des trichothécènes, déterminées par les divers stimuli qu'une souche de *Fusarium* reçoit de son environnement au cours de son cycle de vie (Martins & Martins, 2002, Flaherty, *et al.*, 2003, Champeil, *et al.*, 2004, Llorens, *et al.*, 2004, Llorens, *et al.*, 2004, Ramirez, *et al.*, 2004).

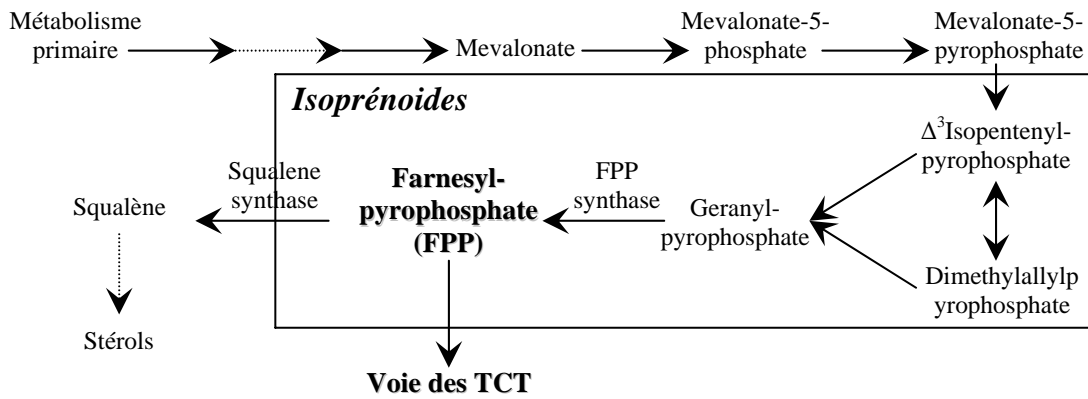


Figure 7 : Schéma simplifié de la voie des isoprénoïdes conduisant à la biosynthèse de farnésyl pyrophosphate (FPP).

(Source : [http://www.expasy.ch/cgi-bin/show\\_image?/E10&left](http://www.expasy.ch/cgi-bin/show_image?/E10&left))

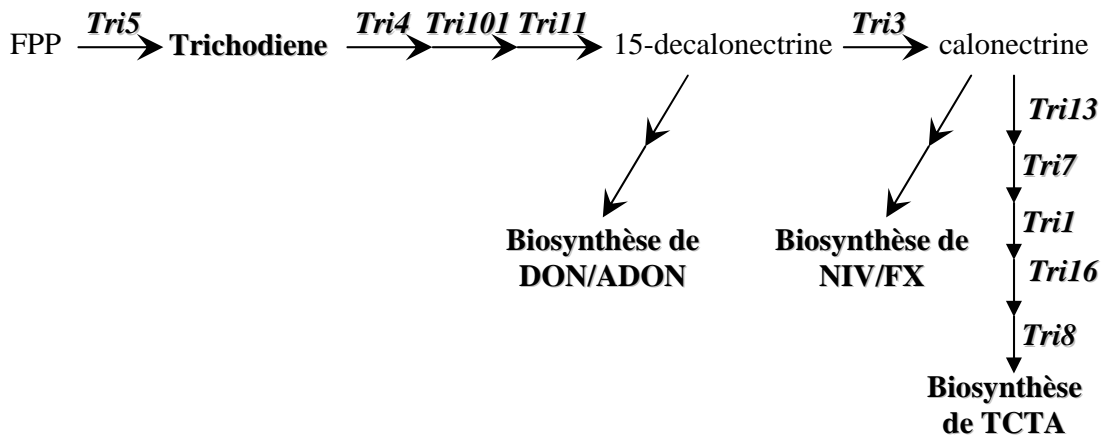


Figure 8 : Voie métabolique simplifiée conduisant aux biosynthèses des TCTA et TCTB (d'après Tag, *et al.*, 2001).

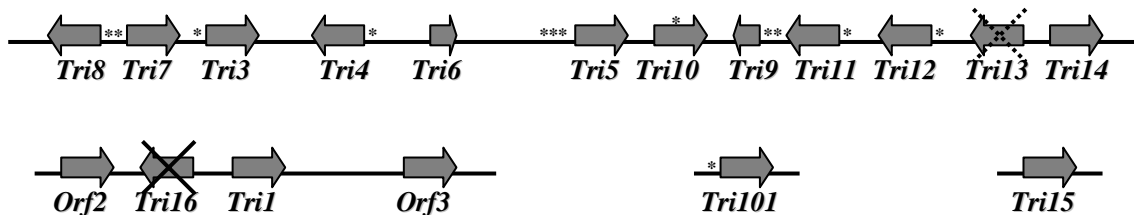


Figure 9 : Structure des régions génomiques contenant les gènes Tri connus.

D'après les résultats de Hohn, *et al.*, 1993, Kimura, *et al.*, 1998a, Kimura *et al.*, 1998b, McCormick, *et al.*, 1999, Brown, *et al.*, 2003, Meek, *et al.*, 2003, Alexander, *et al.*, 2004, Brown, *et al.*, 2004, McCormick, *et al.*, 2004).

Les flèches représentent le sens de traduction de chaque gène ; \* = Un site de fixation pour TRI6 ; X = Gène non fonctionnel chez *F. graminearum* ; X\* = Gène non fonctionnel chez *F. graminearum* de chemotype DON exclusivement



## Introduction

---

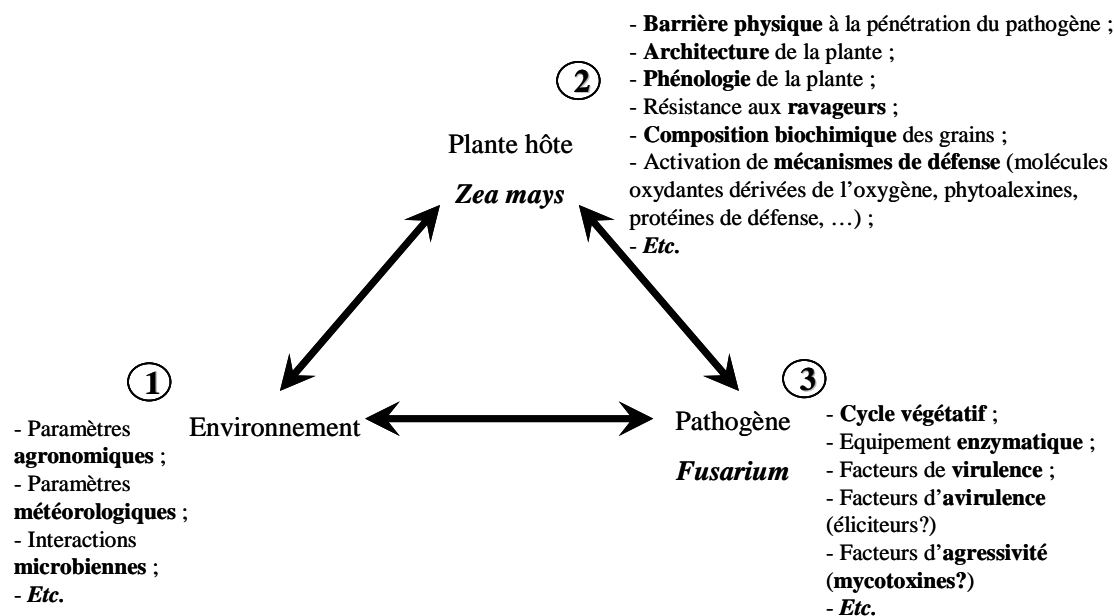
Tout d'abord, intéressons nous à la voie métabolique conduisant à la biosynthèse des trichothécènes.

Le métabolite précurseur des TCTB (mais aussi des TCTA) est le trichodiène, synthétisé à partir du farnésyl pyrophosphate, dérivé de la voie des isoprénoïdes (Figure 7). Le farnésyl pyrophosphate est également le précurseur des stérols (dont l'ergostérol, composé de la paroi fongique).

Les étapes qui mènent vers la biosynthèse des divers trichothécènes sont nombreuses et impliquent différentes activités enzymatiques, en particulier d'oxydation et d'estérification (Figure 8). De nombreux gènes *Tri* qui codent ces enzymes ont été identifiés, mais quelques uns demeurent inconnus (*e.g.* gène qui code l'activité enzymatique responsable de l'ajout d'un groupement cétone en C8 du squelette sesquiterpénoïque des TCTB). On dénombre à l'heure actuelle 16 gènes *Tri* dont 12 d'entre eux sont regroupés en un même locus fonctionnel souvent appelé cluster *Tri* (Hohn, *et al.*, 1993, Brown, *et al.*, 2004). Certains gènes appartenant à ce cluster ont été décryptés sans toutefois que la protéine encodée n'ait pu être à ce jour caractérisée (*e.g.* *Tri14* dont la protéine hypothétique ne présente d'homologie avec aucune protéine connue). Trois autres loci ont été identifiés (Figure 9). Les deux premiers sont chacun composés d'un gène *Tri* unique, *Tri101* et *Tri15* (Kimura, *et al.*, 1998, Kimura, *et al.*, 1998, McCormick, *et al.*, 1999, Alexander, *et al.*, 2004). Le dernier locus comprend les gènes *Tri16* et *Tri1* (Brown, *et al.*, 2003, Meek, *et al.*, 2003, McCormick, *et al.*, 2004). Parmi ces gènes *Tri*, le gène *Tri5* est particulièrement remarquable puisqu'il code la trichodiène synthase qui catalyse la formation du trichodiène (Hohn, *et al.*, 1993). Les gènes *Tri6*, *Tri10* et *Tri15* codent des facteurs de transcription importants qui régulent l'expression des autres gènes *Tri* (Proctor, *et al.*, 1995, Tag, *et al.*, 2001, Peplow, *et al.*, 2003, Alexander, *et al.*, 2004). D'autres gènes remarquables sont les gènes *Tri7* et *Tri13* dont la présence à l'état fonctionnel détermine le chemotype NIV d'une souche (Brown, *et al.*, 2001, Brown, *et al.*, 2002, Kim, *et al.*, 2003, Kimura, *et al.*, 2003). Enfin, notons également l'existence des gènes *Tri101* et *Tri8* qui codent des protéines aux fonctions opposées – *Tri101* code une 3-O-acetyltransferase et *Tri8* code une C3-deacetylase – respectivement décrites comme des facteurs de non-agressivité et d'agressivité (Alexander, *et al.*, 1999, McCormick & Alexander, 2002).

**Tableau 2 : Fonctions des gènes *Tri* identifiés.**

Gène	Fonction	Références
<i>Tri1</i>	C8-hydroxylase cytochrome P450 C7-hydroxylase ?	(Meek, <i>et al.</i> , 2003, McCormick, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Tri3</i>	15-O-acetyltransferase	(McCormick, <i>et al.</i> , 1996, Kimura, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Tri4</i>	C2-hydroxylase cytochrome P450	(Hohn, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Tri5</i>	Trichodiène synthase	(Hohn, <i>et al.</i> , 1993, Proctor, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Tri6</i>	Facteur de transcription positif	(Proctor, <i>et al.</i> , 1995, Hohn, <i>et al.</i> , 1999)
<i>Tri7</i>	C4-acetylase	(Brown, <i>et al.</i> , 2001)
<i>Tri8</i>	C3-deacetylase	(McCormick & Alexander, 2002)
<i>Tri9</i>	?	(Hohn, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Tri10</i>	Facteur de transcription	(Tag, <i>et al.</i> , 2001, Peplow, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Tri11</i>	C15-hydroxylase cytochrome P450	(Zamir, <i>et al.</i> , 1991, Alexander, <i>et al.</i> , 1998, Zamir & Farah, 2000)
<i>Tri12</i>	Pompe à efflux	(Alexander, <i>et al.</i> , 1999, Wuchiyama, <i>et al.</i> , 2000)
<i>Tri13</i>	C4-hydroxylase	(Brown, <i>et al.</i> , 2002)
<i>Tri14</i>	?	(Brown, <i>et al.</i> , 2002)
<i>Tri15</i>	Facteur de transcription négatif ?	(Alexander, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Tri16</i>	C8-hydroxyl-esterase	(Brown, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Tri101</i>	3-O-acetyltransferase	(Kimura, <i>et al.</i> , 1998, Kimura, <i>et al.</i> , 1998, McCormick, <i>et al.</i> , 1999)



**Figure 10 : Modèle d'interaction entre l'hôte, le pathogène et leur environnement commun.**

Ce modèle décrit les trois grands groupes dans lesquels doivent être identifiés les facteurs de risque d'apparition de fusariose et/ou de production de toxines. Il est la base communément utilisée pour la réalisation d'algorithmes mathématiques de prédiction des risques dont les efficacités dépendent de l'exhaustivité des facteurs pris en compte couplée à la qualité des connaissances des impacts de chacun des facteurs seul ou en synergie avec les autres.

## ***Introduction***

---

Le détail des gènes *Tri* connus ainsi que leurs fonctions sont résumés dans le tableau 2.

Une bonne connaissance des acteurs enzymatiques de cette voie de biosynthèse ainsi que des mécanismes de régulation associés pourrait participer, à terme, à limiter l'occurrence des TCTB au champ.

Le double caractère phytopathogène et mycotoxinogène de *Fusarium spp.* pourrait laisser supposer l'existence d'un lien entre fusariose et mycotoxines. En effet, l'agressivité d'une souche a souvent été associée avec la production de toxines. Proctor, *et al.*, (1995) ont en particulier montré que l'interruption du gène *Tri5* peut entraîner une diminution du degré d'infection du blé et du riz par *F. graminearum*. En revanche, cette observation ne s'est pas vérifiée sur maïs, suggérant l'intervention de paramètres hôte dépendant. Ces interactions plante/pathogène sont un des facteurs fondamentaux à prendre en compte lors de l'évaluation du risque phytosanitaire lié à la présence de *Fusarium spp.*

### **IV. Interactions plante/pathogène : un axe de recherche pour la prévention du risque mycotoxique**

Idéalement, toute stratégie préventive implique l'identification et la gestion intégrée de tous les facteurs de risque, que l'on peut regrouper en trois grands groupes (Figure 10). La première classe de paramètres susceptibles de moduler l'occurrence au champ de *Fusarium* et/ou des fusariotoxines est un ensemble de facteurs environnementaux tels les données climatiques, agronomiques ou encore la présence d'organismes compétiteurs dans le même écosystème (pour revue Champeil, *et al.*, 2004). Par exemple, les conditions météorologiques variables d'une année sur l'autre font qu'il y a « des années à *Fusarium* » par opposition à des années où les niveaux de contamination par le champignon sont plus faibles et moins fréquents. Vigier, *et al.*, (2001) ont en particulier montré que le nombre de jours entre juillet et septembre pendant lesquels l'humidité relative atteint ou dépasse 80 % est positivement associé à



## *Introduction*

---

la sévérité des symptômes de fusariose et à la teneur en DON des grains de céréale. La deuxième catégorie de paramètres rassemble les caractéristiques physiques, biologiques et biochimiques de la plante hôte. En effet, les différentes espèces et variétés de plantes céréalières hôtes possible de *Fusarium* présentent des degrés divers de résistance/susceptibilité à la fusariose. Il semble que la sélection de variétés résistantes au *Fusarium*, par des méthodes de sélection traditionnelle associées à des méthodes de sélection assistée par marqueurs, soit une voie des plus prometteuses de la lutte contre la fusariose (Bily, 2003). Enfin, le cycle de vie, l'équipement enzymatique, le potentiel toxigène de *Fusarium* sont autant de facteurs qui peuvent déterminer la virulence et/ou le degré d'agressivité du pathogène à l'égard de la plante hôte. Le terme pathosystème est parfois utilisé pour désigner l'ensemble des caractéristiques de la plante hôte et du pathogène.

De nombreux travaux de modélisation mathématique probabilistique des interactions de ces trois catégories de paramètres ont été réalisés dans le but de prédire le risque mycotoxique au champ (Higa, *et al.*, 2003, Van Maanen & Xu, 2003, Le Bail, *et al.*, 2005). Mais s'il est simple de connaître et de paramétrer des données climatiques, il est plus complexe d'intégrer au modèle l'ensemble des interactions entre la plante hôte et le *Fusarium* pathogène pour la raison manifeste que les acteurs du dialogue moléculaire entre les deux organismes ainsi que les conséquences qui en découlent, tant pour l'hôte que pour *Fusarium*, ne sont pas parfaitement connus.

C'est au niveau de ce pathosystème que vont se situer nos travaux.

Deux aspects importants sont à l'origine du problème *Fusarium*. D'un côté il y a l'aspect phytopathogène responsable des événements de fusariose ; de l'autre il y a l'aspect mycotoxinogène de *Fusarium spp.* responsable de l'altération de la qualité sanitaire des grains de céréale et de maïs. De nombreux indices semblent indiquer que la résistance au DON et la résistance à la fusariose pourraient être liés (Mesterhazy, 2002, Snijders, 2004).

La résistance au *Fusarium* est déterminée par l'efficacité des mécanismes de défense de l'hôte activés en réponse à l'attaque pathogène, et il semble que la présence



## *Introduction*

---

de fusariotoxines module ces réponses de défense. Par exemple, il a été mis en évidence que dans les racines de blé contaminées par du DON il y a augmentation de l'expression de divers gènes de défense (Ansari, *et al.*, 2004) et que l'activation des mécanismes de défense du blé en réponse à la présence de DON est plus lente dans les variétés sensibles que dans les variétés dites résistantes (Bernardo, *et al.*, 2004). La résistance au DON pourrait s'exprimer *via* une diminution du niveau de production en DON, ou *via* une dégradation/inactivation du DON intervenant après sa biosynthèse. Divers éléments semblent indiquer que la résistance au DON pourrait être possible *via* une activité glucosyl-transferase végétale (Lemmens, *et al.*, 2004). En effet, il a été mis en évidence que la glycosylation de DON neutralise les effets phytotoxiques (Poppenberger, *et al.*, 2004). La présence chez le maïs d'enzymes capables de dégrader le DON et le 15ADON a été suggérée par Miller, *et al.*, (1983) dont les travaux décrivent la diminution au cours du temps des teneurs en DON et 15ADON dans des plants de maïs artificiellement contaminés. Toutefois, ces résultats sont à moduler dans la mesure où les produits de dégradation du DON et du 15ADON n'ont pas été identifiés ni leurs toxicités évaluées.

Ainsi, les vitesses et/ou les intensités de la réponse de l'hôte à la présence de DON sont différentes en fonction du degré de sensibilité au *Fusarium*. Il semblerait que la sensibilité au *Fusarium* soit associée à une lente capacité d'activation des mécanismes de défense en réponse à la présence de DON (Ansari, *et al.*, 2004, Bernardo, *et al.*, 2004). Intéressons-nous à ces mécanismes de défenses activés en réponse à une attaque fusarienne.

D'une façon générale, l'infection de l'hôte par *Fusarium* entraîne, entre autres, des modifications de la paroi cellulaire, l'activation des gènes codant les protéines PR (Pathogenesis Related), l'augmentation de l'expression de chitinases et glucanases et la mise en route de phénols oxydases (Nicholson, *et al.*, 2004). Ces événements sont des mécanismes de défense généraux de la plante. C'est d'ailleurs une propriété des mécanismes de défense des végétaux : une interaction spécifique entre un hôte et son pathogène va induire des mécanismes généraux de défense. L'efficacité de ces mécanismes de défense va conditionner le niveau de résistance de la plante à

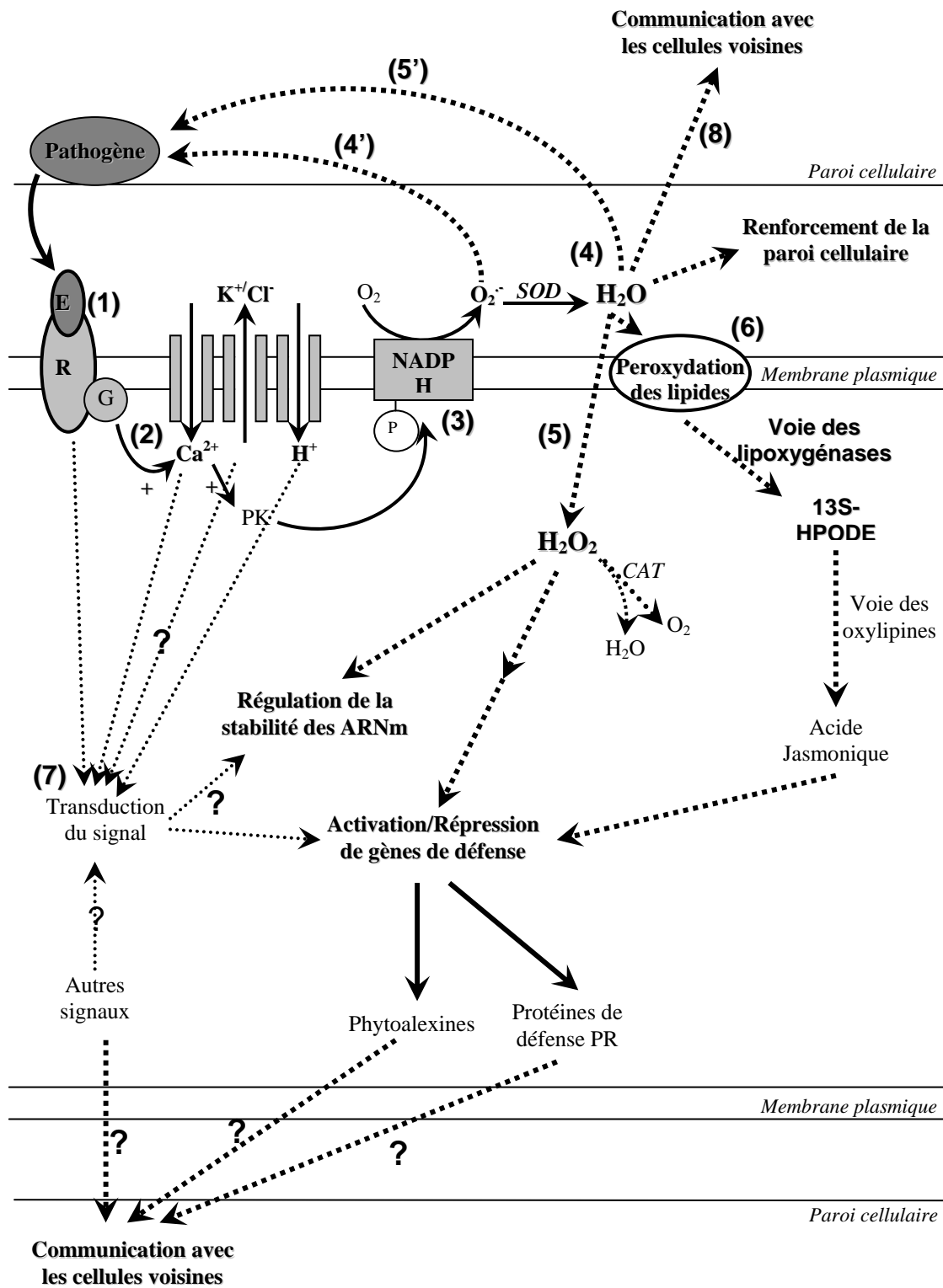


Figure 11 : Evènements cellulaires intervenant dans la mise en place de la réponse hypersensible chez la plante (d'après Mehdy, *et al.*, 1994, Mittler & Lam 1996).



## *Introduction*

---

l'agresseur. L'absence d'interaction spécifique forte entre la plante et son pathogène a pour conséquence la non activation de ses mécanismes de défense, et donc la non-résistance (sensibilité) à l'attaque pathogène.

L'activation de ces mécanismes de défense représente notre hypothèse de travail : **les composés produits par la plante lorsque *Fusarium* débute son cycle infectieux modulent les biosynthèses des mycotoxines.**

Le premier rempart à l'infection pathogène est la paroi cellulaire estérifiée par de nombreux composés phénoliques, et en particulier des acides phénoliques comme l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique. Ce point a largement été discuté par Bily (2003). Lors d'une attaque pathogène, la paroi peut être plus ou moins dégradée. Les lysats de parois peuvent alors jouer le rôle d'éliciteur des mécanismes de défense de la plante. Quelques minutes après l'élicitation de la réponse à l'attaque pathogène, les dimérisations oxydatives d'acides phénoliques estérifiés à la paroi permettent d'en réduire la digestibilité et de participer au confinement de l'infection. Ces dimérisations oxydatives sont sous la dépendance du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dont la production est une des premières étapes de la réponse hypersensible à une attaque pathogène. Nous allons nous attarder sur ce dernier aspect.

Après reconnaissance du pathogène par la plante, il y a mise en place de la réponse hypersensible qui se manifeste en premier lieu par un « burst oxydatif » c'est-à-dire par le largage massif de formes réactives dérivées de l'oxygène (ou ROS pour Reactive Oxygen Species), puis par la nécrose des cellules végétales impliquées dans la réponse (réponse localisée). La production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est un des événements majeurs (Jacks & Davidonis, 1979, Wang, *et al.*, 1993, Repka, 1999, Repka, 2002, Kachroo, *et al.*, 2003, Mika, *et al.*, 2004). En effet, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relargué lors du « burst oxydatif » dans les cellules végétales orchestre la réponse hypersensible de la plante (Levine, *et al.*, 1994, Hu, *et al.*, 2003).

Les événements cellulaires impliqués dans la mise en place de la réponse hypersensible sont résumés sur la figure 11 (d'après Mehdy, 1994, Mittler & Lam, 1996). Le pathogène, ou un éliciteur émis par le pathogène, est spécifiquement reconnu



## Introduction

---

par un récepteur membranaire de la plante hôte (1). Cette reconnaissance induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et une acidification du cytosol tandis que dans le même temps, des ions potassium et chlore sont expulsés (2). Le complexe NADPH oxydase de la plante est alors activé (phosphorylation par une protéine kinase calcium dépendante) : le dioxygène est métabolisé en anion superoxyde  $O_2^-$ , une des possibles formes réactives dérivées de l'oxygène (3). Les anions superoxydes sont alors dismutés en  $H_2O_2$  sous l'action de la superoxyde dismutase (4) ; les anions superoxydes sont également toxiques pour le pathogène (4'). Le  $H_2O_2$  produit peut lui aussi être directement toxique pour le pathogène (5') mais il s'agit surtout d'un signal déclenchant la suite des mécanismes de défense comme l'activation directe des mécanismes de renforcement de la paroi cellulaire (par exemple dimérisation des acides phénoliques). Après pénétration dans le milieu intracellulaire (5),  $H_2O_2$  peut directement agir sur la stabilité des ARNm, ou encore participer à des cascades de signalisation conduisant à la modulation des expressions de gènes impliqués dans les réactions de défense de la plante (codant les phytoalexines, les protéines PR, *etc.*).  $H_2O_2$  participe également à la peroxydation des lipides (production du radical hydroxyle  $\cdot OH^8$  capable d'initier la peroxydation des lipides), lipides également peroxydés par la voie des lipoxygénases (6). Les produits d'oxydation des lipides sont, entre autres, impliqués dans la voie des oxylipines conduisant notamment à la synthèse d'acide jasmonique qui est également un composé régulateur des gènes impliqués dans les mécanismes de défense de la plante. Il n'est pas à exclure que d'autres signaux non identifiés participent à la transduction d'un signal conduisant également aux régulations de la stabilité des ARNm et à celles des expressions des gènes de défense (7). L'ensemble des signaux, y compris  $H_2O_2$  extracellulaire, sert enfin de moyen de communication avec les cellules végétales voisines afin de propager la réponse hypersensible (8). L'issue finale de ces signalisations est l'induction de la mort cellulaire programmée des cellules impliquées dans cette réponse hypersensible. La nécrose tissulaire doit permettre le confinement du pathogène et limiter son invasion.

L'occurrence de ces évènements généraux a été confirmée dans le cadre plus restreint d'interactions plante-*Fusarium*. Les travaux de Zhou, *et al.*, (2004) indiquent

---

<sup>8</sup> Réaction de Fenton :  $Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + \cdot OH + OH^-$



## Introduction

---

la présence d'un « burst oxydatif » par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les tissus végétaux infectés par *Fusarium spp.* dans les cinq jours qui suivent l'infection. De plus, des données semblent indiquer que les effets combinés d'enzymes aux activités reliées à la production/dégradation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (superoxyde dismutase et catalase) sont une composante de la résistance initiale de la plante à l'invasion par *Fusarium* (Somleva & Blechl, 2004). Du côté du pathogène, il semble que l'arsenal enzymatique du champignon (superoxyde dismutase, catalase, laccases, peroxydases) soit déterminant dans la progression de l'infection et la résistance aux ROS (Mayer, *et al.*, 2001). Ce dernier point semble particulièrement vrai en ce qui concerne les pathogènes nécrotrophes<sup>9</sup> (qui peuvent se développer sur des tissus morts) ou la stimulation de la réponse hypersensible aux effets nécrosants peut favoriser l'invasion du pathogène (Govrin & Levine, 2002).

La voie de biosynthèse des TCTB est jalonnée de réactions d'oxydations. De ce fait, **les modifications des paramètres oxydatifs des grains sont susceptibles d'interférer dans le métabolisme secondaire de *F. graminearum* et de moduler les niveaux de production en DON.**

Cette hypothèse semble en accord avec de précédents essais indiquant que la biosynthèse de DON par *F. graminearum* nécessite des conditions oxydantes faibles (Miller & Blackwell, 1986). Toutefois, les effets des paramètres oxydants du milieu ne sont pas clairs dans la mesure où nous avons montré que l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène dans le milieu de culture a pour effet durable d'activer la biosynthèse de DON/ADON par *F. graminearum* (Ponts, *et al.*, 2003).

Préciser les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des paramètres oxydants du milieu sur la biosynthèse de TCTB a été notre objectif initial. Par extension nous nous sommes également intéressés aux effets de produits du système lipoxygénasique du maïs activé lors d'invasions pathogènes. La production de toxines pourrait être une composante de la réponse de *Fusarium* à la réponse hypersensible de la plante. Nous avons testé cette

---

<sup>9</sup> Les espèces fusariennes *proliferatum* et *verticillioides* sont des pathogènes nécrotrophes, au contraire des espèces *graminearum* et *culmorum*.



## *Introduction*

---

hypothèse en comparant les productions en DON/ADON par *F. graminearum* aux variations de ses activités enzymatiques anti-oxydantes intracellulaires de type superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT). En effet, des activités SOD et CAT semblent impliquées dans les résistances de *Fusarium* aux mécanismes de défense de la plante hôte (Kono, *et al.*, 1995). Ces travaux ont été rapprochés de précédents résultats ayant montré une production extracellulaire en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *F. graminearum* dont la cinétique de production est synchrone avec la cinétique d'accumulation du DON/ADON (Ponts, *et al.*, 2003).

Enfin, une approche transcriptomique a été entreprise afin d'ouvrir des pistes de recherche quant aux régulations cellulaires et moléculaires de la biosynthèse des TCTB lors de stress oxydatifs. En effet, la compréhension des événements qui conduisent à la modulation de la production de TCTB par des composés végétaux *de novo* synthétisés pourrait représenter une étape importante vers la sélection de lignées de maïs dont la réponse qualitative et quantitative à l'infection fongique serait susceptible de limiter le risque mycotoxique.

En tout premier lieu, pour atteindre nos objectifs, il a été nécessaire de procéder à une mise au point méthodologique indispensable à la production de résultats répétables et reproductibles. Le premier chapitre de cette thèse est dédié à ce volet de nos travaux.





## *Matériels et Méthodes*



## I. Matériel Biologique

### I.1. Souches fusariennes

La souche modèle utilisée tout au long de nos essais est la souche *F. graminearum* CBS185.32, contaminante naturelle du maïs, provenant de la collection hollandaise du Centraal Bureau voor Schimmelcultures<sup>10</sup>. Sa spécification a été vérifiée en utilisant des critères d'observation morphologique (Nelson, *et al.*, 1983) sur milieu PDA (infusât de pomme de terre 4 %, glucose 20 %, Agar Agar 15 % w/v, autoclavage 15 min à 120°C) mais aussi en utilisant des techniques moléculaires de type RFLP<sup>11</sup> (Ponts, 2002).

Occasionnellement, plusieurs autres souches fusariennes ont été utilisées au cours de certains de nos essais : *F. graminearum* INRA 155, 158, INRA 159, INRA 169, INRA 162, INRA 183, INRA 91, INRA 194, INRA 150, et *F. culmorum* INRA 117, INRA 127, INRA 233, INRA 134, INRA 305, INRA 337, INRA 129, INRA 130 et INRA 319. Toutes ont été isolées au laboratoire et conservées à 4°C en tubes de PDA inclinés. Leurs spécifications ont été vérifiées de la même façon que celles de notre souche modèle.

Avant chaque utilisation, la (les) souche(s) est (sont) repiquée(s) sur tubes PDA inclinés et incubée(s) 8 jours à 25°C à l'obscurité. Les suspensions de spores requises pour inoculer les milieux sont fraîchement préparées par ajout de 6 mL d'eau distillée stérile dans les tubes et agitation modérée. La concentration en spores de la solution obtenue est évaluée par comptage sur cellule de Thoma.

### I.2. Potentiels toxigènes *in vitro* des souches

Le potentiel toxigène de chacune des souches a été arbitrairement défini par la teneur en toxines de grains stériles<sup>12</sup> inoculés *in vitro* avec 10<sup>4</sup> spores, et placés à 25°C

---

<sup>10</sup> <http://www.cbs.knaw.nl/index.htm>

<sup>11</sup> Restriction Fragment Length Polymorphism, polymorphisme dans la longueur des fragments de restriction.

<sup>12</sup> Stérilisation par autoclavage à 110°C pendant 25 min.

**Tableau 3 : Caractéristiques principales des souches fusariennes utilisées.**

<b>Nom de la souche</b>	<b>Espèce</b>	<b>Chemotype</b>	<b>Potentiel toxigène (µg de toxines par g de grain sec infecté)</b>
CBS185.32	<i>graminearum</i>	DON	450
INRA 155	<i>graminearum</i>	DON	860
INRA 158	<i>graminearum</i>	DON	1
INRA 159	<i>graminearum</i>	DON	3500
INRA 169	<i>graminearum</i>	DON	15
INRA 162	<i>graminearum</i>	NIV	140
INRA 183	<i>graminearum</i>	NIV	10
INRA 91	<i>graminearum</i>	NIV	115
INRA 194	<i>graminearum</i>	NIV	57
INRA 150	<i>graminearum</i>	NIV	21
INRA 117	<i>culmorum</i>	DON	500
INRA 127	<i>culmorum</i>	DON	100
INRA 233	<i>culmorum</i>	DON	30
INRA 134	<i>culmorum</i>	DON	1190
INRA 305	<i>culmorum</i>	DON	112
INRA 337	<i>culmorum</i>	NIV	38
INRA 129	<i>culmorum</i>	NIV	280
INRA 130	<i>culmorum</i>	NIV	60
INRA 319	<i>culmorum</i>	NIV	8

## *Matériels et Méthodes*

---

pendant 21 jours. Avant inoculation, l'activité thermodynamique de l'eau ( $A_w$ ) des grains a été ajustée entre 0,98 et 1,00 (données antérieures générées au laboratoire). Pour chaque souche, la nature des grains utilisés correspond à son hôte naturel. Toutes nos souches ont été isolées de blé ou de maïs uniquement. Ces tests ont été réalisés antérieurement au laboratoire. Les données collectées sont rassemblées dans le tableau 3.

## **II. Expression des résultats et analyses statistiques**

Tous nos résultats sont évalués à partir de trois répétitions parallèles d'expériences. Les données récoltées de différentes séries d'expériences sont comparables après normalisation des teneurs en TCTB de chaque culture par la plus précoce teneur en TCTB quantifiable dans l'expérience témoin correspondante. Habituellement, dans nos conditions de culture standard, la présence des TCTB n'est pas quantifiable avant le 3<sup>e</sup> jour de culture ; les niveaux en TCTB dans les cultures témoins âgées de 3 jours sont donc souvent utilisés comme facteurs de normalisation. Les niveaux en TCTB mesurés dans les filtrats des milieux de culture sont exprimés en microgramme(s) de toxines par gramme de biomasse sèche. Pour chaque expérience, la normalisation utilisée est détaillée en légende de figure.

Sauf mention contraire, les valeurs présentées sont les moyennes arithmétiques  $\pm$  écart type des répétitions. La significativité des différences observées est évaluée en réalisant des tests de Student (t-test par paires, distribution bilatérale). Le seuil de significativité est fixé à  $p=0,05$ .

Dans le cas des études des niveaux d'expression des gènes, la significativité des différents résultats est évaluée en utilisant le logiciel REST<sup>®</sup> (Pfaffl, 2001, Pfaffl, *et al.*, 2002) au seuil de significativité  $p=0,05$ .



### **III. Cultures liquides**

L'ensemble de nos expériences a été réalisé en milieu GYEP (glucose 5 %, extrait de levure 1 %, neopeptone 1 % w/v, autoclavage à 105°C pendant 30 min) qui est un milieu classiquement utilisé pour les cultures liquides de *Fusarium* (Miller, *et al.*, 1983).

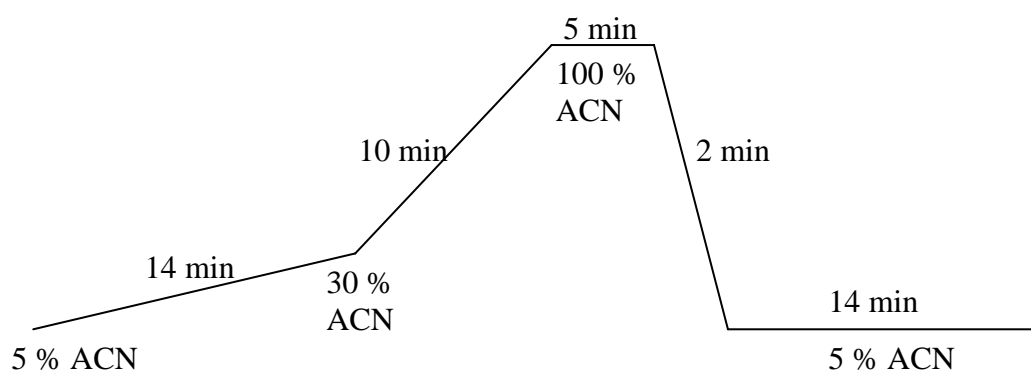
#### **III.1. Cultures standard**

Un volume de 100 mL de GYEP dans une fiole Erlenmeyer de 500 mL est inoculé avec  $10^6$  spores et incubé à 25°C et 150 rpm à l'obscurité dans un incubateur Multitron<sup>®</sup> (INFORS AG, Bottmingen, Suisse). Les cultures sont arrêtées par filtration sous vide sur papier Whatman<sup>®</sup> n°4 stérile (autoclavage 121°C, 20 min). Les mycelia sont rincés deux fois à l'eau MilliQ<sup>®</sup> stérile et immédiatement stockés à -80°C. Les filtrats sont aliquotés par 15 mL et stockés à -20°C.

#### **III.2. Mini-cultures**

Un volume de 8 mL de GYEP dans une petite boîte de Pétri est inoculé avec  $0,8 \times 10^5$  spores. Les mini-cultures sont ensuite placées dans une boîte métallique avec couvercle et incubé à 25°C sans agitation. Elles sont arrêtées par 10 min de centrifugation à 2000 rpm. Les surnageants sont stockés à -20°C et les mycelia sont placés à -80°C.

Les teneurs en TCTB sont déterminées dans les filtrats et les surnageants des cultures. Les biomasses fongiques sont mesurées par la pesée des mycelia après 48 heures de lyophilisation (FlexiDry<sup>™</sup> Freeze Dryer, FTS Systems, Stone Ridge USA).



**Figure 12 : Gradient acétonitrile/eau utilisé pour l'analyse des TCTB.**

Gradient binaire eau pH ajusté à 2,6 avec de l'acide *o*-phosphorique + acétonitrile (ACN), débit fixé à 1 mL.min<sup>-1</sup>



### **IV. Analyse des TCTB**

#### **IV.1. Préparation des échantillons**

Quinze millilitres de filtrat de culture standard ou 5 mL de surnageant de mini-culture sont extraits avec deux volumes d'acétate d'éthyle. Deux fois 10 mL de phase organique (une fois 8 mL dans le cas de mini-cultures) sont ensuite évaporés à sec à 70°C sous un flux d'azote. Les extraits secs sont alors stockés à -20°C en vials parafilmés en attendant l'analyse.

#### **IV.2. Analyse par chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography ou HPLC)**

##### ***IV.2.a. Quantification par HPLC-UV***

La procédure a été adaptée de la méthode développée par Bily, *et al.*, (2004). Les analyses ont été réalisées sur une chaîne HPLC Hewlett-Packard ChemStation Series 1100 couplée à un détecteur à barrette de diodes (DAD). Les TCTB sont séparés le long d'une colonne Zorbax Eclipse XDB-C8 5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4.6 mm (Agilent Technologies, Palo Alto USA) maintenue à 40°C. La séparation est réalisée en gradient d'acétonitrile, en mélange avec de l'eau MilliQ<sup>®</sup> dégazée acidifiée à pH 2,6 avec de l'acide o-phosphorique, croissant de 5 % à 30 % en 14 min, puis 100 % en 10 min (pallier maintenu 5 min) et enfin décroissant jusqu'à 5 % en 2 min (Figure 12). Le débit est fixé à 1 mL/min.

Avant analyse, les extraits secs sont repris dans 200  $\mu$ L de méthanol/eau (50 %, v/v). Le volume d'injection est fixé à 5  $\mu$ L. Les signaux sont enregistrés pour  $\lambda = 230$ , 280 et 320 nm mais seul le signal à 230 nm est utilisé pour la quantification.



L'identification et la quantification des 5 TCTB sont réalisées par étalonnage externe utilisant des composés de référence achetés sous forme de poudre lyophilisée auprès de Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA). Le stockage longue durée des TCTB de référence est possible dans l'acétonitrile et dans des flacons séparés parafilmés stockés à -20°C. Avant analyse, des aliquotes de chacun des 5 TCTB sont mélangés, évaporés à sec sur bloc chauffant à 70°C et sous flux d'azote, puis repris dans le même mélange méthanol/eau (50 %, v/v) que les échantillons. Ce mélange peut être stocké quelques semaines à -20°C dans un vial parafilmé.

### ***IV.2.b. Identification de composés s'accumulant dans les milieux de culture***

Les analyses ont été réalisées sur une chaîne HPLC couplée à un détecteur par spectrométrie de masse équipé d'une source ionisante de type electrospray et d'un analyseur de type piège à ions (HPLC-ESI-TI-MS<sup>13</sup> ; matériel LCQ Advantage Max, Thermo Electron Corporation ; analyses réalisées en collaboration avec le service technique de Thermo Electron Corporation).

## **V. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Nos contraintes expérimentales imposaient d'utiliser une technique rapide, simple et peu coûteuse en raison du nombre élevé d'analyses à réaliser lors d'expériences où de multiples traitements sont testés sur de longs intervalles de temps. Nous avons choisi d'utiliser une procédure adaptée de la méthode décrite par Richard-Forget & Gaillard, (1997). Tous les réactifs provenaient de chez Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA). Trois millilitres de filtrat de milieu de culture sont décolorés avec 100 mg de charbon actif (agitation 2 min et centrifugation 5 min à 7000 rpm). La réaction est réalisée en mélangeant 500 µL de filtrat décoloré, 63 µL de guaiacol 50 mM (dans du

---

<sup>13</sup> HPLC - ElectroSpray Ionisation – Trap Ion – Mass Spectrometry



tampon McIlvaine pH 5,5) et 0,6 unités de Horse Radish Peroxidase (HRP). Immédiatement après l'ajout de HRP, les variations d'absorbance sont suivies à  $\lambda = 470$  nm pendant 1 min (spectrophotomètre Uvikon XS, UVK Lab, Trappes, France). La quantification est réalisée par calibration externe en utilisant des solutions standards en  $H_2O_2$  dont les concentrations varient de 0 à 100  $\mu$ M. Ces solutions standards sont préparées extemporanément avant chaque série d'analyse par dilutions successives dans du GYEP. L'absence d'activité peroxydase dans les filtrats est vérifiée en répétant les analyses mais cette fois sans ajouter de HRP. Le seuil de détection/quantification de  $H_2O_2$  dans nos conditions est de 1  $\mu$ M.

## **VI. Mesure des activités enzymatiques catalase (CAT) et superoxyde dismutase (SOD) intracellulaires**

Deux cent cinquante milligrammes de mycélium lyophilisé sont broyés dans 1,75 mL d'une solution tampon (Tris-HCl 0,2 M pH 7,6 ; DTT 0,5 mM ; PVP 10  $\mu$ g/mL; Pefabloc<sup>®</sup> 0,1  $\mu$ L/mL). Après 30 min d'incubation à température ambiante, le mélange est centrifugé 30 min à 4°C et 13000 rpm. Les extraits protéiques (surnageants) sont décolorés avec 50 mg/mL de charbon actif (agitation 2 min et centrifugation 5 min à 7000 rpm et 4°C). La teneur en protéines est quantifiée à l'aide du kit Biorad Protein Assay (Biorad) d'après la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

### **VI.1. Caractérisation des systèmes enzymatiques catalase (CAT)**

#### ***VI.1.a. Dosages de l'activité CAT***

Les niveaux d'activités enzymatique catalase des extraits bruts sont déterminés en utilisant la méthode décrite par (Aebi, 1947). Les mesures ont été réalisées à 27°C. Tous les réactifs provenaient de chez Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA). Un volume de 100



## *Matériels et Méthodes*

---

$\mu\text{L}$  d'extrait brut est mélangé, sous agitation constante, à 5 mL d'une solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM préparée dans une solution de tampon phosphate 0,1 M pH 7. La vitesse de décomposition du peroxyde d'hydrogène est calculée d'après les mesures des concentrations décroissantes en  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\lambda = 246$  nm, une mesure par minute pendant 5 min, étalonnage externe avec des concentrations dans les étalons variant de 0 à 10 mM). L'activité catalase est donnée par la mesure de la pente initiale de la courbe de consommation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Elle est exprimée en micromoles d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommées par minute et par milligramme de mycélium, à 27°C.

L'absence de dégradation non enzymatique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été vérifiée en réalisant les mêmes essais en dénaturant au préalable les extraits bruts 10 min à 80°C.

### *VI.1.b. Composition en isoformes des systèmes enzymatiques CAT*

Les extraits bruts ont été analysés par isoélectrofocalisation (IEF) sur gels de polyacrylamide en gradient de pH (pH 3 à pH 9) à l'aide d'un équipement PhastSystem™ (PhastGel IEF 3-9, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). Les analyses ont été réalisées en accord avec le protocole fournisseur. Pour chaque essai, 4  $\mu\text{L}$  d'extraits sont déposés (environ 6,8  $\mu\text{g}$  de protéines totales).

La détection est réalisée d'après la méthode de Clare, *et al.*, (1984). Après migration, le gel est incubé sous agitation constante pendant 45 min dans une solution de peroxydase de Raifort (5000 U/mL) puis 10 min dans une solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM. Après deux rinçages successifs à l'eau distillée, une solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) à 0,5 mg/mL est utilisée pour la révélation du gel :  $\text{H}_2\text{O}_2$  imprégné dans le gel oxyde le DAB donnant à l'ensemble du gel une teinte orangée à l'exception des positions auxquelles des isoformes de catalase auront migré (la catalase ayant consommé  $\text{H}_2\text{O}_2$  et empêché ponctuellement l'imprégnation du gel).

Les différents réactifs utilisés sont en solutions dans du tampon phosphate 50 mM pH 7.





### **VI.2. Caractérisation des systèmes enzymatiques superoxyde dismutase (SOD)**

La méthode utilisée a été adaptée d'après la méthode de Beauchamps & Fridovitch, (1971). Cette méthode permet la mise en évidence de la présence d'activité de type SOD de façon indirecte :

- L'oxydation de la xanthine par la xanthine oxydase conduit à la formation d'anions superoxydes  $O_2^-$  ;
- Ces anions superoxydes sont responsables de la réduction du NitroBleu Tetrazolium (NBT) en Bleu de Formasan (BF) donnant une teinte bleue au milieu ;
- En présence d'activité SOD les ions  $O_2^-$  sont dismutés en  $H_2O_2$  et le NBT n'est plus réduit en BF, le milieu n'est pas coloré.

Tous les réactifs provenaient de chez Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA). Dix microlitres de xanthine oxydase et 2,4 mL de Réactif Xanthine (Tampon Phosphate 50 mM, DETAPAC 1,33 mM, NitroBleu Tetrazolium 2,24 mM, Xanthine 1,8 mM) sont mis en solution dans 490  $\mu$ L de tampon phosphate 50 mM, pH 7,6. Ce mélange est additionné de 10  $\mu$ L d'extrait brut. Le fonctionnement du système xanthine/xanthine oxydase doit être vérifié avant chaque essai (réactions opérées sans l'ajout d'extrait protéique). L'apparition du BF est suivie 5 min à  $\lambda = 560$  nm. Le niveau d'activité SOD dans chaque essai est exprimé en pourcentage d'inhibition de la réaction de réduction du NBT. Cette activité relative est ensuite convertie en unités SOD par comparaison avec un étalonnage externe réalisé en utilisant une SOD commerciale (Référence Sigma-Aldrich S-8160).



### **VII. Procédures particulières**

#### **VII.1. Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la vitesse de germination des spores et la biosynthèse de DON/ADON par *F. graminearum***

Les incubations d'une heure sont réalisées dans des tubes Falcon stériles fermés par des filtres Wathman<sup>®</sup> N°4 autoclavés (121°C, 21 min). Cinquante millilitres d'eau ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM sont inoculés avec 0,625×10<sup>6</sup> spores puis pré-incubés à 25°C à l'obscurité. Après une heure, 100 mL de GYEP en fioles Erlenmeyer 500 mL sont inoculés avec 1 mL de spores traitées. Les cultures sont placées à 25°C à l'obscurité dans un incubateur Multitron<sup>®</sup> (INFORS AG, Bottmingen, Suisse). Après une heure puis après chaque heure écoulée, 100 macroconidies sont observées par microscopie classique : les spores germées sont dénombrées. Nous considérons une spore comme germée lorsque est visible un tube germinatif de longueur égale à au moins la moitié du diamètre de la spore (Dantigny, *et al.*, 2003).

#### **VII.2. Supplémentation des milieux en composés pro- ou anti-oxydants**

Pour les besoins de nos expériences, nos milieux de cultures GYEP ont parfois été supplémentés avec divers composés (un composé à la fois) : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM (Sigma-Aldrich Co, St Louis, USA), diamide 0,5 mM, methyl viologen 0,01 mM, butylhydroxytoluene (BHT) (INC MP Biomedicals Inc<sup>TM</sup>, Pasadena, USA) ou encore un des acides phénoliques *p*-coumarique, férulique, syringique, caféique ou *p*-hydroxybenzoïque (0,5 mM, Sigma-Aldrich Co, St Louis, USA). Les composés oxydants autres que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que tous les composés anti-oxydants ont été mis en solution dans de l'éthanol absolu ; les cultures témoins associées ont donc été supplémentées en éthanol. Pour chaque essai, les milieux GYEP utilisés dans les cultures traitées sont du même lot que ceux des témoins. Il en est de même pour les inoculums.



### **VII.3. Procédure de détermination des concentrations en acides phénoliques (acides *p*-coumarique, férulique, syringique, caféique ou *p*-hydroxybenzoïque) inhibant 50 % de la croissance de *F. graminearum***

Pour chaque acide phénolique testé, des essais d'inhibition de croissance sont réalisés en boîtes de Pétri standard (diamètre 10 cm) sur milieu PDA supplémenté avec 6 concentrations du composé (de 0 à 6 mM). Les boîtes sont incubées à 25°C, à l'obscurité. Le pourcentage d'envahissement de chaque boîte est mesuré après 5 jours<sup>14</sup>, c'est-à-dire lorsque les boîtes de cultures témoin ont atteint un niveau d'envahissement de 80 %. Le pourcentage d'inhibition de croissance est exprimé en fonction de la concentration en composé supplémenté. Les Concentration Inhibitrices de 50 % de la croissance (CI<sub>50</sub>) sont ensuite calculées pour chaque composé par régression linéaire.

### **VII.4. Supplémentation des milieux avec des produits d'oxydation de l'acide linoléique**

De l'acide linoléique (Sigma-Aldrich Co, St Louis, USA) a été oxydé par la lipoxygénase de soja commerciale de spécificité positionnelle 13 (13-LOX, Sigma-Aldrich Co, St Louis, USA) ou par les lipoxygénases contenues dans un extrait brut de tomates fraîches (spécificité positionnelle 9, notées 9-LOX) (d'après Burow, *et al.*, (1997).

#### ***VII.4.a. Oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase de soja de spécificité positionnelle 13***

Une solution stock d'acide linoléique 5 mM est préparée et conservée à 10°C (en solution dans de l'eau additionné de Tween 20 0,4 %). La 13-LOX est mise en solution

---

<sup>14</sup> Le temps de culture écoulé avant que 80 % de la boîte de Pétri ne soit envahie est souche-dépendant.



## *Matériels et Méthodes*

---

aqueuse tamponnée pH 10,0 (pH ajusté avec KOH 1 N) et 10 % de potassium borate 0,1 M (concentration finale égale à 0,2 mg/mL, conservation à 10°C).

100 mL de la solution stock d'acide linoléique et 400 mL de la solution de 13-LOX sont mélangés 40 min à 21°C sous oxygénation constante. Le pH du mélange est ensuite ajusté à 4,0 avec HCl 5 M. Les produits de la réaction d'oxydation sont extraits avec 2 fois 300 mL de chloroforme/méthanol (2/1, v/v). La fraction chloroforme est évaporée sous vide à l'aide d'un Rotavapor R-200 (Buschi, Suisse). Les extraits secs sont repris avec 10 mL d'hexane et conservés à -80°C en vials parafilmés.

### *VII.4.b. Oxydation de l'acide linoléique par le système lipoxygénasique d'un extrait brut de tomates fraîches (spécificité positionnelle 9)*

250 g de tomates fraîches sont pelées, épépinées et broyées 1 min dans 150 mL de tampon NaOAc 0,5 M à pH 5,5 et 4°C. Une solution d'ammonium linoléate 4 mM (préparée en ajoutant de l'acide linoléique dans NH<sub>4</sub>OH 1 N) est mélangée à la pulpe de tomates de façon à obtenir une concentration finale en ammonium linoléate égale à 1 mM. L'ensemble est agité 40 min à 25°C, sous oxygénation constante. Le mélange est ensuite acidifié à pH 4,0 avec HCl 5 M. Les produits de la réaction d'oxydation sont extraits avec 2 fois 300 mL de chloroforme/méthanol (2/1, v/v). La fraction chloroforme est évaporée sous vide à l'aide d'un Rotavapor R-200 (Buschi, Suisse). Les extraits secs sont repris avec 10 mL d'hexane et conservés à -80°C en vials parafilmés.

### *VII.4.c. Composition des produits d'oxydation de l'acide linoléique par une 13-LOX de soja et les 9-LOX de tomate*

L'analyse est réalisée sur une chaîne HPLC Hewlett-Packard ChemStation Series 1100 couplée à un détecteur à barrette de diodes (DAD). Les hydroperoxydes de l'acide linoléique sont séparés le long d'une colonne Lichrosorb Si60 5 µm, 150 mm × 3.0 mm (Merck) en mode isocratique (hexane/isopropanol/acide acétique, 984/15/1). Le débit





## *Materiels et Méthodes*

---

est fixé à 1 mL/min et le volume d'injection à 5  $\mu$ L. La détection est réalisée à  $\lambda = 234$  nm.

Avant analyse, les extraits sont évaporés puis repris dans la phase mobile. La détection et la quantification des hydroperoxydes 13 et 9 présents dans les produits d'oxydation de l'acide linoléique sont réalisées par étalonnage externe utilisant des composés de référence achetés auprès de TEBU-Bio.

### ***VII.4.d. Supplémentation des milieux***

Les analyses sont réalisées en mini-cultures. Les milieux GYEP sont supplémentés avec 52  $\mu$ L de l'un ou l'autre de ces mélanges de produits d'oxydation. A titre de comparaison, les hydroperoxydes de référence 13 et 9 dérivés de l'acide linoléique (13(S)-HPODE et 9(S)-HPODE, TEBU-Bio) ont également été utilisés pour supplémenter nos cultures en concentration finale égale à 1  $\mu$ M (52  $\mu$ L supplémentés). Pour chaque essai, les milieux GYEP utilisés dans les cultures traitées sont du même lot que ceux des témoins. Il en est de même pour les inoculums. Les solvants de reprise des mélanges de produits d'oxydation et des composés de référence étant respectivement l'hexane et l'éthanol, des cultures témoins additionnées de 52  $\mu$ L d'hexane ou d'éthanol ont été réalisées.

## **VIII. Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des TCTB par *F. graminearum***

Deux techniques complémentaires d'analyse transcriptomique de gènes impliqués dans la biosynthèse des TCTB ont été utilisées.



## *Matériels et Méthodes*

---

La première est une approche globale utilisant des biopuces à ADN<sup>15</sup>. Le but de cette approche est d'identifier un panel large de gènes de *Fusarium* dont les expressions sont significativement modulées par un traitement donné. Le principal avantage de cette technique est qu'il n'est pas nécessaire d'avoir une idée précise des gènes dont les niveaux d'expression sont potentiellement modulés par un traitement donné puisque un nombre élevé de gènes peut être testé en même temps (dans notre cas, 5000 gènes dont la liste complète n'est pas divulgable). Toutefois, si la méthode est puissante, elle manque de précision : en fonction des conditions expérimentales il n'est pas possible de mettre en évidence des variations d'expression génique d'amplitude inférieure à un facteur 2 au minimum. De plus, l'interprétation des résultats est largement dépendante de l'interprétation statistique qui en est faite. Ces points seront détaillés dans nos résultats.

La deuxième approche est une approche plus fine de quantification des variations des niveaux d'expressions de quelques gènes d'intérêt par RT-PCR<sup>16</sup> couplée à une détection par fluorescence en temps réel de l'accumulation des produits d'amplification. Des variations significatives de plus faible intensité dans les niveaux d'expression des gènes peuvent alors être mise en évidence.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé dans le laboratoire de T. Ouellet avec la collaboration de L. Harris<sup>17</sup>.

### **VIII.1. Extraction des ARN<sup>18</sup> totaux**

La réalisation de biopuces nécessite la préparation de quantités importantes en matériel nucléique. La méthode d'extraction sur coussin de césium utilisée permet de travailler sur des quantités allant jusqu'à 1 g de mycélium.

---

<sup>15</sup> Acide désoxyribonucléique

<sup>16</sup> Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (Transcription Inverse – Reaction de Polymérisation en Chaîne)

<sup>17</sup> Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON, CANADA

<sup>18</sup> Acides ribonucléiques

**Tableau 4 : Solutions associées à la méthode d'extraction d'ARNs totaux sur coussin de césium.**

<b>Solution</b>	<b>Composition</b>	
<b>Tampon Acétate de sodium 3 M pH 6,0</b> (Vf = 100 mL)	Acétate de sodium anhydre H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> Ajustement du pH à 6,0 (acide acétique glacial) Ajustement du volume à 100 mL (H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> ) Autoclavage 121°C 20 min	24,6 g 80 mL
<b>Tampon Acétate de sodium 3 M pH 5,2</b> (Vf = 100 mL)	Acétate de sodium anhydre H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> Ajustement du pH à 5,2 (acide acétique glacial) Ajustement du volume à 100 mL (H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> ) Autoclavage 121°C 20 min	24,6 g 80 mL
<b>Tampon de lyse GIT (Guanidine IsoThiocyanate)</b> (Vf = 100 mL)	Guanidine IsoThiocyanate (enzyme grade) H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> Tampon acétate de sodium 3 M pH 6,0 Agitation à chaud (50-60°C) Ajustement du volume à 100 mL (H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> ) Avant utilisation ajouter 835 µL de β-mercaptoethanol ; le tampon est alors à utiliser sous 24 heures	47,26 g 50 mL 835 µL
<b>Tampon chlorure de césium 5,7 M</b> (index de réfraction 1,40) (Vf = 100 mL)	Chlorure de Césium (optical grade) H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> Tampon acétate de sodium 3M pH 6,0 Agitation à chaud (50-60°C) Ajustement du volume à 100 mL (H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> ) Stérilisation sur filtre de porosité 0,22 µm	95,97 g 50 mL 830 µL
<b>Tris-HCl 1 M pH 7,4</b> (Vf = 100 mL)	Tris Base H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> Ajustement du pH à 7,4 (acide chlorhydrique concentré) Ajustement du volume à 100 mL (H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> )	12,1 g 80 mL
<b>EDTA 0,5 M pH 8,0</b> (Vf = 100 mL)	Na <sub>2</sub> EDTA monohydraté H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> Ajustement du pH à 8,0 (NaOH 10 M) Ajustement du volume à 100 mL (H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> )	18,61 g 70 mL
<b>Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 10 %</b> (Vf = 100 mL)	SDS H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> Agitation à chaud (65°C)	10 g 100 mL
<b>Tampon Tris-EDTA-SDS (TES)</b> (Vf = 10 mL)	Tampon Tris-HCl 1 M pH 7,4 (Cf = 10 mM) EDTA 0,5 M pH 8,0 (Cf = 5 mM) SDS 10 % (Cf = 1 %) H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	100 µL 100 µL 1 mL 8,8 mL

## *Matériels et Méthodes*

---

Pour nos essais en RT-PCR avec détection de fluorescence en temps réel, les ARN ont été préparés à partir de 30 mg de mycélium en utilisant le kit commercial SV RNA Total Isolation System (Promega Corporation). A titre de validation des méthodes, des ARN préparés en utilisant la méthode d'extraction sur coussin de césium ont également été utilisés.

### ***VIII.1.a. Extraction sur coussin de césium***

*(mise au point par L. Wang, ECORC, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON)*

Cette procédure nécessite la préparation de diverses solutions dont les compositions sont données dans le tableau 4. Toutes les solutions sont préparées en utilisant de l'eau DEPC 0,1 %.

Un milligramme de mycelium est homogénéisé 2 fois 1 min, à 4°C, dans 10 mL de tampon GIT à l'aide d'un broyeur Polytron<sup>®</sup> (Brinkmann Instruments, Inc.). Après 20 min de centrifugation à 10°C et 6000 rpm, le surnageant est doucement déposé sur 3,3 mL de tampon chlorure de césium 5,7 M. Les ARN sont sédimentés au fond du tube après 23 heures d'ultracentrifugation à 30000 rpm et 20°C (rotor SW40). Les culots sont rincés 2 fois à l'aide de 1 mL d'éthanol 70 % puis repris dans 360 µL de solution de tampon TES. Après 5 à 10 min d'incubation à 4°C, 40 µL de solution de tampon acétate de sodium pH 5,2 et 1 mL d'éthanol absolu glacé sont ajoutés et les acides nucléiques sont précipités 12 heures (temps minimum) à -20°C. Après 30 min de centrifugation à 4°C et 14000 rpm, les culots sont rincés par 200 µL d'éthanol 70 % et centrifugation 15 min à 14000 rpm et 4°C (la procédure est répétée une fois). Les culots sont séchés à l'air libre et à température ambiante quelques minutes avant d'être repris dans 80 µL de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>.

Lorsque les ARN sont destinés à être utilisés pour les analyses de RT-PCR avec détection de fluorescence en temps réel, un traitement DNase est appliqué (kit DNA-free, Ambion, Inc.) : 17 µL de solution d'acides nucléiques sont mélangés avec 2 µL de tampon 10X et 1 µL de DNase 1. Après 30 min d'incubation à 37°C, 4 µL de DNase inactivation agent sont ajoutés et le mélange est laissé 2 min à température ambiante en

**Tableau 5 : Composition du tampon de charge à ARN.**

<b>Solution</b>	<b>Composition</b>	
<b>Tampon de charge pour ARN</b> (Vf = 1,5 mL)	Formamide déionisé	750 µL
	Formaldéhyde	240 µL
	Tampon MOPS/EDTA 10X	150 µL
	Gycérol 50%	200 µL
	Bromure d'Ethidium 10 mg/mL	10 µL
	Bleu de Bromophénol	0,5 mg
<b>Tampon MOPS/EDTA 10X</b>	Acide 3-N-morpholinopropanesulfonique (MOPS)	0,2 M
	Acétate de sodium	50 mM
	EDTA	10 mM
	Ajuster à pH 7,0 et conserver à l'abri de la lumière	

## *Matériels et Méthodes*

---

mélangeant pendant 5 s toutes les 30 s. Après une étape de centrifugation de 1,5 min à 10000 rpm et 4°C, le surnageant contenant les ARN est prêt pour l'étape de transcription inverse.

### ***VIII.1.b. Extraction en utilisant le kit SV RNA Total Isolation System (Promega Corporation)***

Le protocole utilisé a été adapté d'après les indications d'extraction du fournisseur.

Trente milligrammes de mycélium plongés dans 175 µL de tampon de lyse (SV RNA lysis buffer) sont broyés 1,5 min en utilisant un Tissue Lyser<sup>®</sup> (Qiagen) selon les recommandations fournisseur. Les indications du protocole fournisseur (méthode dite « par centrifugation ») ont ensuite été suivies à l'exception de la durée de traitement DNase qui a été doublée (30 min de traitement au lieu de 15 min).

### ***VIII.1.c. Vérification quantitative et qualitative des ARN totaux***

Les solutions finales en ARN totaux sont quantifiées par spectrométrie à  $\lambda = 260$  nm (1 unité d'absorbance équivaut à 40 µg/mL d'ARNs) en utilisant un spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop<sup>®</sup> Technologies). Les ratios  $DO_{260}/DO_{280}$  et  $DO_{260}/DO_{230}$  ont été utilisés comme indicateurs de pureté des extraits (mise en évidence de la présence, respectivement, de protéines et de sels chaotropiques). La qualité des ARN est finalement visualisée après migration de 1 µL d'échantillon sur gel d'agarose 1,2 % en conditions dénaturantes (5 µL de tampon de charge pour ARN<sup>19</sup>, dénaturation finale par chauffage à 65°C pendant 5 min).

Les ARN sont utilisés le jour même dans les expériences de transcription reverse afin de limiter le nombre de phases successives de congélation/décongélation auxquelles les ARN sont sensibles. Ce qui n'est pas utilisé est stocké immédiatement à -80°C.

---

<sup>19</sup> Composition donnée dans le tableau 5.





### **VIII.2. Analyses par RT-PCR avec détection de fluorescence en temps réel (Real-Time RT-PCR)**

#### ***VIII.2.a. Préparation des ADNc<sup>20</sup> (transcription inverse)***

Les transcriptions inverses ont été réalisées avec 5 µg d'ARNs totaux en utilisant le kit Superscript<sup>TM</sup> II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies). Le protocole recommandé par le fournisseur avec utilisation d'oligodT<sub>18</sub> pour amorcer les réactions de transcriptions inverses a été suivi. Les ADNc ainsi préparés sont prêts pour les analyses de PCR avec détection de fluorescence en temps réel.

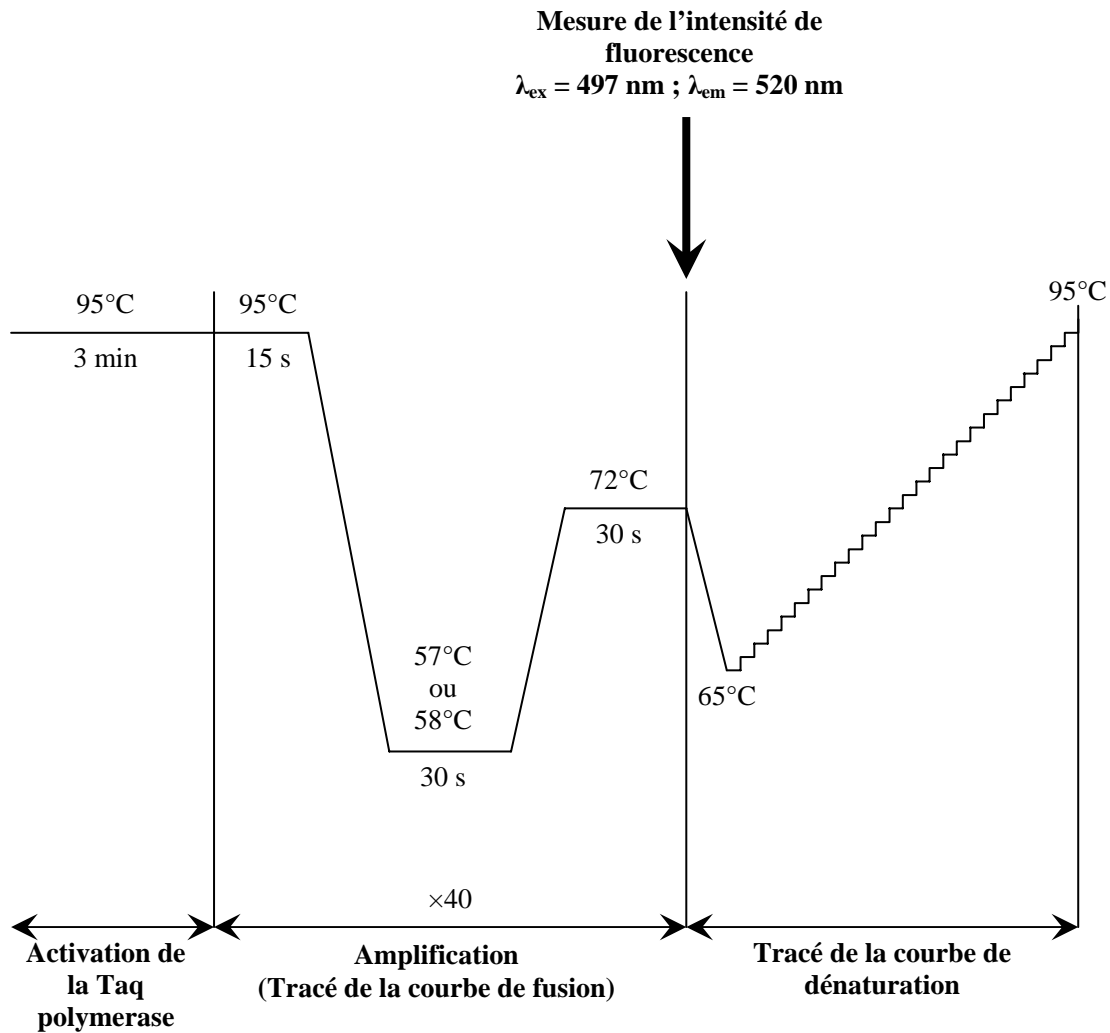
#### ***VIII.2.b. Amorces utilisées pour amplifier les gènes $\beta$ -tub, Tri4, Tri5, Tri6, Tri10, Tri12 et Tri101***

Les amorces utilisées pour amplifier les gènes *Tri10* et *Tri101* ainsi que l'amorce sens pour l'amplification de *Tri6* (*Tri6-F*) ont été dessinées avec Primer Select Suite de la suite logicielle Lasergene V6.0 (DNASTAR, Inc) et synthétisées par Sigma Genosys (Oakville (ON) Canada). Les amorces utilisées pour amplifier les gènes  $\beta$ -tub (codant la  $\beta$ -tubuline), *Tri5* et *Tri12* ainsi que l'amorce anti-sens pour l'amplification de *Tri6* ont été fournies par L. Pinson-Gadais (INRA, MycSA, Villenave d'Ornon, France). Les amorces permettant l'amplification du gène *Tri4* ont été fournies par A. Saparno (Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa (ON), CANADA).

-  $\beta$ -tub : *Btub-F* (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') et *Btub-R* (5'-GATTGACCGAAAACGAAGTTG-3'), température d'hybridation utilisée égale à 57°C (Doohan, *et al.*, 1999) ;

---

<sup>20</sup> ADN clones des ARN messagers.



**Figure 13 : Programme d'amplification.**

La *Taq* polymerase est activée après 3 minutes à 95°C. L'amplification de la cible est réalisée en 40 cycles avec mesure de l'intensité de fluorescence à la fin de chaque cycle. Une fois les 40 cycles d'amplification accomplis, la courbe de dénaturation est tracée en faisant varier la température de 65°C à 95°C par paliers de 0,5°C (maintenus une seconde) avec mesure de l'intensité de fluorescence à la fin de chaque palier.

## *Materiels et Méthodes*

---

- *Tri4* : Tri4-F (5'-TATTGTTGGCTACCCCAAGG-3') et Tri4-R (5'-TGTCAGATGCGCCTTACAAA-3'), température d'hybridation utilisée égale à 58°C ;
- *Tri5* : Tox5-1 (5'-GCTGCTCATCACTTTGCTCAG-3') et Tox5-2 (5'-CTGATCTGGTCACGCTCATC-3'), température d'hybridation utilisée égale à 57°C (Niessen & Vogel, 1998) ;
- *Tri6* : Tri6-F (5'-AGCGCCTTGCCCCTCTTTG-3') et Tri6-R (5'-AGCCTTTGGTGCCGACTTCTTG-3'), température d'hybridation utilisée égale à 58°C;
- *Tri10* : Tri10-F (5'-TCTGAACAGGCGATGGTATGGA-3') et Tri10-R (5'-CTGCGGCGAGTGAGTTTGACA-3'), température d'hybridation utilisée égale à 58°C;
- *Tri12* : Tri12-F (5'-CGTACCTCGCAGGGCTGAAGTC-3') et Tri12-R (5'-TCCATAGTGGGCGCGATGAATC-3'), température d'hybridation utilisée égale à 57°C;
- *Tri 101* : Tri101-F (5'-AGGCATTAGCGAGGGAAACACA-3') et Tri101-R (5'-ACGGCACGCCTTGGAGAGCAGAC-3'), température d'hybridation utilisée égale à 58°C.

### ***VIII.2.c. Analyses PCR avec détection de fluorescence (SYBR<sup>®</sup> Green) en temps réel***

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume réactionnel final égal à 25 µL contenant 0,6 µL de solution d'ADNc, 400 nM de chacune des amorces sens et anti-sens du gène à amplifier, et 12,5 µL de iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Le iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix contient tous les sels, les dNTPs, le fluorophore SYBR<sup>®</sup> Green I ainsi que l'enzyme iTaq Polymerase (enzyme « hot start » dont le site actif est rendu accessible après 3 minutes d'incubation à 95°C)<sup>21</sup>. Les analyses sont réalisées dans des plaques MJ Clear 96 puits fermées par des capuchons plats transparents (catégorie qualité optique, Bio-Rad Laboratories) sur un thermocycleur couplé à un système optique de détection de fluorescence Chromo4 (MJ Research, Inc). Le programme d'amplification utilisé est décrit sur la figure 13.

---

<sup>21</sup> Détails de la composition du supermix donnés en annexe 1.

**Tableau 6 : Solutions utilisées dans la procédure de réalisation des biopuces.**

<b>Solution</b>	<b>Composition</b>	
<b>Tampon phosphate 1 M</b> (Vf = 10 mL)	Préparer une solution de $K_2HPO_4$ 1 M (solution A) et une solution de $KH_2PO_4$ (solution B) ; Combiner 9,5 mL de solution A et 0,5 mL de solution B	
<b>Tampon phosphate de lavage</b> (Vf = 100 mL)	Tampon phosphate 1 M	0,5 mL
	Ethanol 95 %	84,25 mL
	$H_2O_{DEPC}$	15,25 mL
<b>Solution de dNTPs 50X</b> <b>(4:1 aminoallyl-dUTP:dTTP)</b> (Vf = 20 $\mu$ L)	dATP (invitrogen Life Sciences)	25 mM
	dCTP (invitrogen Life Sciences)	25 mM
	dGTP (invitrogen Life Sciences)	25 mM
	dTTP (invitrogen Life Sciences)	5 mM
	aminoallyl-dUTP (Sigma-Aldrich Co.)	20 mM
	<i>(les dNTPs sont en solution dans du tampon phosphate 0,1 M)</i>	
<b>Tampon carbonate de sodium</b> <b>0,1 M pH 9,0</b> (durée de vie de une à quatre semaines)	$NaCO_3$	5,4 g
	$H_2O_{DEPC}$	40 mL
	Ajustement du pH avec 12 N HCl	
	Ajustement du volume à 50 mL avec $H_2O_{DEPC}$	
	Diluer au 1/10 avec $H_2O_{DEPC}$	
<b>Solution d'hybridation</b> (Vf = 65 $\mu$ L)	ADN de contrôle simple brin (Sigma-Aldrich Co)	20 $\mu$ g
	ARNt de levure (Invitrogen Life Sciences)	20 $\mu$ g
	DIG Easy Hyb Buffer (Roche)	61 $\mu$ L

## *Matériels et Méthodes*

---

A la fin des essais, les qualités des analyses (absence de produit d'amplification aspécifique) sont vérifiées, tout d'abord en utilisant les courbes d'augmentation de l'intensité de fluorescence (IF) en fonction du nombre de cycles de PCR réalisés (IF = f(nombre de cycles) ; courbes d'amplification) et en comparant celles obtenues dans les échantillons testés et celle de témoins négatifs (mélange réactionnel sans ADNc matrice). Ensuite, en fin d'analyse, l'examen des courbes de diminution de l'intensité de fluorescence en fonction de la température appliquée (IF = f(température) ; courbes de fusion) renseigne quant à l'éventuelle présence de produits d'amplification inattendus. Enfin, les produits de PCR sont visualisés sur gels d'agarose 1,5 % (45 min à 100V).

Les courbes d'amplification sont analysées en utilisant le logiciel Opticon Monitor 2 v2.03 (MJ Research, Inc). Les valeurs sont ensuite exportées vers le logiciel REST<sup>®</sup> (Pfaffl, 2001, Pfaffl, *et al.*, 2002), à l'aide duquel les efficacités de PCR sont déterminées et les résultats analysés.

### **VIII.3. Analyses par biopuces**

*(Adapté par S. Kelso et D. Sprott, Agriculture et Agri-Food Canada, Ottawa (ON) CANADA, d'après le protocole de J. Hasseman, The Institute for Genomic Research)*

Les compositions des solutions utilisées dans cette procédure sont données dans le tableau 6. Toutes les solutions sont préparées en utilisant de l'eau DEPC 0,1 %.

Le principe de cette procédure est de marquer les ADNc, retro-transcrits à partir des ARN totaux préparés en utilisant la méthode d'extraction sur coussin de césium, avec des colorants fluorescents Cyanine3 (Cy3,  $\lambda_{\max} = 550$  nm, Amersham Biosciences) et Cyanine5 (Cy5,  $\lambda_{\max} = 650$  nm, Amersham Biosciences).

Un mode indirect de marquage est utilisé. Les ARN sont d'abord rétro transcrits avec incorporation de dUTP aminoallylés en remplacement de 80 % des dTTPs classiquement utilisés lors de réactions de transcription inverse. Dans un deuxième temps, une réaction d'estérification entre ces groupements aminoallyls et Cy3 ou Cy5 est catalysée par une solution tampon de carbonate de sodium 0,1 M. L'incorporation directe de dUTP couplés avec Cy3 ou Cy5 est possible mais représente une source



## *Matériels et Méthodes*

---

d'erreur importante en raison de l'encombrement stérique de Cy5 supérieur à celui de Cy3, ce qui est susceptible de diminuer l'efficacité de marquage à cause d'un taux d'incorporation défavorable au cours de la réaction de transcription inverse. Ainsi, des échantillons couplés avec Cy3 ont une meilleure efficacité de transcription inverse que d'autres marqués avec Cy5, ce qui empêche toute comparaison entre eux. Ce biais n'existe pas en méthode indirecte puisque la transcription inverse a lieu en l'absence des colorants cyanine.

Une fois que les échantillons sont marqués, ils sont hybridés par paires, un échantillon traité et un non-traité, chacun marqué avec un colorant différent, sur une des biopuces à *F. graminearum*<sup>22</sup>. La résultante colorée des hybridations des échantillons traités et non-traités en situation de compétition est le reflet de l'abondance relative d'un type d'ADNc (expression d'un gène donné) issu de l'échantillon traité en comparaison avec les quantités du même ADNc présentes dans l'échantillon non-traité.

### ***VIII.3.a. Préparation d'ADNc marqués avec Cy3 et Cy5***

#### ***Transcription inverse avec incorporation de dUTPs aminoallylés***

Les transcriptions inverses ont été réalisées sur 20 µg d'ARN totaux et 2 ng d'un ARN de contrôle commercial<sup>23</sup>, en présence de 20U de RNase inhibitor (Fermentas Life Sciences) et de 1,5 µL d'une solution à 100 µM d'oligodT(T<sub>20</sub>VN) ancrés (Invitrogen Life Technologies) (H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> qsp 21 µL). Après 10 min de dénaturation de ce mélange à 70°C, les tubes sont placés dans la glace une minute au moins et 12,6 µL du mélange maître de la réaction de PCR sont ajoutés à chaque tube (par tube : 3 µL de DTT 0,1 M, 0,6 µL du mélange de dNTPs 50X, 1 µL de MnCl<sub>2</sub> 80 mM, 400U de transcriptase inverse Superscript<sup>TM</sup> II dans 6 µL de son tampon 5X, Invitrogen Life Sciences). L'ensemble est incubé 1 heure à 42°C. A l'issue de cette première incubation, 400U de Superscript<sup>TM</sup> II sont ajoutées dans chacun des tubes pour une nouvelle

---

<sup>22</sup> Puces à ADN de *F. graminearum* sur lesquelles sont fixés des fragments d'ADNc représentant environ 5000 des gènes du champignon.

<sup>23</sup> ARN transcrit *in vitro* dérivé de clones de gènes humains commercialisé par l'Université de l'Etat du Michigan ([http://seeds.nottingham.ac.uk/Nasc/browse/control/Clone\\_Information\\_NASC.pdf](http://seeds.nottingham.ac.uk/Nasc/browse/control/Clone_Information_NASC.pdf))





## *Matériels et Méthodes*

---

incubation d'une heure à 42°C. La réaction est ensuite arrêtée à 4°C en ajoutant 10 µL d'EDTA 0,5 M pH 8,0 et 10 µL de NaOH 1 N. Les tubes sont alors incubés 15 min à 70 °C puis de nouveau placés à 4°C. Les ADNc sont ensuite précipités overnight à -20°C après l'ajout de 10 µL de HCl 1,4 M et 70 µL d'isopropanol. Après une étape de centrifugation de 30 min à 4°C et 14000 rpm, les culots sont rincés avec 200 µL d'ethanol 70 % puis centrifugés de nouveau à 4°C et 14000 rpm pendant 15 min. Les culots sont repris dans 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>. La réussite de la réaction de transcription inverse est vérifiée en quantifiant la présence d'ADNc dans les échantillons par spectrométrie à  $\lambda = 260$  nm (1 unité d'absorbance équivaut à 37 ng/µL d'ADN simple brin) en utilisant un spectrophotomètre ND1000 (NanoDrop® Technologies).

### *Couplage des fluorophores Cy3 et Cy5*

Les fluorophores sont achetés auprès de Amersham Biosciences : un pack contient 5 tubes de chacun des colorants sous forme d'un culot sec (quantité suffisante pour marquer 1 mg de produit) à reprendre dans 75 µL de DMSO<sup>24</sup>.

Les ADNc sont séchés au Speed Vac' (Savant) pendant 45 à 60 min. Au cours des 10 dernières minutes de séchage, sont ajoutés dans chaque tube 4,5 µL de solution de Cy3 ou Cy5. Les culots sont repris dans 9 µL de carbonate de sodium 0,1 M pH 9,0 et incubés 1 heure à température ambiante dans une totale obscurité. Cette étape permet le couplage du fluorophore sur les ADNc par réaction d'estérification catalysée par le carbonate de sodium.

*Les ADNc marqués sont ensuite purifiés en utilisant un kit QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen).*

Cinq microlitres d'acide acétique 5 M sont ajoutés dans chaque tube. Les échantillons sont ensuite placés à 4°C ; 250 µL de « Qiagen PB Buffer » sont ajoutés et le mélange est déposé sur la membrane d'une colonne « Qiagen PCR Purification Column ». Après 1 min de centrifugation à 14000 rpm, l'éluât est re-déposé sur la membrane pour une nouvelle étape de centrifugation à 14000 rpm pendant 1 min. La

---

<sup>24</sup> Dimethylsulfoxyde



## *Matériels et Méthodes*

---

membrane est ensuite rincée par 750  $\mu$ L de « Wash Buffer PE » avec centrifugation 1 min à 14000 rpm (rinçage répété une fois). L'éluât est éliminé et les dernières traces de solutions tampon sont éliminées par une centrifugation finale à 14000 rpm pendant 1 min. Les produits sont ensuite élués par 50  $\mu$ L de tampon d'éluion « Elution Buffer EB » déposés sur la membrane, incubés 1 min dans le noir puis centrifugés 1 min à 14000 rpm (éluion répétée une fois). L'efficacité de la réaction de couplage est évaluée après mesure de l'intensité des fluorescences dans les tubes par spectrométrie à  $\lambda = 550$  nm (Cy3) ou  $\lambda = 650$  nm (Cy5) en utilisant le Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000.

Les paires d'échantillons d'ADNc marqués<sup>25</sup> sont rassemblées chacune dans un tube unique. L'ensemble des tubes est ensuite séché au Speed Vac' pendant 45-60 min. Les ADNc restent ainsi stables jusqu'à un mois si conservés à -80°C.

### *VIII.3.b. Hybridation/scanning des lames*

Les ADNc marqués et séchés sont repris avec 65  $\mu$ L de solution d'hybridation puis dénaturés 2 minutes à 70°C dans le noir. Le mélange est ensuite immédiatement déposé sur une lamelle sur laquelle la biopuce est ensuite doucement placée. La lame est ensuite incubée dans une boîte à hybridations opaque et étanche placée à 37°C pendant 8 à 18 heures. A l'issue de ce délai, les lamelles sont retirées des biopuces par trempage doux mais rapide dans du tampon 1X SSC<sup>26</sup> à 50°C. Les biopuces sont ensuite lavées 15 min à 50°C sous agitation douce dans un bain constitué de SSC 1X additionné de SDS 0,1 % (lavage répété 2 fois). Un dernier rinçage de 5 à 10 min est réalisé dans du tampon SSC 1X. La lame est ensuite séchée (à l'abri de la lumière) par centrifugation 5 min à 1000 rpm. L'acquisition des images est immédiatement réalisée à l'aide d'un scanner Packard ScanArray 3000 (Perkin Elmer).

---

<sup>25</sup> Une paire est constituée d'un échantillon traité et de son témoin, l'un marqué avec Cy3 l'autre avec Cy5 ; une paire est destinée à être hybridée sur une puce

<sup>26</sup> Tampon Sodium Citrate 0,3 M pH 7,0 et Chlorure de Sodium 3 M



### *VIII.3.c. Traitement des résultats*

Les images sont analysées à l'aide du logiciel GenePix Pro 5.1 (Molecular Devices). Les résultats sont normalisés et traités avec le logiciel Acuity 4.0 (Molecular Devices).



***Chapitre 1 : Mise en Place de  
Méthodes et Procédures  
Expérimentales***





### **I. Analyse des trichothécènes de type B**

Une technique classiquement utilisée pour la détection et le dosage des TCTB repose sur une méthode d'analyse par GC-ECD<sup>27</sup> (Bakan, 1998). Cette méthode est très spécifique et très sensible. Les limites de quantification (LQ) sur matrice céréalières sont de l'ordre de 20 ppb pour le DON (même LQ pour ses formes 3- et 15-acétylées) et de 40 ppb pour le NIV. Cependant, cette technique présente des désavantages. Tout d'abord, la zone de linéarité ne concerne que de faibles teneurs en toxines. En condition standard, au-delà de 100 ng injectés par toxine, le détecteur sature. L'analyse d'échantillons concentrés nécessite de nombreuses dilutions qui peuvent alors être sources d'erreurs. Or, la souche modèle de *Fusarium* principalement utilisée dans nos travaux a été choisie pour son aptitude à produire de grandes quantités de toxines. Il était donc nécessaire d'utiliser une technique au domaine d'application plus adapté. Ensuite, les TCTB n'étant pas volatils, la préparation des échantillons comprend une délicate - et coûteuse - étape de dérivation par silylation (Rizzo & Saari, 1986). La qualité du dosage chromatographique dépend très largement de cette étape dont la réussite est variable, notamment en fonction de l'expérimentateur et de la qualité de l'agent dérivant. Il était ainsi souhaitable d'utiliser une technique plus robuste. Enfin, les TCTB dérivés ont une durée de vie n'excédant pas 48 heures : l'analyse doit donc être très rapidement réalisée et peu d'échantillons peuvent être traités à la fois, ce qui représente un lourd handicap pour la réalisation d'expériences dans des conditions de répétabilité et de reproductibilité satisfaisantes.

La littérature est riche en méthodes chromatographiques de dosage du DON et de ses dérivés, essentiellement GC ou HPLC couplées à des techniques de détection spectrométrique (UV, fluorescence, de masse) ou comme décrit précédemment en utilisant un ECD. Des campagnes internationales inter-laboratoires ont évalué plusieurs de ces méthodes, en particulier dans le cas de la détermination du DON dans le blé et le maïs (Pettersson, 1998, Josephs, *et al.*, 2001). Ces études ont révélé d'une part l'existence d'un « effet matrice » conduisant fréquemment à une sur-estimation du

---

<sup>27</sup> Chromatographie gazeuse (Gaz Chromatography, GC) couplée à une détection par capture d'électrons (Electron Capture Detector, ECD).



niveau de contamination en DON lors d'analyses en chromatographie en phase gazeuse ; d'autre part, elles concluent toutes à l'insuffisance des techniques en termes de précision et de comparabilité et à un réel besoin d'améliorer les performances des méthodes de détermination des teneurs en DON.

De plus en plus, les techniques HPLC en phase inverse sont largement développées. La détection par fluorescence précédée d'une étape de dérivation est parfois utilisée (Mateo, *et al.*, 2001, Mateo, *et al.*, 2002, Dall'Asta, *et al.*, 2004, Klötzel, *et al.*, 2005). Il est également possible de détecter les TCTB par spectrométrie UV (Josephs, *et al.*, 1998). Enfin, la détection par spectrométrie de masse (MS) s'est largement développée pour ses performances lors d'analyses multi-résidus (Berger, *et al.*, 1999, Razzazi-Fazeli, *et al.*, 1999, Bily, *et al.*, 2004) mais aussi grâce à la démocratisation des détecteurs MS au sein des laboratoires.

### **I.1. Méthode alternative : chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-DAD)**

Au regard du matériel disponible au laboratoire, nous avons décidé d'utiliser une méthode d'analyse par HPLC-UV – chaîne HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector, DAD) – dérivée d'une technique HPLC-MS développée par Bily A. (Communication personnelle, 2002 ; méthode publiée depuis, voir Bily *et al.*, 2004). La possibilité de relier en série plusieurs détecteurs sur une même chaîne HPLC permet l'analyse simultanée par fluorescence de la zéaralénone dont la co-présence est parfois rapportée sur échantillons naturellement contaminés par *Fusarium* (Drochner & Lauber, 2001). La séparation est réalisée le long d'une colonne Zorbax® Eclipse XBD-C8 (Agilent) en présence d'un gradient d'acétonitrile (voir matériel et méthodes). Les TCTB sont détectés à  $\lambda = 220$  nm (maximum absolu du spectre d'absorption), 230 nm et 280 nm, la quantification étant réalisée à  $\lambda = 230$  nm – c'est-à-dire une longueur d'onde peu spécifique – ce qui implique la présence potentielle d'un bruit de fond très important qui ne peut être éliminé que par une purification efficace de l'échantillon avant injection. La co-présence de zéaralénone dans les échantillons est détectée par fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 275$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 450$  nm).

**Tableau 7 : Temps de rétention et valeurs de référence de la méthode d'analyse des TCTB par HPLC-UV.**

	<b>DON</b>	<b>3ADON</b>	<b>15ADON</b>	<b>NIV</b>	<b>FX</b>
<b>Temps de rétention (min)</b>	6,3	12,1	11,9	4,4	8,8
<b>Coefficients de réponse à <math>\lambda = 230</math> nm</b>	0,19	0,21	0,21	0,24	0,22
<b>Coefficient de variation (%)</b>	<b>1,7</b>	<b>1,8</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>	<b>1,7</b>
<b>LD GYEP (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,5	0,6	0,6	0,8	0,7
<b>LD blé (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3

**Tableau 8 : Coefficients de récupération (en pourcentage) des TCTB en fonction de la méthode préparative et de la toxine considérées.**

	<b>DON</b>	<b>ADON</b>	<b>NIV</b>	<b>FX</b>
<b>Extraction à l'acétate d'éthyle</b>	<b>56</b>	<b>84</b>	15	<b>94</b>
<b>Extraction/purification par SPE</b>	73	67	84	76
<b>Injection directe</b>	52	73	<b>67</b>	73

## ***Chapitre 1 : Mise en Place de Méthodes et Procédures Expérimentales***

---

Il est à noter que, lors de nos premiers tests, les échantillons étaient classiquement repris avant analyse dans un mélange acétonitrile/eau<sup>28</sup>. La reprise des échantillons dans de l'acétonitrile avant analyse a été préconisé par Bakan (1998) puisqu'en analyse, le bruit de fond dû au solvant est inférieur à celui obtenu en utilisant du méthanol. Dans ces conditions de reprise, nous avons observé un dédoublement systématique des pics. Le problème a été résolu en remplaçant l'acétonitrile par du méthanol (en accord avec les conclusions de Hastings & Stenroos, 1995).

Les temps de rétention ainsi que les autres valeurs de référence obtenues sont rapportées dans le tableau 7.

La répétabilité de la méthode HPLC a été testée (10 injections successives d'un même échantillon) : les coefficients de variation obtenus en considérant le DON et ses formes acétylées sont inférieurs à 2 %, ce qui est une valeur de qualité classiquement attendue en analyse par HPLC. A notre connaissance, la répétabilité de l'analyse par GC-ECD n'a pas été véritablement testée. Selon Bakan (1998), des coefficients de variation inférieurs à 10 % seraient obtenus lors d'extractions de TCTB sur matrice liquide.

La zone de linéarité de la méthode HPLC s'étend jusqu'à 15 µg injectés par toxine, ce qui est plus élevé que la limite supérieure de linéarité de la méthode d'analyse par GC-ECD (100 ng injectés par toxine). Cette limite est adaptée aux quantifications des productions en toxines par notre souche modèle *F. graminearum* CBS185.32 au potentiel de production en DON/ADON élevé.

Des Limites de Détection et de Quantification (respectivement LD et LQ) ont été établies sur la base  $LD = \text{bruit} \times 3$  et  $LQ = LD \times 2$ . Elles sont donc directement liées à la nature même de la matrice analysée (type de tissu, milieu liquide etc.) ainsi qu'aux efficacités des méthodes de purification à disposition. Les valeurs rapportées dans le tableau 8 ont été déterminées en considérant les méthodes classiques d'extraction/purification des TCTB (voir matériel et méthodes). Il est remarquable que l'analyse des niveaux de contamination de grains de céréales donne de bons résultats grâce à une méthode de purification des échantillons par SPE<sup>29</sup> éliminant efficacement

---

<sup>28</sup> Classiquement, en HPLC les échantillons à analyser sont en solution dans une phase identique à la phase mobile pour assurer une miscibilité maximum et limiter la présence de pics de solvant en début de chromatogramme.

<sup>29</sup> Solid Phase Extraction (Extraction sur Phase Solide)



le bruit de fond (utilisation de colonnes commerciales de « clean up » de type charbon alumine, colonnes P51, R-Biopharm, Rhône Diagnostics). Les LD obtenues en analyses d'échantillons céréaliers par HPLC-UV sont supérieures à celles obtenues par GC-ECD (de 5 à 15 fois plus élevées). L'analyse d'échantillons très faiblement contaminés n'est donc pas permise par HPLC-UV. Ceci est encore plus vrai sur matrice liquide GYEP où les LD déterminées sont encore 2,5 à 4 fois supérieures à celles établies sur blé. La cause en est identifiée : le bruit de fond obtenu lors d'analyses de certains échantillons est important. Le GYEP étant notre milieu de référence, une attention toute particulière a été portée sur les méthodes de préparation des échantillons avant analyse par HPLC.

### **I.2. De l'extraction/purification des TCTB sur matrice liquide GYEP**

La méthode d'extraction utilisée en routine au sein du laboratoire (extraction simple à l'acétate d'éthyle, d'après Bakan 1998) ne permet pas d'éliminer le bruit de fond élevé lié au milieu GYEP observé sur les chromatogrammes HPLC. De plus, cette méthode s'avère être insuffisante en terme d'efficacité d'extraction du NIV avec un taux de récupération de seulement 15 % (Ponts, 2002). L'efficacité d'extraction du DON est, quant à elle, faible avec un taux de récupération de l'ordre de 60 %. Pour pallier à ces insuffisances, une méthode d'extraction/purification simple et efficace pour l'extraction sur des échantillons biologiques liquides a été adaptée pour être applicable sur GYEP (Razzazi-Fazeli, *et al.*, 2003) ; des essais d'analyse HPLC par injection directe de l'échantillon ont également été réalisés.

#### ***I.2.a. Extraction/purification par SPE sur GYEP***

La méthode de purification des TCTB sur échantillons céréaliers a été adaptée pour nos matrices aqueuses (Razzazi-Fazeli, *et al.*, 2003) : les échantillons sont d'abord extraits avec de l'acétonitrile (84 mL d'acétonitrile pour 16 mL de GYEP) avant d'être purifiés sur colonnes R-Biopharm P51 (voir matériel et méthodes). Les taux de récupération du DON et du NIV sont alors respectivement de 73 % et 84 %, ce qui est





satisfaisant. Toutefois, l'utilisation de ces colonnes est extrêmement coûteuse – une colonne à usage unique coûte environ 10 € – rendant difficile l'application de cette méthode sur un grand nombre d'échantillons. Dès lors, elle sera réservée à certaines analyses, recherches précises de DON et/ou de NIV, limitées en nombre d'échantillons.

### ***1.2.b. Injection directe***

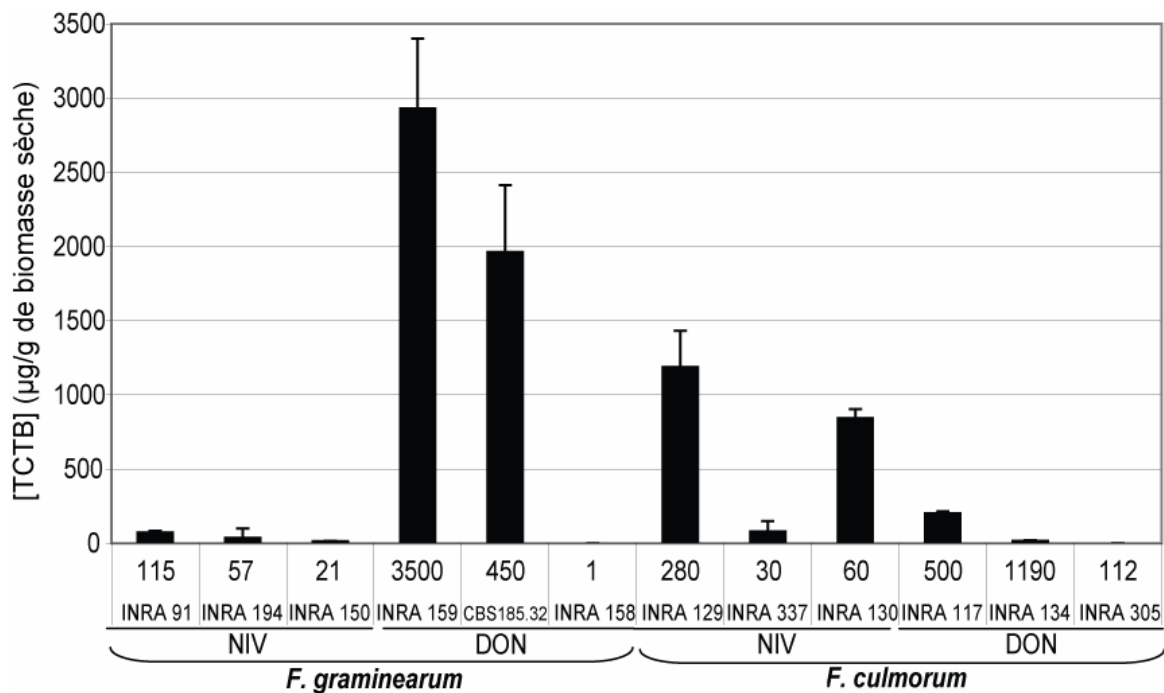
L'analyse par HPLC offre la possibilité d'injecter directement l'échantillon après dilution dans du méthanol (50 %, v/v), c'est-à-dire sans aucune extraction préalable. Cette méthode offre alors un bon compromis pour l'ensemble des TCTB avec un taux de récupération devenu significatif pour le NIV (67 %) sans que les taux obtenus pour les autres toxines ne soient significativement affectés.

L'avantage de cette méthode réside en sa simplicité et sa rapidité d'exécution. Elle reste utilisable à grande échelle pour le dosage de NIV/FX. Cependant, l'échantillon n'étant ni concentré ni débarrassé du bruit de fond, elle est non adaptée pour la quantification de faibles teneurs en toxines et reste réservée à l'analyse d'échantillons fortement contaminés (contamination > 1 ppm<sup>30</sup>).

Les coefficients de récupération obtenus pour chacune des toxines, selon la méthode considérée, sont synthétisés dans le tableau 8. Nous avons choisi de conserver la méthode habituelle d'extraction à l'acétate d'éthyle pour les dosages routiniers du DON et de ses formes acétylées, malgré une sous-estimation des quantités de DON présentes dans les milieux. La méthode par injection directe est alors destinée aux dosages du NIV et de la FX, et seuls les échantillons contaminés avec plus de 1 ppm de toxines peuvent être considérés comme significatifs. En cas de nécessité de dosage précis d'aliqotes plus faiblement chargés en TCTB, la méthode de purification par SPE peut être appliquée.

---

<sup>30</sup> Partie par million = mg/kg ; ppb = partie par billion = µg/kg



**Figure 14 : Productions en TCTB par 12 souches de *Fusarium spp. graminearum* et *culmorum* en mini-cultures GYEP de 10 jours.**

Les valeurs « NIV » et « DON » indiquent le chemotype de la souche considérée. Les valeurs numériques indiquées au-dessus des noms des souches indiquent les potentiels de production de TCTB de référence (en ppm, selon notre méthode de détermination décrite en matériel et méthodes).

## **II. Variabilité des niveaux de production de TCTB par *Fusarium* en cultures liquides**

Le milieu GYEP a été décrit comme étant optimal pour la production *in vitro* de mycotoxines par *Fusarium spp.* (Miller, *et al.*, 1983, Bakan, 1998) et a donc été utilisé comme milieu de référence pour l'ensemble de nos travaux. Toutefois, plusieurs essais ont montré qu'en fonction du lot d'extrait de levure utilisé les niveaux de production de toxines peuvent varier de façon importante (Miller & Young, 1985). Ainsi, le même lot d'extrait de levure a été utilisé pour toutes nos expériences. Un milieu synthétique MSM (« Milieu Synthétique Mycotoxines ») minimum s'affranchissant des problèmes de variabilité de la composition de l'extrait de levure est en cours d'optimisation au laboratoire (Boutigny, 2004, communication personnelle).

### **II.1. Expression variable du potentiel toxigène selon le mode de culture (milieu et procédure)**

Nous avons abordé en introduction la notion de potentiel toxigène. Ce potentiel peut être considéré comme une caractéristique d'une souche de *Fusarium*. Il est défini par la capacité du champignon, qualitative (chemotype DON ou NIV) et quantitative, à produire des mycotoxines. Le potentiel toxigène d'une souche a été arbitrairement défini par la teneur en toxines de grains stériles inoculés *in vitro* et placés à 25°C pendant 21 jours (matériel et méthodes). Nous avons voulu évaluer le niveau d'expression de ce potentiel toxigène en fonction du mode de culture.

Un « screening » d'une douzaine de souches – 6 *F. graminearum* et 6 *F. culmorum* (chemotypes DON et NIV également représentés pour chaque espèce) – a été réalisé en mini-cultures GYEP. Parmi ces 12 souches, la souche *F. graminearum* CBS185.32 est utilisée comme référentiel (souche modèle de chemotype DON traditionnellement utilisée au laboratoire et majoritairement utilisée pour l'ensemble de nos travaux). La figure 14 présente les niveaux de productions de toxines mesurés dans



les filtrats des milieux de culture et met en évidence l'absence de cohérence entre potentiel toxinogène et production de toxines *in vitro*. A titre d'exemple, les souches INRA 117 et CBS185.32 ont des potentiels de production de TCTB semblables – de l'ordre de 500 ppm – mais produisent des niveaux de toxines très différents en milieu GYEP, la souche CBS185.32 étant bien meilleure productrice de DON/ADON (environ 10 fois plus) que la souche INRA 117. Globalement, des souches avec des potentiels toxinogènes élevés peuvent ne produire que de faibles quantités en milieu GYEP (INRA 91, INRA 134, INRA 305). La réciproque n'est pas vraie : il n'a jamais été observé qu'une souche définie comme peu productrice de TCTB (*e.g.* INRA 158) produise des toxines en quantités importantes. La même observation a été réalisée en mini-cultures MSM (Boutigny, 2005, communication personnelle). En mini-cultures MSM, la souche CBS185.32 devient hyper-productrice de TCTB avec des niveaux de toxines 20 fois plus élevés qu'en GYEP. En revanche, la souche INRA 129 présentant un bon niveau de production de toxines en milieu GYEP ne s'est pas développée en milieu MSM. Enfin, la souche INRA 305 n'ayant pas produit de toxine sur GYEP a produit 4500 ppm de TCTB sur MSM (données non présentées).

Ces expériences démontrent de façon très claire l'extrême variabilité biologique des souches de *Fusarium spp. graminearum* et *culmorum*, en fonction du mode de culture. Ce phénomène a par ailleurs été observé par d'autres auteurs (Megalla, *et al.*, 1986). Une souche modèle « idéale » pourrait alors être une souche dont les productions en toxines sont cohérentes entre différents milieux de cultures, *i.e.* une souche qui exprime son potentiel toxinogène quel que soit le milieu considéré. Une souche qui répond à cette condition peut alors être qualifiée de « souche robuste » par opposition à « souche variable ». La souche CBS185.32 est la souche la plus robuste de cet essai et a donc été utilisée comme souche de référence tout au long de nos travaux.

### **II.2. Variabilité entre lots de culture**

Au cours de nos travaux, il est arrivé plusieurs fois et de façon aléatoire qu'une souche habituellement bonne productrice de TCTB en cultures standard GYEP n'exprime pas son potentiel et ne synthétise que des niveaux minima en toxines.



## ***Chapitre 1 : Mise en Place de Méthodes et Procédures Expérimentales***

---

Cette variabilité de l'expression des potentiels toxigènes au cours du temps a été observée au cours de plusieurs études synthétisées par Bakan (1998). Il a été décrit que les repiquages successifs des souches sont associés à des diminutions voire des pertes du potentiel toxigène de *Fusarium spp.* Toutefois, ce phénomène ne semble pas être systématique : des essais réalisés au laboratoire n'ont pas montré de lien entre le nombre ou la fréquence des repiquages sur la biosynthèse de TCTB par *F. graminearum* CBS185.32 (Ducos, 2004, communication personnelle). Ces observations sont en accord avec les travaux de Wing, *et al.*, (1995), qui ont mis en évidence une dégénérescence des cultures après 10 repiquages sans altération des niveaux de production de trichothécènes chez *Fusarium spp.*

Une solution proposée pour remédier à cette variabilité consiste en une pré-culture sur substrat céréalière naturel (Bakan, 1998). Cette méthode a été testée sur la souche INRA 155 de chemotype DON dont le potentiel toxigène déterminé sur blé est de 860 ppm. Cette souche a été utilisée une première fois en cultures standards GYEP. Après 15 jours de culture, les rendements en TCTB obtenus étaient extrêmement faibles, c'est-à-dire inférieurs à 1 µg par gramme de biomasse sèche. La même procédure a été répétée après une pré-culture sur grains de blés stériles. Les rendements en TCTB obtenus étaient à nouveau extrêmement faibles (données non présentées). Cet essai illustre les limites de la technique de pré-culture sur substrat céréalière préconisée par Bakan (1998).

En revanche, quelques mois plus tard et sans qu'aucune procédure de pré-culture n'ait été utilisée, des quantités importantes de toxines ont été produites par la même souche INRA 155 : des rendements en TCTB supérieurs à 6500 µg par gramme de biomasse sèche ont été mesurés dans les filtrats de cultures standards GYEP âgées de 15 jours. Ainsi, ce phénomène largement observé est encore incompris et il n'existe, à l'heure actuelle, pas de procédure permettant de l'éviter totalement.

### **II.3. Variabilité intra lots de culture**

Nous avons également été confrontés à un autre type de variabilité : au cours de nos essais préliminaires en cultures standards GYEP, il existait souvent une variance





importante dans les niveaux de production de toxines inter-replicats, jusqu'à 80 % de variations, ce qui avait pour conséquence d'affaiblir la significativité d'éventuelles modulations par divers traitements. Ces variations ont pu être limitées, à environ 4 fois moins (20 %), en utilisant des bouchons commerciaux Bugstopper<sup>®</sup> (Whatman<sup>®</sup>) pour fermer les fioles Erlenmeyer utilisées en cultures standards au lieu des traditionnels bouchons en coton cardé enveloppés de gaze fabriqués manuellement, et donc de tailles et densités différentes. Nos résultats sont en accord avec de précédentes études ayant démontré que les niveaux de production de mycotoxines par *Fusarium spp.* sont très largement modulés par la qualité de ses échanges gazeux avec son milieu. (Greenhalgh, *et al.*, 1983, Miller, *et al.*, 1983).

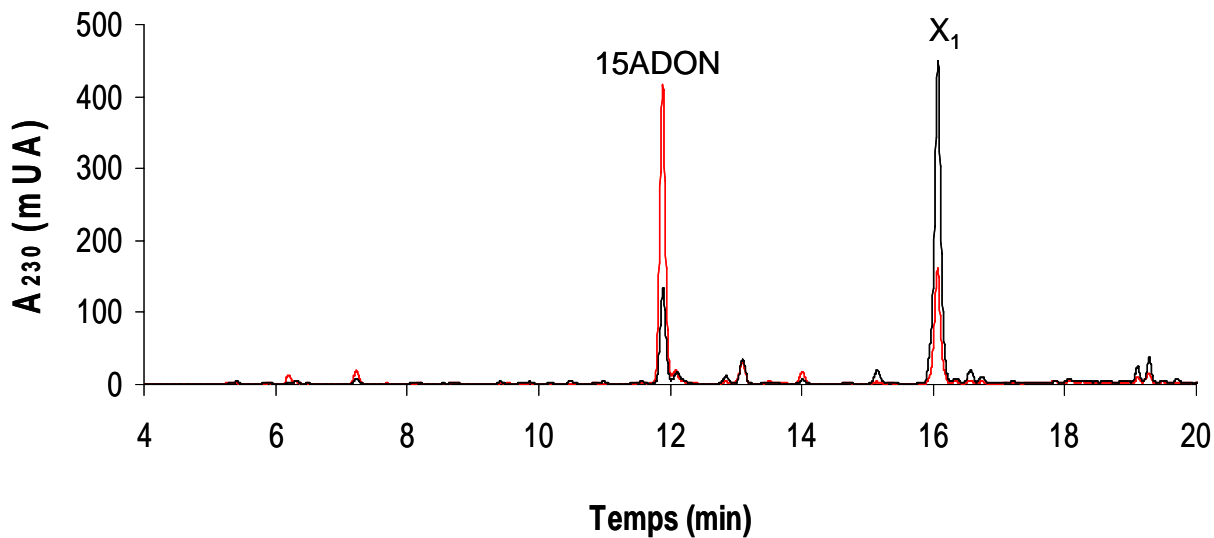
Nos observations illustrent largement la grande variabilité des souches de *Fusarium spp.* dans l'expression de leur potentiel toxigène en cultures liquides. Cependant, ce phénomène peut être minimisé par un choix judicieux du matériel biologique et de procédures de mise en culture robustes.

A notre connaissance, de telles variations n'ont pas été rapportées lors de cultures sur substrat naturel.

### **III. Profils chromatographiques et expression variable du potentiel toxigène**

Les conditions de culture liquide de *Fusarium* ont été redéfinies et ont permis d'améliorer la répétabilité et la reproductibilité des expériences :

- utilisation d'un même lot d'extrait de levure pour une série d'expériences en milieu GYEP ;
- utilisation systématique des bouchons commerciaux Bugstopper<sup>®</sup> ;
- utilisation de la souche CBS185.32 comme souche de référence dont la relative robustesse en termes de production de toxines a été mise en évidence.



**Figure 15 : Profils chromatographiques des extraits A et B issus de cultures GYEP âgées de 21 jours de *F. graminearum* producteur de 15ADON.**

Les lots de milieu GYEP ainsi que les inoculums utilisés pour les cultures A sont identiques à ceux utilisés pour réaliser les cultures B. Profil A représenté en rouge, profil B en noir.

**Tableau 9 : Intensité des réponses à  $\lambda = 230 \text{ nm}$**

	<b>15ADON</b>	<b>X1</b>
<b>Profil A</b>	<b>2500</b>	1080
<b>Profil B</b>	780	<b>3100</b>

(surfaces des pics en mAU.min)

Malgré ces avancées, les variations aléatoires de l'expression du potentiel toxigène d'une souche entre lots de culture n'ont pas été totalement éliminées et restent de cause(s) indéterminée(s).

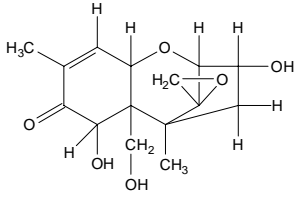
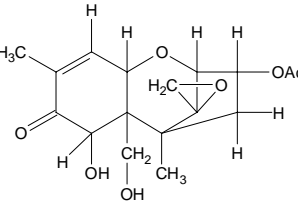
Dans les conditions où la production de TCTB n'est pas observée, l'observation des profils chromatographiques obtenus, après analyse par HPLC-UV<sub>230</sub> des filtrats des milieux de cultures, a révélé la présence d'un ou plusieurs composés non définis qui semblent s'accumuler de manière importante lorsque les niveaux de toxines sont réduits.

### **III.1. Profils obtenus par HPLC-UV<sub>230</sub>**

L'analyse des profils chromatographiques, obtenus par HPLC-UV<sub>230</sub>, d'extraits issus de cultures dans lesquelles les niveaux de productions en TCTB sont inférieurs à ceux classiquement obtenus a révélé la présence de composés non identifiés s'accumulant dans les milieux.

A titre d'exemple, la figure 15 représente les profils chromatographiques de deux extraits A et B issus d'un même lot de cultures GYEP de *F. graminearum* CBS185.32 producteur de 15ADON. Le profil A (rouge) est le profil classiquement obtenu après 21 jours de cultures liquides GYEP. Le profil B (noir) a été obtenu dans des milieux dans lesquels l'accumulation en 15ADON était réduite 3 fois. En plus du pic attendu de 15ADON est présent un pic, noté X<sub>1</sub>, de surface intégrée significative, détecté après 16.1 minutes d'analyse. L'analyse quantitative des profils révèle une intensité de réponses 3 fois plus importante dans l'extrait A que dans l'extrait B en ce qui concerne le 15ADON (tableau 9). Lorsque l'on considère le pic X<sub>1</sub>, il apparaît que la tendance est inversée avec une intensité de réponse 3 fois plus importante dans l'extrait B que dans l'extrait A. Ces observations semblent suggérer l'existence d'un lien négatif entre l'accumulation de 15ADON et celle du composé X<sub>1</sub> (ces observations ont été vérifiées à chaque fois que l'accumulation de 15ADON était réduite sans que la cause de cette diminution ne puisse être identifiée).

**Tableau 10 : Liste des différents ions obtenus pour le DON et le 3ADON en mode d'ionisation positif.**

Composé	MM (g/mol)	Ionisation positive		
		m/z	Différence de masse	Identification
<b>DON (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>)</b> 	296	<b>MS</b>		
		314	+ 18	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
		<b>297</b>	+ 1	[M + H] <sup>+</sup>
		<b>279</b>	+ 1 - 18	[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
		267	+ 1 - 30	[M + H - CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
		<b>261</b>	+ 1 - 36	[M + H - 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
		<b>249</b>	+ 1 - 48	[M + H - CH <sub>2</sub> O - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
<b>231</b>	+ 1 - 66	[M + H - CH <sub>2</sub> O - 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		
<b>3ADON (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>)</b> 	338	<b>MS</b>		
		356	+ 18	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
		339	+ 1	[M + H] <sup>+</sup>
		<b>MS<sup>2</sup><sub>339</sub></b>		
		321	+ 1 - 18	[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
		<b>297</b>	+ 1 - 42	[M + H - Ac] <sup>+</sup>
		<b>279</b>	+ 1 - 60	[M + H - OAc] <sup>+</sup>
		<b>261</b>	+ 1 - 78	[M + H - OAc - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
		<b>249</b>	+ 1 - 90	[M + H - OAc - CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
243	+ 1 - 96	[M + H - OAc - 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		
<b>231</b>	+ 1 - 108	[M + H - OAc - CH <sub>2</sub> O - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		

D'après Voyksner, *et al.*, 1987, Berger, *et al.*, 1999, Razazzi-Fazeli, *et al.*, 1999, Nielsen & Smedsgaard, 2003, Bily, *et al.*, 2004, les groupements identifiés qui correspondent à la différence de masse calculée sont notés en rouge.

Une hypothèse possible au regard de ces informations est alors que le composé X<sub>1</sub> est un composé intermédiaire de la voie de biosynthèse des TCTB. Sous certaines conditions encore indéterminées, la voie de biosynthèse des trichothécènes serait interrompue entraînant une accumulation de X<sub>1</sub> et la non accumulation de 15ADON.

Nous avons testé notre hypothèse en analysant les milieux de culture dans lesquels X<sub>1</sub> s'accumule de façon plus importante par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur par spectrométrie de masse. Ce détecteur était équipé d'une source ionisante (ionisation en présence d'acétate d'ammonium) de type electrospray et d'un analyseur de type piège à ions (HPLC-ESI-TI-MS<sup>31</sup> ; matériel LCQ Advantage Max, Thermo Electron Corporation ; analyses réalisées en collaboration avec le service technique de Thermo Electron Corporation).

### **III.2. Analyse par HPLC-ESI-TI-MS**

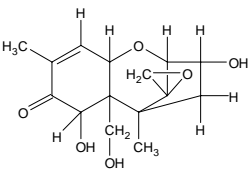
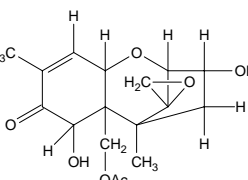
#### ***III.2.a. Analyses du DON et de ses formes acétylées***

Le DON et le 15ADON ont été analysés en mode négatif afin d'être utilisés comme références. La littérature contient de nombreuses données relatives à l'analyse MS du DON et du 3ADON en mode d'ionisation positif (Voyksner, *et al.*, 1987, Berger, *et al.*, 1999, Razzazi-Fazeli, *et al.*, 1999, Nielsen & Smedsgaard, 2003, Bily, *et al.*, 2004). Les tableaux 10 et 11 énumèrent respectivement les ions obtenus lors des analyses du DON et du 3ADON en mode d'ionisation positif, et les fragments obtenus après fragmentation du DON et du 15ADON en mode d'ionisation négatif. Les figures 16 et 17 représentent respectivement les schémas de fragmentation du DON et du 15ADON obtenus en mode d'ionisation négatif. La masse molaire du DON est égale à 296 g/mol, celle du ADON (3- ou 15-acétylé) à 338 g/mol.

---

<sup>31</sup> High Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionisation – Trap Ion – Mass Spectrometry

**Tableau 11 : Liste des fragments obtenus pour le DON et le 15ADON en mode d'ionisation négatif.**

Composé	m/z	Ionisation négative		
		m/z	Différence de masse	Identification
<p><b>DON</b> (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>)</p> 	296	<b>MS</b>		
		355	- 1 + 60	[M - H + CH <sub>3</sub> COOH] <sup>-</sup>
		295	-1	[M - H] <sup>-</sup>
		<b>265</b>	-1 - 30	[M - H - CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
		<b>MS<sup>2</sup><sub>355</sub></b>		
		295	- 60	[M - H + CH <sub>3</sub> COOH - CH <sub>3</sub> COOH] <sup>-</sup>
		<b>265</b>	- 60 - 30	[M - H + CH <sub>3</sub> COOH - CH <sub>3</sub> COOH - CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
		<b>247</b>	- 60 - 48	[M - H + CH <sub>3</sub> COOH - CH <sub>3</sub> COOH - CH <sub>2</sub> O - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
		<b>MS<sup>3</sup><sub>295</sub></b>		
		<b>277</b>	- 18	[M - H - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
		<b>265</b>	- 30	[M - H - CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
		<b>247</b>	- 48	M - H - CH <sub>2</sub> O - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
		<b>MS<sup>3</sup><sub>265</sub></b>		
		<b>247</b>	- 18	[M - H - CH <sub>2</sub> O - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
235	- 30	[M - H - CH <sub>2</sub> O - CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>		
217	- 48	[M - H - CH <sub>2</sub> O - CH <sub>2</sub> O - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>		
<p><b>15ADON</b> (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>)</p> 	338	<b>MS</b>		
		397	- 1 + 60	[M - H + CH <sub>3</sub> COOH] <sup>-</sup>
		337	-1	[M - H] <sup>-</sup>
		293	- 1 - 44	[M - H - CO - CH <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
		<b>265</b>	- 1 - 72	[M - H - CH <sub>2</sub> O - Ac] <sup>-</sup>
		233	- 1 - 104	[M - H - CH <sub>2</sub> O - Ac - 2 CH <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
		205	- 1 - 132	[M - H - CH <sub>2</sub> O - Ac - 2 CH <sub>4</sub> - CO] <sup>-</sup>
		<b>MS<sup>2</sup><sub>397</sub></b>		
		337	- 60	[M - H + CH <sub>3</sub> COOH - CH <sub>3</sub> COOH] <sup>-</sup>
		<b>277</b>	- 120	[M - H + CH <sub>3</sub> COOH - CH <sub>3</sub> COOH - OAc] <sup>-</sup>
		<b>MS<sup>3</sup><sub>337</sub></b>		
		<b>277</b>	- 60	[M - H - OAc] <sup>-</sup>
		259	- 78	[M - H - OAc - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
		<b>247</b>	- 90	[M - H - OAc - CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
229	- 108	[M - H - OAc - CH <sub>2</sub> O - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>		

Les groupements identifiés qui correspondent à la différence de masse calculée sont notés en rouge.

En mode positif (tableau 10), les adduits ammonium  $[M + \text{NH}_4]^+$  ont été détectés pour le DON (m/z 314) comme pour le 3ADON (m/z 356). Les fragments obtenus communs au DON et au 3ADON sont m/z 297, 279, 261, 249 et 231 (obtenus en MS<sup>2</sup> de l'ion m/z 339 en ce qui concerne le 3ADON). Les fragments m/z 279, 249 et 231 ont été définis par Nielsen et Smedsgaard (2003) comme étant des ions classiquement obtenus de façon prédominante lors de la fragmentation du DON et du 3ADON en mode positif.

Pour le DON, les pertes en unités de masse (uma) observées sont : 18 uma, 30 uma, 36 uma, 48 uma et 66 uma. La perte de 18 uma correspond à la perte de H<sub>2</sub>O à partir d'un groupement OH, et la perte de 30 uma peut être associée à la perte de CH<sub>2</sub>O à partir de l'anneau époxyde ou du groupement OH associé au carbone C15 (Berger, *et al.*, 1999). La perte de 36 unités correspond alors à la perte de 2H<sub>2</sub>O à partir de 2 groupements OH, la perte de 48 unités peut être la perte de CH<sub>2</sub>O et de H<sub>2</sub>O, et la perte de 66 unités peut être la perte de CH<sub>2</sub>O et de 2H<sub>2</sub>O (tableau 10, colonne « Identification »).

Pour le 3ADON, les pertes en unités de masse observées sont : 18 uma, 42 uma, 60 uma, 78 uma, 90 uma, 96 uma et 108 uma. Berger *et al.* (1999) ont associé la perte de 42 uma à la perte de CH<sub>2</sub>CO à partir du groupement acetyl, et la perte de 60 uma a été associée à la perte de CH<sub>3</sub>COOH à partir du groupement acétyle. La perte de 78 uma peut donc être interprétée comme la perte de CH<sub>3</sub>COOH et de H<sub>2</sub>O, la perte de 90 uma peut être associée à la perte de CH<sub>3</sub>COOH et de CH<sub>2</sub>O, la perte de 96 uma peut être associée à la perte de CH<sub>3</sub>COOH et de 2H<sub>2</sub>O, et enfin la perte de 108 uma peut être associée à la perte de CH<sub>3</sub>COOH et CH<sub>2</sub>O et H<sub>2</sub>O.

En mode négatif (tableau 11), les adduits acétate  $[M - \text{H} + \text{CH}_3\text{COOH}]^-$  ont été détectés pour le DON (m/z 355) comme pour le 15ADON (m/z 397). Les fragments obtenus communs au DON et au 15ADON sont m/z 277, 265 et 247.

Pour le DON, les pertes en unités de masse observées sont : 18 uma, 30 uma, et 48 uma (Tableau 11 et figure 16). Les pertes de ces masses ont été associées de la même façon que lors de l'analyse en mode positif, c'est-à-dire la perte de 18 uma est associée à la perte de H<sub>2</sub>O, 30 uma représente la perte de CH<sub>2</sub>O et 48 uma celle de CH<sub>2</sub>O et H<sub>2</sub>O. Pour le 15ADON, les pertes en unités de masse observées sont : 44 uma, 60 uma, 72

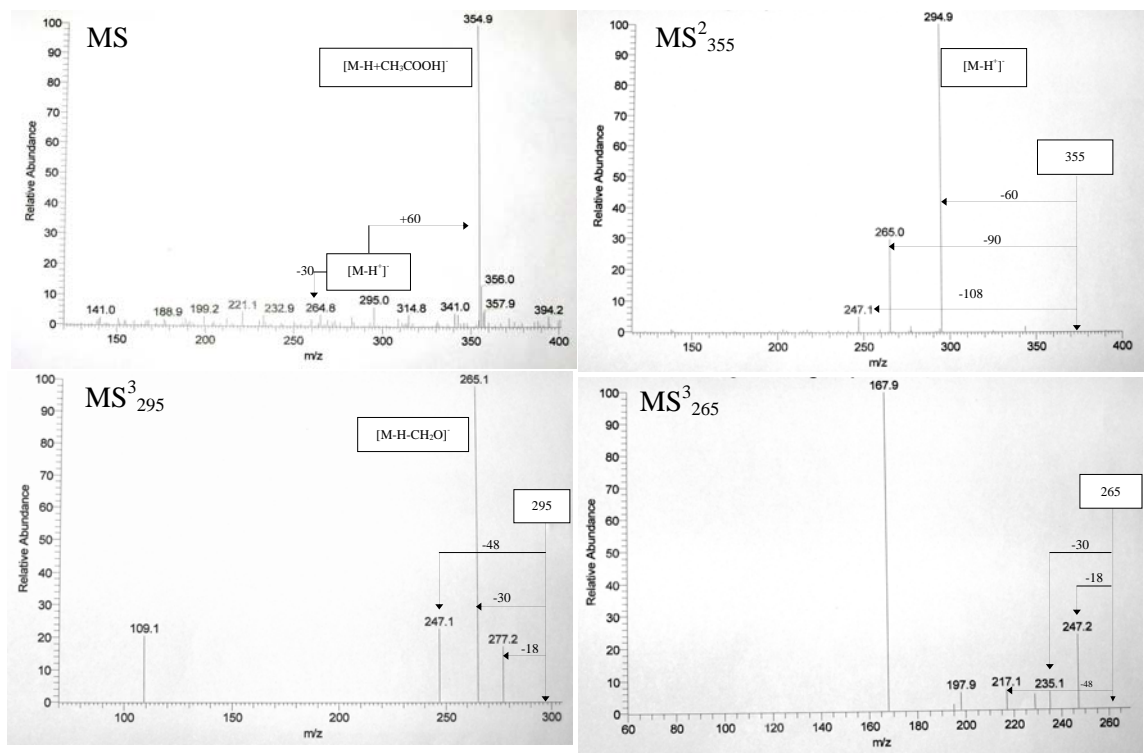


Figure 16 : Schéma de fragmentation du DON m/z 296 en mode d'ionisation négatif.

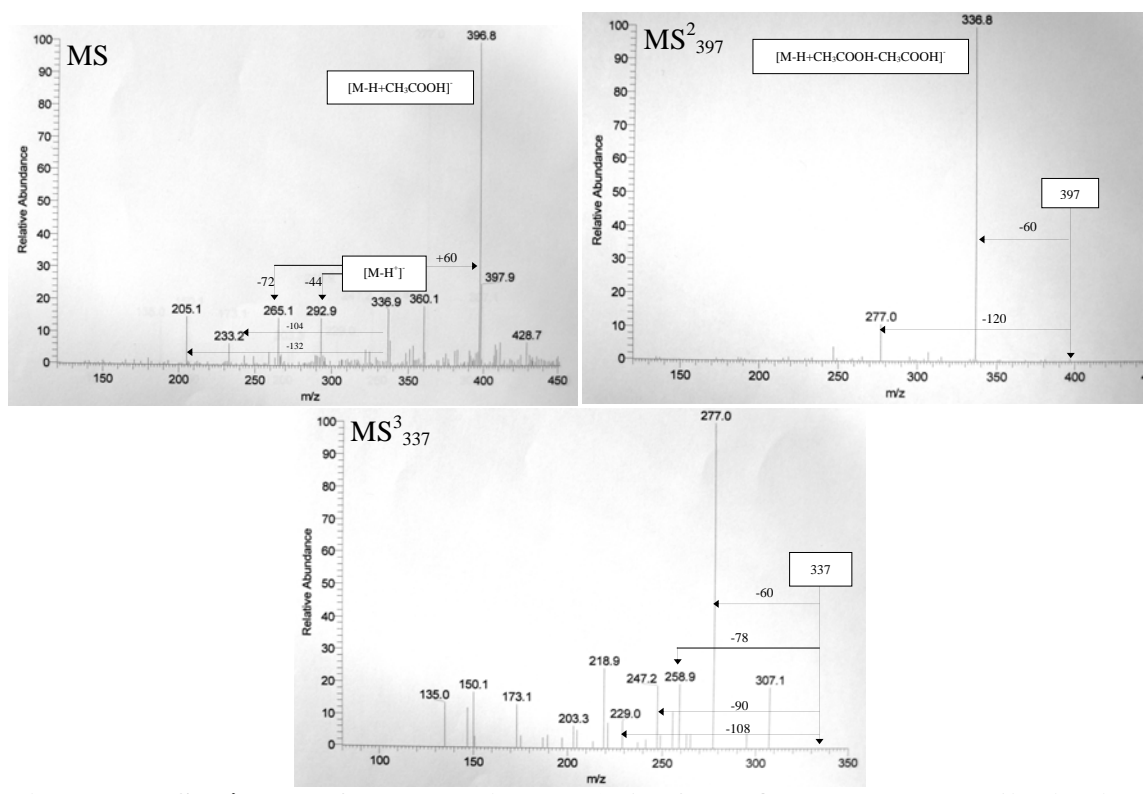


Figure 17 : Schéma de fragmentation du 15ADON m/z 338 en mode d'ionisation négatif.



uma, 78 uma, 90 uma, 104 uma, 108 uma et 132 uma (Tableau 11 et figure 17). La perte de 44 uma représente la perte de CO et CH<sub>4</sub> (28 + 16 = 44 uma), la perte de 60 uma est associée à la perte de CH<sub>3</sub>COOH à partir du groupement O-acétyle en C15, la perte de 72 uma est identifiée comme la perte de CH<sub>2</sub>O (groupement époxyde) et de CH<sub>2</sub>CO (acétyle), la perte de 78 uma représente la perte de CH<sub>3</sub>COOH et de H<sub>2</sub>O, la perte de 104 uma est associée à la perte de CH<sub>2</sub>O et de CH<sub>2</sub>CO et de 2CH<sub>4</sub>, la perte de 108 uma représente la perte de CH<sub>3</sub>COOH et de CH<sub>2</sub>O et de H<sub>2</sub>O, et enfin, la perte de 132 uma est associée à la perte de CH<sub>2</sub>O, de CH<sub>2</sub>CO, de 2CH<sub>4</sub>, et de CO.

X<sub>1</sub> a été analysé en mode d'ionisation négatif.

### ***III.2.b. Analyse du pic X<sub>1</sub> en mode d'ionisation négatif***

L'analyse HPLC-ESI-TI-MS a permis de révéler la présence de 3 composés co-éluant dans le pic X<sub>1</sub> indiqué sur la figure 15. Chacun de ces trois composés, notés X<sub>1a</sub>, X<sub>1b</sub> et X<sub>1c</sub>, à été analysé en mode négatif.

#### ***Composé X<sub>1a</sub> (tableau 12 et figure 18)***

Les adduits acétates [M - H + CH<sub>3</sub>COOH]<sup>-</sup> et [M - H + CH<sub>3</sub>COOH - H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> ont été détectés lors de l'analyse en MS du pic X<sub>1a</sub> en mode négatif (m/z 309 et 291). Ces résultats indiquent qu'il s'agit d'un produit de masse moléculaire 250. Les ions obtenus après fragmentation (jusqu'à MS<sup>3</sup>) sont m/z 249, 231, 203, 201 et également plusieurs fragments de masses moléculaires inférieures à 150 (Figure 18, MS<sup>3</sup><sub>249</sub>). L'ion m/z 249 est identifié comme la molécule X<sub>1a</sub> ayant perdu un proton [M - H]<sup>-</sup>. Les ions m/z 231, 203 et 201 correspondent respectivement à la perte de 18 uma, 46 uma et 48 uma. Les pertes de 18 uma et 48 uma ont été observées pour le DON et ont été assimilés à la perte de H<sub>2</sub>O à partir d'un groupement OH (18 uma), et à celle de H<sub>2</sub>O et de CH<sub>2</sub>O (18 + 30 = 48 uma). La perte de 46 uma pourrait être interprétée comme la perte de CH<sub>4</sub> et de CH<sub>2</sub>O à partir d'un groupe époxyde ou d'un groupe carbonyle hydroxylé (16 + 30 = 46 uma). La perte de 46 uma pourrait également être associée à la perte de CO et H<sub>2</sub>O (28

Tableau 12 : Liste des fragments obtenus pour le composé X<sub>1a</sub> en mode d'ionisation négatif.

Ionisation négative			
Composé	m/z	Différence de masse	Interprétation possible
X <sub>1a</sub>	MS		
	309	-1 + 60	$[M - H + CH_3COOH]^-$
	291	-1 + 60 - 18	$[M - H + CH_3COOH - H_2O]^-$
	249	-1	$[M - H]^-$
	MS <sup>2</sup> <sub>309</sub>		
	249	-1 - 60	$[M - H + CH_3COOH - CH_3COOH]^-$
	231	-78	$[M - H + CH_3COOH - CH_3COOH - H_2O]^-$
	MS <sup>3</sup> <sub>249</sub>		
	249	0	$[M - H]^-$
	231	-18	$[M - H - H_2O]^-$
203	-46	$[M - H - CH_2O - CH_4]^-$	
201	-48	$[M - H - CH_2O - H_2O]^-$	

Les groupements identifiés qui correspondent à la différence de masse calculée sont notés en rouge.

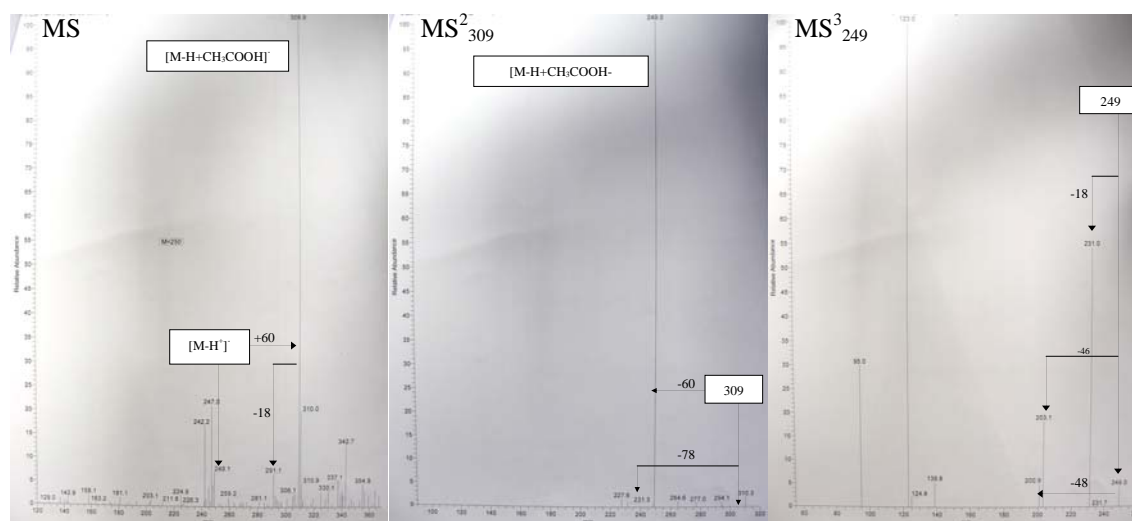


Figure 18 : Spectre de X<sub>1a</sub> m/z 250 en mode d'ionisation négatif.

+ 18 = 46 uma). Les schémas des fragmentations du DON et de X<sub>1a</sub> semblent proches. Ces observations pourraient suggérer que X<sub>1a</sub> appartient à la famille des trichothécènes. Il semble que la perte de H<sub>2</sub>O à partir d'une position substituée par un OH semble plus rare lors de la fragmentation de X<sub>1a</sub> que lors de celle du DON, ce qui suggère que le composé X<sub>1a</sub> est peut-être moins hydroxylé que le DON.

Il semble donc que le composé X<sub>1a</sub> soit un composé de masse moléculaire 250 et qu'il possède une structure chimique comparable à celle du DON avec cependant moins d'hydroxylation. Cette similarité structurale avec le DON suggère que X<sub>1a</sub> pourrait être un des intermédiaires de la voie métabolique conduisant à la production de DON.

La figure 19 propose notre interprétation de la voie de biosynthèse des trichothécènes. La voie conduisant à la production de TCTA, qui diffère de la voie des TCTB par quelques étapes seulement, est également indiquée à titre informatif. Parmi tous les intermédiaires connus, seul l'isotrichodermol possède une masse molaire égale à 250. Sa structure, moins hydroxylée que celle du DON, en fait un excellent candidat pour l'identification. Le composé X<sub>1a</sub> pourrait être l'isotrichodermol.

La même analyse a été réalisée pour les composés X<sub>1b</sub> et X<sub>1c</sub>. Les schémas de fragmentation de ces molécules sont identiques révélant que X<sub>1b</sub> et X<sub>1c</sub> sont des composés isomères. Seule l'analyse du pic X<sub>1b</sub> est ici présentée (l'analyse du pic X<sub>1c</sub> étant tout à fait identique).

### ***Composé X<sub>1b</sub> (tableau 13 et figure 20)***

L'adduit acétate  $[M - H + CH_3COOH]^-$  et l'anion  $[M - H]^-$  ont été détectés lors de l'analyse du composé X<sub>1b</sub> en mode négatif (m/z 327 et 267). Ces résultats indiquent qu'il s'agit d'un produit de masse moléculaire 268.

Les ions obtenus après fragmentation (jusqu'à MS<sup>2</sup> de l'ion m/z 267) sont m/z 239, 223, 205, 179 et quelques fragments non identifiés de masses moléculaires inférieures. Les ions m/z 239 et 223 correspondent respectivement à la perte de 28 uma

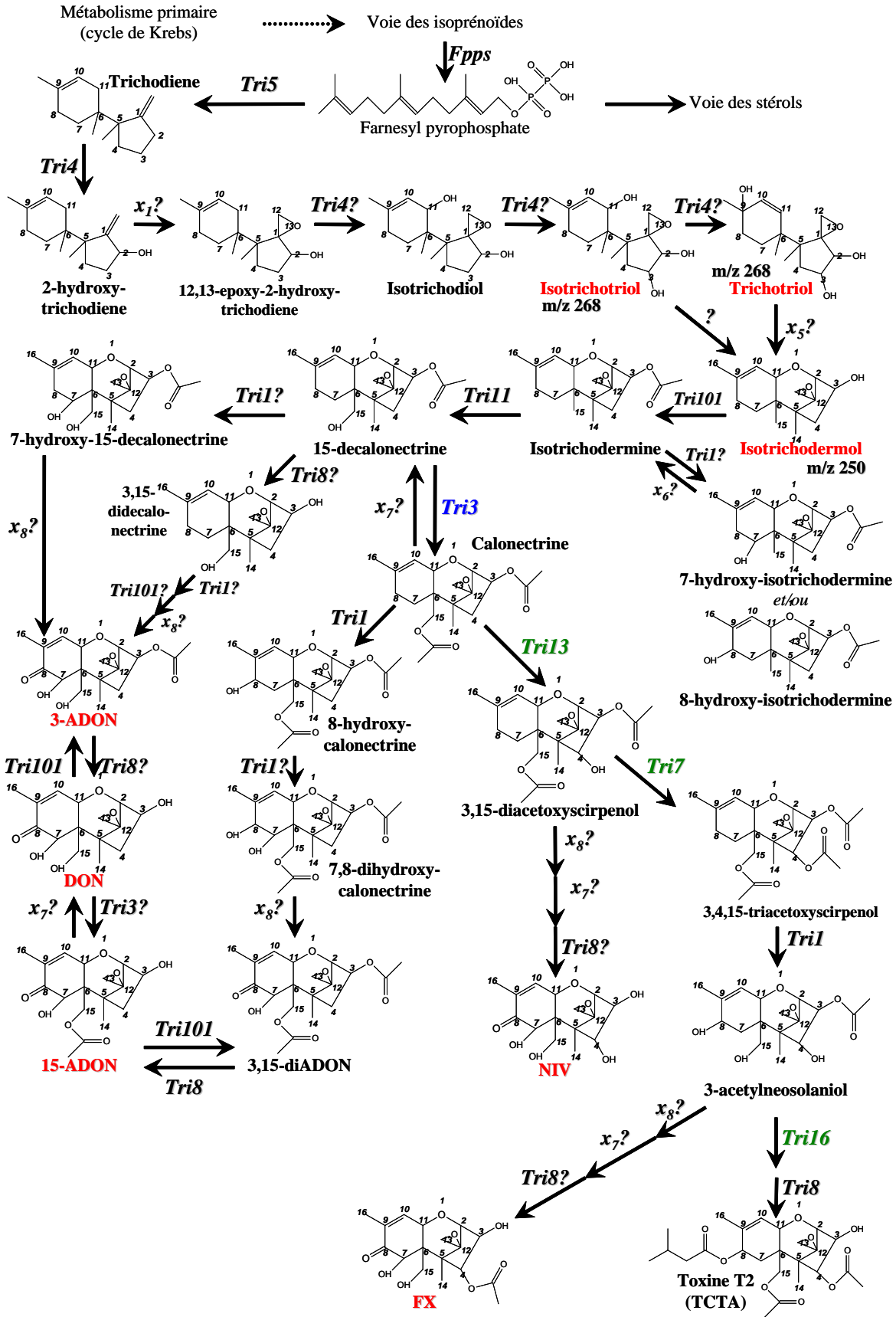


Figure 19 : Interprétation de la voie de biosynthèse des trichothécènes.

## *Chapitre 1 : Mise en Place de Méthodes et Procédures Expérimentales*

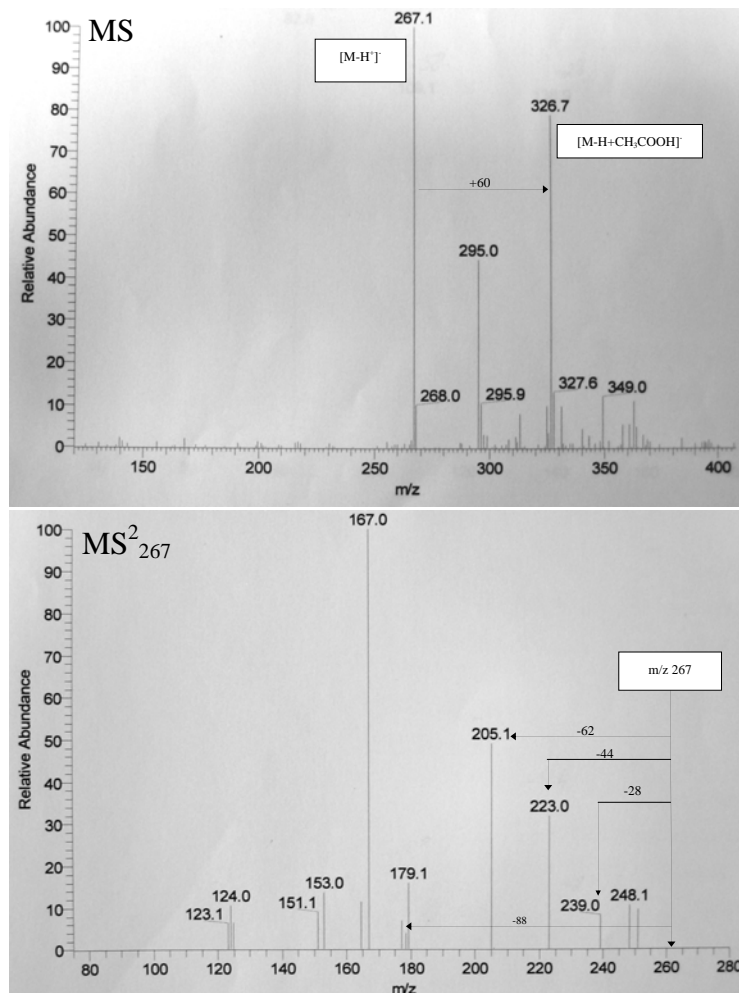
---

et 44 uma. La perte de 28 uma peut être reliée à la perte de CO. La perte de 44 uma peut être reliée à la perte de CO et de CH<sub>4</sub> (28 + 16 = 44 uma) ou à celle de COO. La perte de 62 uma peut être interprétée comme la perte de 2 groupements CH<sub>4</sub> et de CH<sub>2</sub>O (2 × 16 + 30 = 62 uma), ou à celle de CO et CH<sub>4</sub> et H<sub>2</sub>O (28 + 16 + 18 = 62 uma), ou enfin à la perte de COO et H<sub>2</sub>O (44 + 18 = 62 uma). Par analogie avec le DON, la perte de CH<sub>2</sub>O pourrait suggérer la présence d'un groupe CH<sub>2</sub>OH ou d'un pont époxyde sur la molécule mère. Enfin, le fragment m/z 179 pourrait alors être associé à la perte de 2CH<sub>2</sub>O et de CO (2 × 30 + 28 = 88 uma) ou d'un groupement O-acétyle et de CO (60 + 28 = 88 uma).

Les fragments sont différents de ceux observés pour le DON en accord avec un schéma de fragmentation différent. Les squelettes chimiques de X<sub>1b</sub> et du DON sont donc différents. La perte de 44 uma n'est observée que dans le cas de X<sub>1b</sub> et dans celui du 15ADON, mais pas lors de la fragmentation du DON. La présence d'un groupement époxyde similaire à celui du DON et du 15ADON est suspectée. Enfin, nous savons que la molécule X<sub>1b</sub> est de masse moléculaire 268 et qu'elle est présente dans les milieux en mélange avec un de ses isomères. Le trichotriol et l'isotrichotriol, de masse molaire 268, sont deux molécules isomères parmi les premiers intermédiaires de la voie de biosynthèse des trichothécènes. Leur squelette chimique est différent de celui du DON (la formation du squelette tel qu'il est dans le DON n'intervient qu'à partir de la formation de l'isotrichodermol) ce qui semble justifier des schémas de fragmentation différents. L'analyse de trichotriol ou d'isotrichotriol purifiés pourrait permettre de valider notre interprétation du schéma de fragmentation des composés X<sub>1b</sub> et X<sub>1c</sub> et ainsi confirmer leur identification. Cette vérification n'a pas (encore) été possible à ce jour puisque ces composés ne sont pas commercialisés et qu'il est donc nécessaire de préparer des solutions purifiées au préalable. Cependant, l'analyse de la structure chimique de ces composés, le trichodermol et le trichotriol (et son isomère), peut permettre d'émettre des hypothèses quant aux fragments théoriquement attendus après fragmentation.

**Tableau 13 : Liste des fragments obtenus pour le composé X1b en mode d'ionisation négatif.**

Ionisation négative			
Composé	m/z	Différence de masse	Interprétation possible
X <sub>1b</sub>	MS		
	327	-1 + 60	[M - H + CH <sub>3</sub> COOH] <sup>-</sup>
	267	- 1	[M - H] <sup>-</sup>
	MS <sup>2</sup> <sub>267</sub>		
	239	- 28	[M - H - CO] <sup>-</sup>
	223	- 44	[M - H - CO - CH <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
	205	- 62	[M - H - CH <sub>2</sub> O - 2CH <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>
179	- 88	[M - H - CH <sub>2</sub> O - 3CH <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	



**Figure 20 : Schéma de fragmentation de X<sub>1b</sub> m/z 268 en mode d'ionisation négatif.**

### ***III.2.c. Hypothèse de fragmentation du trichodermol et du trichotriol (Figure 21)***

Les structures de l'isotrichodermol et du trichotriol sont présentées sur la figure 21.

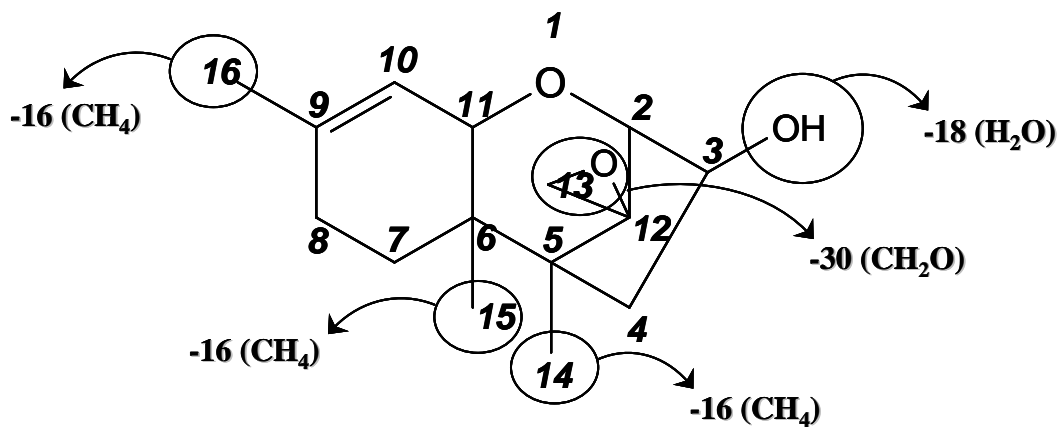
Il est délicat de prédire avec certitude les mouvements électroniques pouvant avoir lieu dans ces molécules. Nous nous limiterons à déterminer de façon superficielle les groupements susceptibles d'être facilement perdus lors de la fragmentation de ces molécules.

Dans le cas de l'isotrichodermol, trois groupements méthyle sont susceptibles d'être perdus sous la forme  $\text{CH}_4$  (16 uma) tandis qu'un unique hydroxyle est présent sur la molécule (perte de 18 uma sous forme de  $\text{H}_2\text{O}$ ). La perte de l'anneau époxyde générerait  $\text{CH}_2\text{O}$  (30 uma). Ces données sont en accord avec les résultats expérimentaux obtenus lors de l'analyse du composé  $\text{X}_{1a}$  (Tableau 12, figure 18) ce qui est un indice supplémentaire en faveur de notre hypothèse d'identification de  $\text{X}_{1a}$  comme étant de l'isotrichodermol.

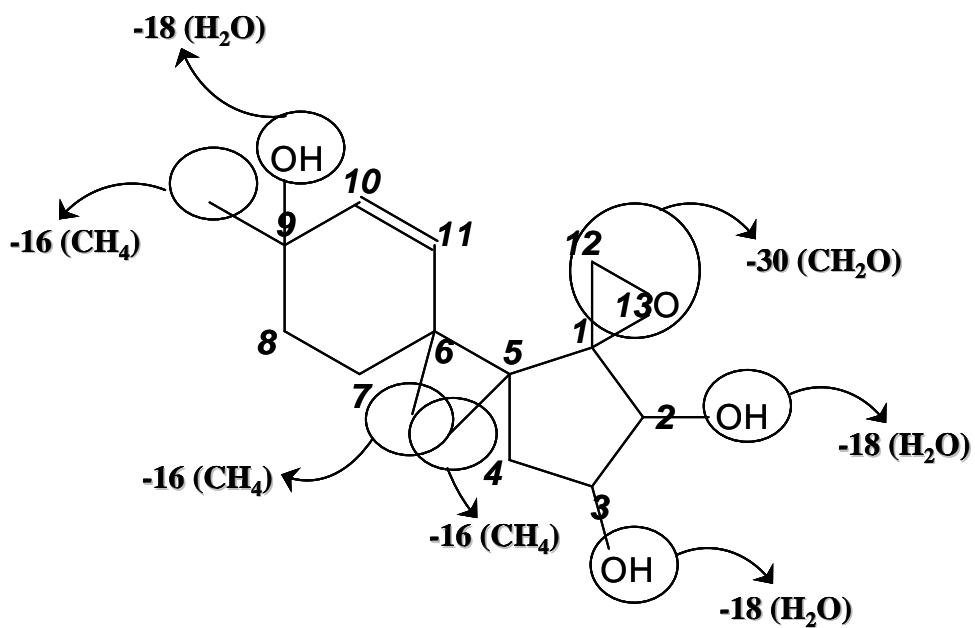
Dans le cas du trichotriol, trois groupements méthyle et l'anneau époxyde sont également susceptibles d'être perdus respectivement sous la forme de  $\text{CH}_4$  (16 uma) et sous la forme de  $\text{CH}_2\text{O}$  (30 uma). En revanche, trois groupements hydroxyles sont présents sur la molécule (au lieu de un groupement unique pour l'isotrichodermol) pouvant permettre trois fois la perte de 18 uma ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Ces valeurs ne sont pas en contradiction avec les résultats des analyses du composé  $\text{X}_{1b}$  (Tableau 13, figure 20) et l'hypothèse selon laquelle  $\text{X}_{1b}$  et  $\text{X}_{1c}$  seraient le trichotriol et l'isotrichodermol reste possible.

### **III.3. Synthèse**

Il semble que des intermédiaires de la voie de biosynthèse des TCTB sont susceptibles de s'accumuler aux dépens de la production de 15ADON, et ce dans des conditions encore non déterminées. En particulier, il est possible que l'un des composés



**Isotrichodermol  $m/z$  250**



**Trichotriol  $m/z$  268**

**Figure 21 : Hypothèse de fragmentation simple du trichodermol et de l'isotrichotriol.**

Les valeurs numériques indiquent la masse atomique molaire du groupement perdu (groupement précisé entre parenthèses).



détectés soit le trichodermol, substrat de TRI101 (enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des trichothécènes).

L'accumulation anecdotique de tels composés dans certains milieux de culture peut suggérer une expression différentielle de certains gènes impliqués dans la voie de biosynthèse. Notamment, une diminution du niveau d'expression de *Tri101* pourrait expliquer l'accumulation de son substrat, c'est-à-dire l'isotrichodermol tandis que le ADON n'est produit qu'à des niveaux plus faibles.

### **IV. Méthodes & Procédures Expérimentales : Conclusion**

Pour faire face à une faible répétabilité technique des essais liquides utilisant *Fusarium* comme matériel biologique, les procédures de culture ont été standardisées : un même lot d'extrait de levure doit être utilisé pour toute une série d'expériences et l'utilisation des bouchons commerciaux Bugstopper<sup>®</sup> pour fioles Erlenmeyer est devenue systématique.

Par ailleurs, nous avons dû faire face à des variations biologiques importantes entre lots de culture : pour des raisons indéterminées il n'est pas rare d'observer, pour une souche produisant habituellement de fortes quantités en toxines, une diminution importante de l'accumulation de toxines. Dans ces conditions où la production en TCTB est fortement diminuée (voire parfois non observée), l'utilisation d'une technique d'analyse des TCTB par HPLC-UV s'est révélée particulièrement intéressante. En effet, sa faible spécificité eut égard à la détection à  $\lambda = 230$  nm (longueur d'onde peu spécifique) a permis la détection de composés s'accumulant dans nos milieux de culture. Identifier la nature de ces composés permet d'apporter des éléments nouveaux sur la voie de biosynthèse des TCT pour en comprendre les mécanismes de régulation.

Le « composé X<sub>1</sub> » a été en particulier remarqué ; le signal correspondant observé sur les profils chromatographiques est de forte intensité, signal qui par ailleurs augmente lorsque le signal associé au 15ADON diminue. Des analyses hors site par spectrométrie de masse ont été réalisées et ont révélé que sous le pic X<sub>1</sub> co-éluent trois



## ***Chapitre 1 : Mise en Place de Méthodes et Procédures Expérimentales***

---

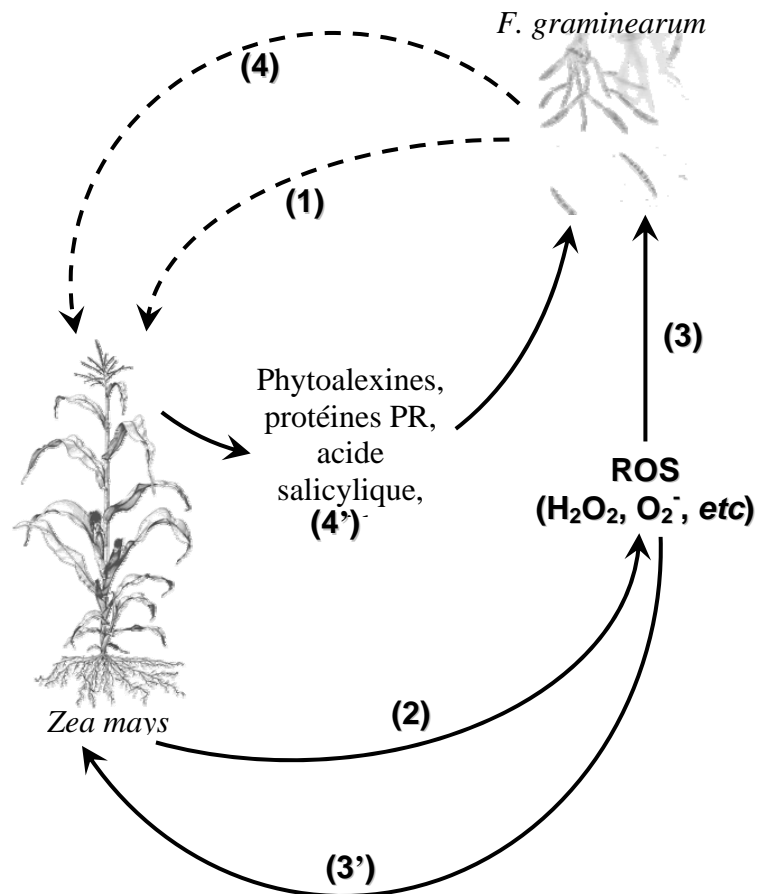
composés qui pourraient vraisemblablement être de l'isotrichodermol et du trichotriol en mélange avec son isomère l'isotrichotriol. Ces composés sont tous les trois des intermédiaires de la voie de biosynthèse des TCT.

Ces résultats semblent révéler l'importance de l'étape d'acétylation de l'isotrichodermol en isotrichodermine au cours du processus de biosynthèse des TCT. Cette étape est catalysée par une 3-O-acetyltransferase codée par *Tri101* (figure 19). L'analyse du profil d'expression de ce gène et de ses régulateurs représente alors une piste importante pour la compréhension des mécanismes de variation biologique des niveaux de toxinogénèse.

Le pic X<sub>1</sub> n'est pas le seul que nous avons observé dans nos milieux au cours de nos nombreux essais. Il semble que les pics s'accumulant lors d'une diminution des niveaux de production en DON/ADON par *F. graminearum* soient différents de ceux s'accumulant lors d'une diminution des niveaux de production en NIV/FX par *F. culmorum*. Ne disposant pas de détecteur de masse, les analyses HPLC-MS ont été faites en dehors du laboratoire, ce qui ne nous a pas permis d'analyser autant de pics que nous l'aurions souhaité. Ce matériel est en cours d'acquisition au sein de l'unité MycSA, et dans l'avenir, l'identification des composés s'accumulant dans les milieux en fonction des conditions de culture devrait être facilitée. Cette approche pourrait permettre une meilleure compréhension de l'influence des paramètres de culture sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des TCT.



***Chapitre 2 : Effets du peroxyde  
d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de composés  
associés sur la biosynthèse de  
trichothécènes de type B par Fusarium***



**Figure 22 : Proposition d'un modèle résumant les interactions plante-*Fusarium* mises en place lors de la réponse hypersensible**

(Synthèse réalisée d'après les travaux de Levine, *et al.*, 1994, Kono, *et al.*, 1995, Govrin & Levine, 2002, Somleva & Blechl, 2004, Zhou, *et al.*, 2005).

L'attaque par *Fusarium* (1) est spécifiquement reconnue par la plante. En réponse à cette attaque, un « burst oxydatif » est déclenché (2) avec notamment le relargage massif de  $H_2O_2$ . Cet  $H_2O_2$  peut être toxique pour le pathogène (3) mais aussi jouer le rôle de molécule signal aussi bien pour la plante (3') que pour *Fusarium* (3). La réponse de la plante au signal  $H_2O_2$  est alors la mise en place de la réponse hypersensible (4'). La réceptivité/réponse de *Fusarium* au signal  $H_2O_2$  n'est pas établie (4). Une hypothèse possible est que  $H_2O_2$  peut moduler la voie de biosynthèse des trichothécènes.

Nous l'avons cité en introduction, l'activation des mécanismes de défense de la plante en réponse à une invasion pathogène a pour conséquence le relargage massif de diverses molécules qui ont des conséquences pour le pathogène lui-même (figure 11). Le pathosystème maïs/*Fusarium* n'échappe pas à cette règle, et dans ce cas précis il est envisageable que certaines des molécules de défense neo-synthétisées en réponse à l'attaque par *Fusarium* aient des conséquences sur les niveaux de biosynthèse de mycotoxines.

Parmi les différentes molécules de défense produites par la plante, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en est une particulièrement intéressante pour deux raisons majeures. La première est le caractère ubiquitaire et précoce de la production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en réponse à l'infection. La deuxième est le double rôle d'une part de molécule biocide et d'autre part de molécule signal qui déclenche d'autres mécanismes de défense et amplifie la réponse dirigée contre le pathogène. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par la plante peut être une molécule signal pour le pathogène également et représente un excellent candidat comme facteur modulant la biosynthèse de toxines. Un modèle présentant ces interactions est proposé figure 22.

Certains de nos essais préliminaires réalisés au cours de l'année de DEA<sup>32</sup> ont indiqué que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM module la biosynthèse de DON et de ADON par *F. graminearum* (Ponts, *et al.*, 2003). Les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restaient à être précisés et en particulier nous voulions comprendre les mécanismes mis en jeu lors de ces essais.

*In planta*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> déclenche également l'activation d'autres voies de défense dont les intermédiaires et les produits sont susceptibles de moduler la biosynthèse de toxines. C'est le cas de la voie des lipoxygénases (voir introduction figure 11). Nous nous sommes intéressés aux effets potentiels des hydroperoxydes de l'acide linoléique.

### **I. Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la biosynthèse de trichothécènes de type B**

Afin de préciser les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la biosynthèse de DON et de ADON par *F. graminearum*, nous avons tenté d'identifier des phases de la cinétique de croissance de

---

<sup>32</sup> Diplôme d'Etudes Approfondies





*Fusarium* particulièrement sensibles à l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'en décrire les effets observés sur la biosynthèse de mycotoxines. Dans le but de déterminer s'il existe ou non un lien entre pouvoir oxydant et effet(s) sur la biosynthèse de DON/ADON, les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont alors été comparés aux effets du diamide et du paraquat (ou methyl viologen, MV), deux autres composés caractérisés par des potentiels oxydants forts. La même recherche de phase(s) sensible(s) à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en termes de biosynthèse de NIV/FX par *F. culmorum* a été faite et les résultats ont été comparés.

Dans le but de compléter nos données sur la relation entre paramètres oxydants et biosynthèse de TCTB, la démarche inverse a été entreprise, c'est-à-dire que les effets de composés anti-oxydants naturels endogènes des grains, l'acide *p*-coumarique et autres acides phénoliques, sur la biosynthèse de DON/ADON par *F. graminearum* ont été testés.

### I.1. Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et autres composés oxydants sur la biosynthèse de TCT de type B

*Les résultats de l'étude ci-dessous sont détaillés dans la publication présentée en suivant. Les figures citées « Article1-Figure x » font référence à celles de l'article. Quel que soit le traitement appliqué, il a été vérifié que la cinétique d'accumulation de biomasse fongique au cours de la culture n'est pas modifiée.*

Afin d'identifier les phases de la cinétique de croissance de *F. graminearum* sensibles à l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons supplémenté les milieux de culture liquide soit au moment de l'inoculation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub>), soit 2 ou 7 jours après inoculation (respectivement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>7</sub>), c'est-à-dire respectivement en phases exponentielle et stationnaire de croissance. L'accumulation de DON/ADON dans les milieux de culture a été suivie pendant 30 jours (Article 1 - Figure 1).

Ajouter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM en début de culture (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub>) entraîne une activation importante de l'accumulation de DON/ADON 30 jours plus tard. S'il est ajouté 2 ou 7 jours après inoculation une inhibition de faible intensité de la biosynthèse de ces toxines est observée. Des données préliminaires (Ponts, *et al.*, 2003) ont montré que dès les



premières 24 heures après supplémentation H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est plus détectable dans les milieux de culture, ce qui suggère que la modulation à long terme de l'accumulation de DON/ADON est étroitement liée à des événements précoces comme la germination des spores. Cette hypothèse est dans la continuité des observations de Beyer, *et al.*, (2005) qui concluent à un lien entre le taux d'humidité relative au moment de la germination et le niveau de biosynthèse du DON 35 jours plus tard.

Notre hypothèse a été testée en pré incubant des spores dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 1 heure avant de les laisser germer en cultures liquides. Si la vitesse de germination n'est pas affectée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – le taux de 50 % de spores germées a été atteint en 2 heures, et 100 % des spores ont germé après 5 heures de culture (Article 1 - Figure 2) – il n'en est pas de même en ce qui concerne la biosynthèse de DON/ADON 40 jours plus tard. En effet, l'accumulation de toxines est significativement réduite dans les cultures inoculées avec des spores prétraitées avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Article 1 – Figure 3). Ces résultats montrent que même si la cinétique de germination des conidies de *F. graminearum* n'est pas affectée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les spores n'en restent pas moins sensibles ; l'expression du potentiel de la souche à produire des toxines semble très liée à l'environnement dans lequel sont ses spores dès l'étape d'activation de la germination.

Afin de compléter nos données en observant des effets plus immédiats de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'accumulation de DON/ADON, un mode de supplémentation quotidien a été testé. La première observation marquante est la disparition quasi intégrale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> introduit chaque jour, soit parce qu'il est dégradé par des enzymes excrétées par *Fusarium* soit qu'il pénètre dans les cellules et n'est donc plus détectable dans les milieux. La réalité résulte probablement des deux phénomènes en interactions. La deuxième observation, et non des moindres, est que, malgré un stress oxydatif très fort, l'accumulation en DON/ADON est activée, et ce de façon plus importante que lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est introduit de façon ponctuelle en début de culture (Article 1 - Figure 4). Ces données suggèrent une réponse adaptative du champignon dont un élément pourrait être une biosynthèse en DON/ADON plus rapide et plus importante. Une hypothèse possible est alors suggérée : les différences observées entre les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'accumulation de toxines en fonction du mode d'introduction considéré reflètent le potentiel différentiel de *F. graminearum* à réagir au stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon l'état physiologique de croissance et /ou de biosynthèse de ses toxines dans lequel il se trouve.

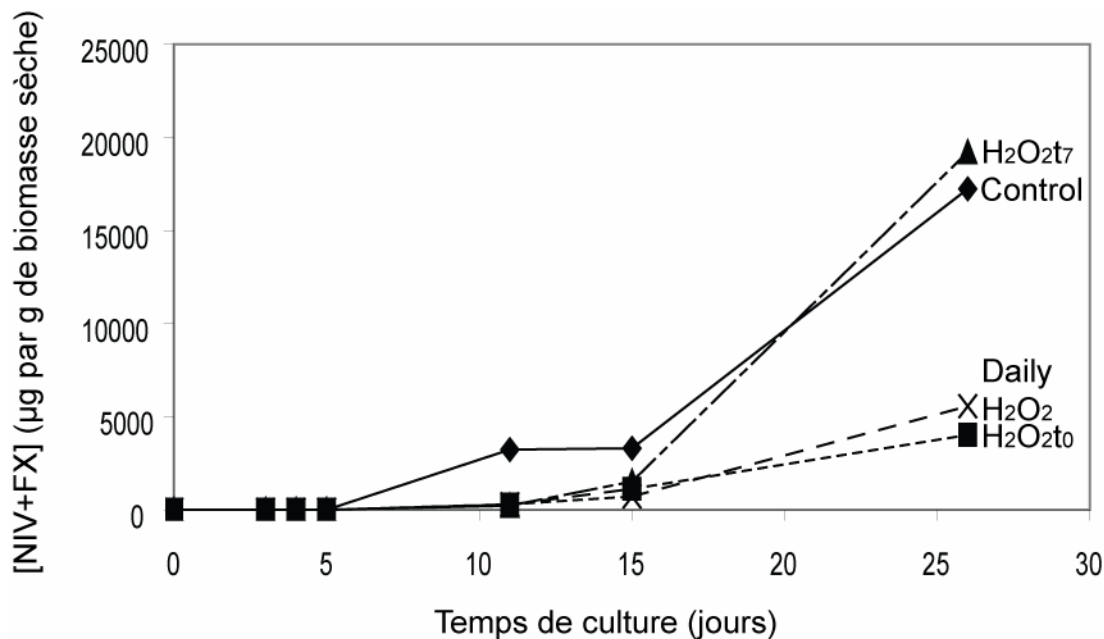


Figure 23 : Production de NIV/FX par *F. culmorum* en milieu GYEP supplémenté ou non par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM à différents temps de culture.

Tableau 14 : Effets différents de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de TCTB par *Fusarium* en fonction de l'espèce et/ou du chemotype considéré.

Mode de supplémentation	Effets de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5 mM sur la production de :	
	DON/ADON par <i>F. graminearum</i> après 30 jours de culture	NIV/FX par <i>F. culmorum</i> après 26 jours de culture
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t <sub>0</sub>	+ (× 2)	- (× 4,3)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t <sub>2</sub>	- (× 1,2)	<i>Essai non réalisé</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t <sub>7</sub>	- (× 1,2)	+?
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> quotidien	+ (× 6,7)	- (× 3,1)

+ = activation significative de la production de toxines (p = 0,05)

- = inhibition significative de la production de toxines (p = 0,05)

+? = allure croissante de la courbe n'excluant pas une activation de la production de toxines devenant significative à plus long terme

Les valeurs numériques entre parenthèses à la suite des signes + ou - indiquent l'amplitude de l'effet.

De façon similaire, les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de NIV/FX par *F. culmorum* ont été étudiés. Là encore, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été introduit dans les milieux de culture GYEP au moment de l'inoculation, 7 jours après inoculation ou encore de façon quotidienne. La figure 23 en présente les résultats (figure non incluse dans la publication). Les résultats observés sont alors très différents de ceux obtenus chez *F. graminearum* producteur de DON/ADON. Il apparaît que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> tout comme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ajouté quotidiennement dans les milieux inhibe de façon importante et significative la production de NIV/FX par *F. culmorum* (p<0,05), alors que la biosynthèse de DON/ADON par *F. graminearum* est significativement activée. Lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ajouté 7 jours après inoculation la production de NIV/FX est significativement inhibée après 11 jours et 15 jours de culture (p<0,05). Après 26 jours de culture il n'y a pas de différence significative entre les cultures traitées et les cultures témoin. De plus, l'allure fortement croissante de la courbe n'écarte pas l'hypothèse d'une activation de la biosynthèse de NIV/FX qui serait observable plus tard dans la cinétique. Cette tendance est, une nouvelle fois, à l'opposée de celle observée chez *F. graminearum* producteur de DON/ADON pour qui l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7 jours après inoculation semble réduire l'accumulation de toxines après 30 jours de culture (résultats synthétisés dans le tableau 14).

Ces résultats suggèrent que les effets observés sont espèce, souche, ou même chemotype dépendant. Cette dernière hypothèse pourrait être étayée des résultats de Nicholson *et al.* (2004) qui suggèrent que de la nature de la toxine produite sur un hôte donné dépend l'agressivité conférée : le DON semble être un facteur d'agressivité sur blé tandis que le NIV pourrait être un facteur d'agressivité sur maïs. Dans notre cas, *F. culmorum* ne semble pas s'adapter en termes de production de toxines à la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le milieu. La capacité d'une souche à maintenir sa production de toxines en conditions de stress oxydatif pourrait être un facteur favorisant sa progression dans la plante.

Dans le but de déterminer si les effets observés de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont spécifiques ou uniquement attribuables à son potentiel pro-oxydant, l'activation à long terme de l'accumulation de DON/ADON par l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> a été comparée aux effets du



diamide ou du methyl viologen (MV), molécules fortement oxydantes, introduits selon le même mode dans les milieux de culture (Article 1 - Figure 5).

MV 0,01 mM réduit de façon significative l'accumulation de DON/ADON après 11 jours de culture. Le diamide et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semblent tous deux activer la biosynthèse de toxines ce qui confirme l'effet activateur de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans nos conditions. Les effets différents de ces trois composés pro-oxydants démontrent que le potentiel oxydant seul ne suffit pas à expliquer les effets observés. Les mécanismes d'action de ces trois composés sont en effet très différents. MV est un générateur d'anions superoxydes et le diamide oxyde de façon préférentielle les groupements thiols (notamment ceux des résidus cystéine des protéines).

L'ensemble de ces résultats démontre que si des stress oxydatifs ne restent pas sans effet sur le métabolisme de *F. graminearum*, le micromycète n'en est pas moins capable de s'adapter à un stress par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en développant une forme probable de résistance. La supplémentation initiale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourrait être la première étape de conditionnement à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec des renforcements répétés lors des supplémentations quotidiennes. Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Medentsev, *et al.*, (2001) dont les résultats montrent qu'un pré-traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de cellules de *Fusarium decemcellulare* en phase logarithmique de croissance confère aux cellules en phase stationnaire de croissance une résistance à des niveaux plus élevés en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette résistance pourrait dépendre, du moins en partie, de la capacité de *Fusarium* à détoxiquer son milieu.

Une conséquence de cette adaptation pourrait alors être une augmentation de la biosynthèse de DON/ADON associée avec la résistance au stress par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En se replaçant dans le cadre des interactions plante/*Fusarium*, l'agressivité d'une souche donnée de *F. graminearum* pourrait dépendre du profil de production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'hôte. Dans ce cas, les trichothécènes pourraient représenter des éléments d'agressivité de *Fusarium*.





*Article 1 (en cours de publication dans FEMS Microbiology Letters) :*

**Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum***

**Nadia Ponts, Laetitia Pinson-Gadais, Marie-Noëlle Verdal-Bonnin,  
Christian Barreau, Florence Richard-Forget\***

INRA Centre de Bordeaux, UPR1264 MycSA, 71 Avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883 Villenave  
d'Ornon Cedex, France

**Abstract**

Liquid cultures of *Fusarium graminearum* were supplemented with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or other oxidative compounds; trichothecenes accumulation kinetics was followed. At a non lethal concentration, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments modulate toxins accumulation depending on the way of supplementation. When H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is added at the time of inoculation, higher levels of toxins accumulate 30 days later. Conversely, adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> two or seven days after inoculation has little effects. When H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is daily added in the course of the culture, trichothecenes accumulation is rapidly and strongly enhanced. The fungus may adapt to oxidative stress when the first exposition to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> occurs at the very beginning of the culture course, leading to higher accumulation of toxins. The highest levels of toxins are measured when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is daily added. The importance of the first hours of culture was confirmed: pre-treating conidia with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> does not affect their germination kinetic but leads to a reduction of trichothecenes yields 40 days later. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulation of trichothecenes accumulation may be specific since paraquat, another pro-oxidant compound, inhibits trichothecenes production. Considering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a major component of the oxidative burst occurring in pathogen/host interactions, these data support trichothecenes may act as virulence factors.

---

\* Corresponding author. Tel.: + 33 557122483; fax: +33 557122500. E-mail address: [fforget@bordeaux.inra.fr](mailto:fforget@bordeaux.inra.fr) (F. Richard-Forget)



**Keywords:** *Fusarium graminearum*, DON, trichothecenes biosynthesis, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, adaptation, oxidative stress

### 1. Introduction

*Fusarium graminearum* is a fungal pathogen that infects many plant species, and particularly cereals and corn. It is one of the causal agents of the *Fusarium* Head Blight (FHB) leading to reduced yields and therefore economic losses (Lori, *et al.*, 2003, Ioos, *et al.*, 2004, Xu & Berrie, 2005). Furthermore, some *F. graminearum* strains can produce mycotoxins belonging to the group of type B trichothecenes (TCTB), especially deoxynivalenol (DON) and its acetylated derivatives (3- and 15ADON). *In planta*, this capacity for toxin production may be a virulence factor (Cossette & Miller, 1995, Harris, *et al.*, 1999, Eudes, *et al.*, 2000). Acute TCTB toxicity is widely demonstrated upon animals and human beings. Several toxicological studies on animals and epidemiological data indicate probable chronic effects may affect human health (D'Mello, *et al.*, 1999). DON and derivatives are the toxins the most commonly found in Europe, America and Asia. Worldwide cereals contamination by *F. graminearum* leads to lower market value due to TCTB presence in kernels. Indeed, as TCTB are very stable - they resist to biodegradation and food processing, and no suitable detoxification procedure is currently available - maximum DON contamination levels in cereals and corn food stuffs have been recently settled in Europe (CE, 2005). New strategies allowing an efficient management of the mycotoxic risk could be implemented thanks to a better understanding of events leading to TCTB accumulation in kernels.

Previous works focused on the effects of *in vitro* substrates and kernels biochemical composition on TCTB production (Miller & Greenhalgh, 1985, O'Neill, *et al.*, 1993). They demonstrated a significant influence of carbon and nitrogen sources. *In planta*, the substrate composition may be greatly modified when *Fusarium* invasion occurs, triggering into the host several defence mechanisms. Among the broad range of defence responses, the generation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), is one of the earliest events (Repka, 1999, Kachroo, *et al.*, 2003). The occurrence of an oxidative burst of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been suggested inside the plant tissues infected by *Fusarium spp.* within the first five days after contamination (Zhou, *et al.*,



2005). Furthermore, it is suspected that combined effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-related enzymes (peroxidase, glucose oxidase, *etc.*) may improve plant resistance to initial infection by *Fusarium* (Somleva & Blechl, 2004). Since many oxidation steps are involved in TCTB biosynthesis (Sweeney & Dobson, 1999), the very strong oxidant characteristic of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may interfere with the fungus metabolism, and modulate TCTB yields. Previous data indicate DON production by *Fusarium* requires weak oxidant conditions (Miller & Blackwell, 1986), whereas recent *in vitro* experiments showed exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to enhanced DON-ADON production by *F. graminearum* (Ponts, *et al.*, 2003). This present study aims at clarifying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on DON-ADON biosynthesis by *F. graminearum*. The specificity of these effects was assessed by testing the other oxidative compounds paraquat and diamide.

## 2. Materials and methods

### 2.1 *Fusarium graminearum* strain

The *F. graminearum* strain CBS185.32 (Centraal Bureau voor Schimmelcultures, The Netherlands) was used throughout the study. It produces predominantly 15ADON, and at lower amount, DON. The strain was maintained on PDA slants at 4°C. When inoculums were required, spores suspensions were prepared by adding sterile distilled water to the slants with gentle shaking.

### 2.2 Liquid cultures

Experiments were performed in GYEP medium (Miller, *et al.*, 1983). Cultures were done in triplicate. 100 mL of GYEP in 500 mL-Erlenmeyer flasks were inoculated with 10<sup>6</sup> spores and incubated at 25°C and 150 rpm into darkness in a Multitron<sup>®</sup> incubator shaker (INFORS AG, Bottmingen, Switzerland). GYEP cultures were stopped by filtering under vacuum through Whatman<sup>®</sup> paper n°4; aliquot parts of the filtrates were stored at -20°C. TCTB levels were determined in culture filtrates. Fungal biomass production was determined by weighting the mycelia after 48 hours of freeze drying.

The cultures were supplemented with H<sub>2</sub>O (control), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM, diamide 0.5 mM



or paraquat 0.01 mM. For each experiment, control and treated cultures were always prepared using GYEP medium and inoculum from the same batch. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM was added to the culture media following four different methods: synchronised with inoculation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub>), two or seven days after inoculation (respectively H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>7</sub>), or daily. When H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was daily added, supplementation was performed in each Erlenmeyer flask every 24 hours.

For each trial, it was verified that supplementation does not modify pH values of the treated batches compared to the control. Similarly, it was verified fungal biomass accumulation is not affected by the treatment compared to the control.

### *2.3 Type B trichothecenes analysis*

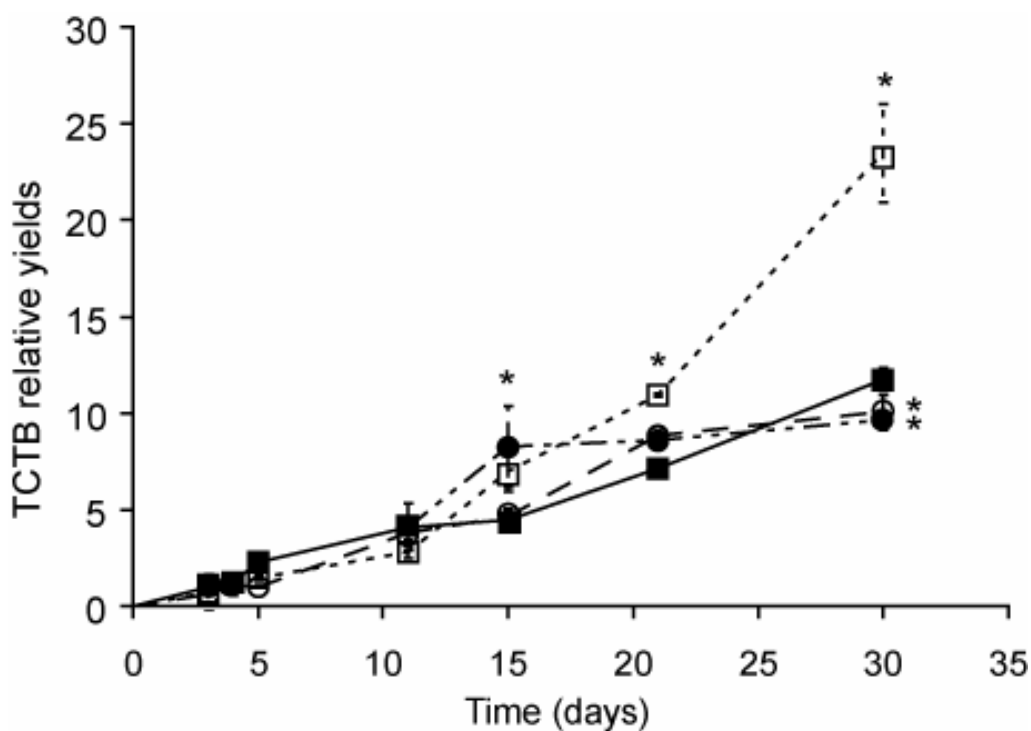
15 mL of filtrates were extracted with two volumes of ethyl acetate; twice 10 mL of the organic phase were evaporated to dryness at 70°C under a nitrogen beam. Dried samples were resuspended in 200 µL of methanol/water (50 %, v/v) before high performance liquid chromatography analysis (Bily, *et al.*, 2004).

### *2.4. Germination trial*

50 mL of either H<sub>2</sub>O or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM in Falcon<sup>®</sup> tubes topped with autoclaved Wathman<sup>®</sup> filter paper N°4 were inoculated with 0.625×10<sup>6</sup> spores and pre-incubated at 25°C into darkness. After 1 hour, spores did not appear turgescient and no spore had germinated. 100 mL GYEP in 500 mL-Erlenmeyer flasks were inoculated with 1 mL of pre-incubated suspensions and placed for 40 days at 25°C and 150 rpm into darkness in a Multitron<sup>®</sup> incubator shaker. After the first hour of pre-incubation and then every hour, 100 macroconidies were observed (classical microscopy) and germinated spores were numbered. We considered a spore was germinated when it had produced a germ tube equal in length to at least half the spore diameter (Dantigny, *et al.*, 2003).

### *2.5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trials*

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA). 500 µL of 50



**Figure 1: DON-ADON biosynthesis by *F. graminearum* in GYEP medium supplemented or not by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM at different time points during the culture course.** In plain line is the control; dashed lines represent the kinetics of toxins accumulation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM-supplemented media. Legend: ■ Control, □ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub>, ○ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>2</sub>, ● H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>7</sub>. The star \* indicates a significant difference when compared to the control ( $p \leq 0.05$ ). Data were normalised relative to the average DON-ADON yield after 3 days of control culture (4  $\mu$ g of DON plus 15ADON per gram of dry biomass). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> has long-term significant activating effect on DON-ADON accumulation, while H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>7</sub> have both little effects.



mM guaiacol in McIlvaine buffer (pH 5.5) and 1.25 unit of Horse Radish Peroxidase were added to 1 mL of filtered medium. Absorbance was immediately followed at 470 nm for 1 min. Quantification was performed by external calibration with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard solutions at concentrations ranging from 0 to 100 µM. The absence of fungal peroxidase activity in filtrates was always verified (Richard-Forget & Gaillard, 1997).

### ***2.6. Results expression and statistical analysis***

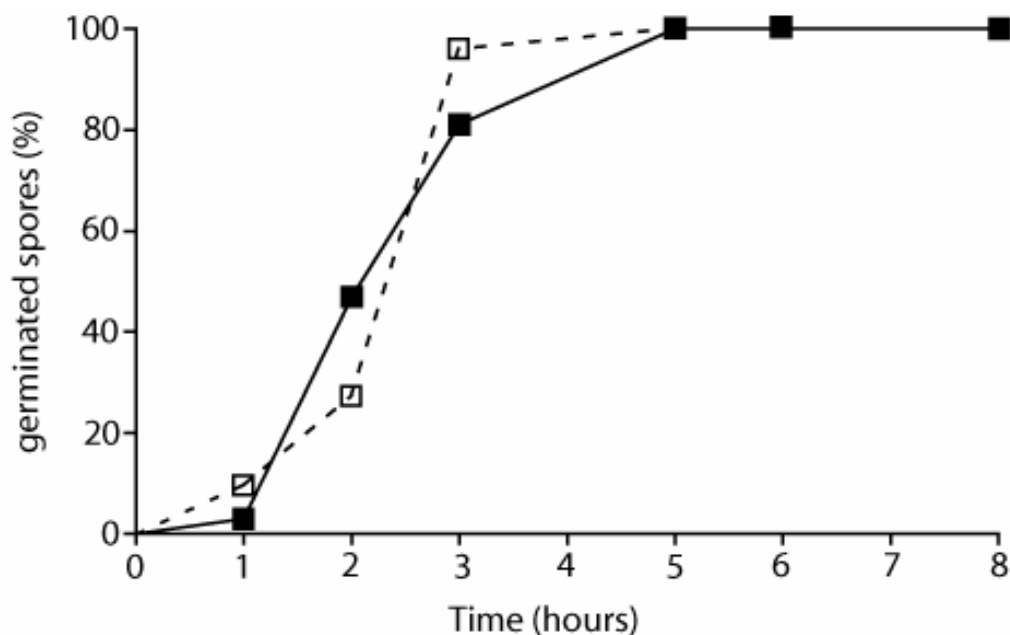
All the results were evaluated from repeated experiments using three parallel samples. Data were expressed as arithmetic mean values  $\pm$  SD. Toxins yields were expressed in microgram per gram of dry biomass. Then, data were normalised *versus* a given yield obtained in the control trial (normalisation factor). The normalisation factor used for each experiment is detailed in the legend of each figure. All observed effects either on DON or 15ADON accumulation processes were consistent: DON and 15ADON yields were summed (noted DON-ADON) without distinguishing both chemical species. Values were compared by computing standard Student's t-test (control *vs.* treated). The classical value 0.05 was chosen as the point of statistical significance throughout.

## **3. Results and Discussion**

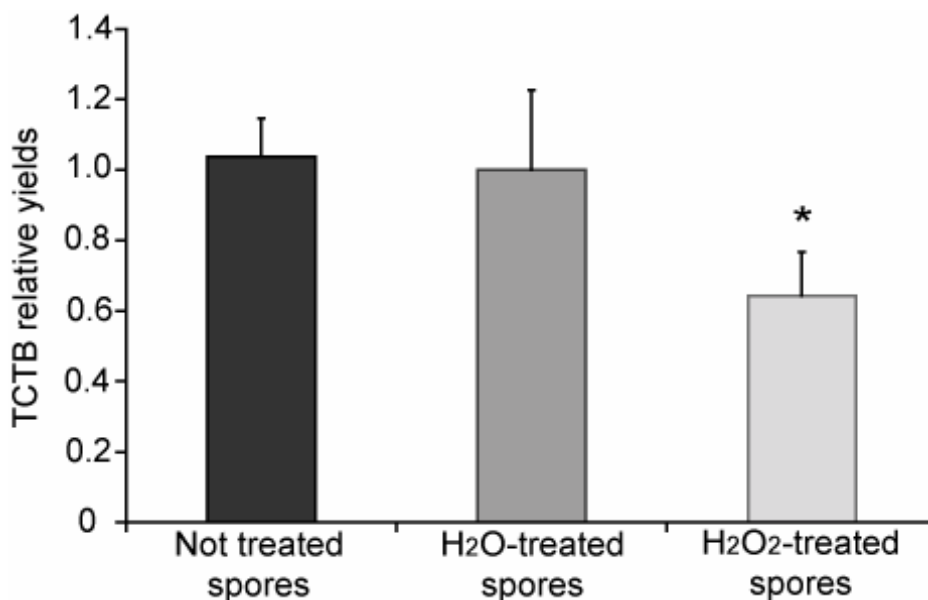
### ***3.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects***

#### ***3.1.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive stages during the fungal kinetics***

Cultures were supplemented with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the beginning of the culture (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub>), two days after inoculation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>2</sub>), or seven days after inoculation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>7</sub>). DON-ADON accumulation in culture media was followed for 30 days (figure 1). During the first 11 days of culture, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has no significant effect on TCTB accumulation. Whatever the way of supplementation, a shift in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> trend line occurs between 11 and 15 days of culture: TCTB accumulation is significantly more important in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub>-treated cultures than in the control. After 30 days of culture, TCTB yields are twice higher in



**Figure 2: Germination rates of *F. graminearum* macroconidies in GYEP after 1 hour of preincubation in H<sub>2</sub>O or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Every hour, 100 macroconidies were observed and germinated spores were numbered. In plain line is the control (*i.e.* after 1 hour of incubation into water); in dashed line is the 1 hour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-incubated spores germination kinetics. Germination rate is not affected by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.



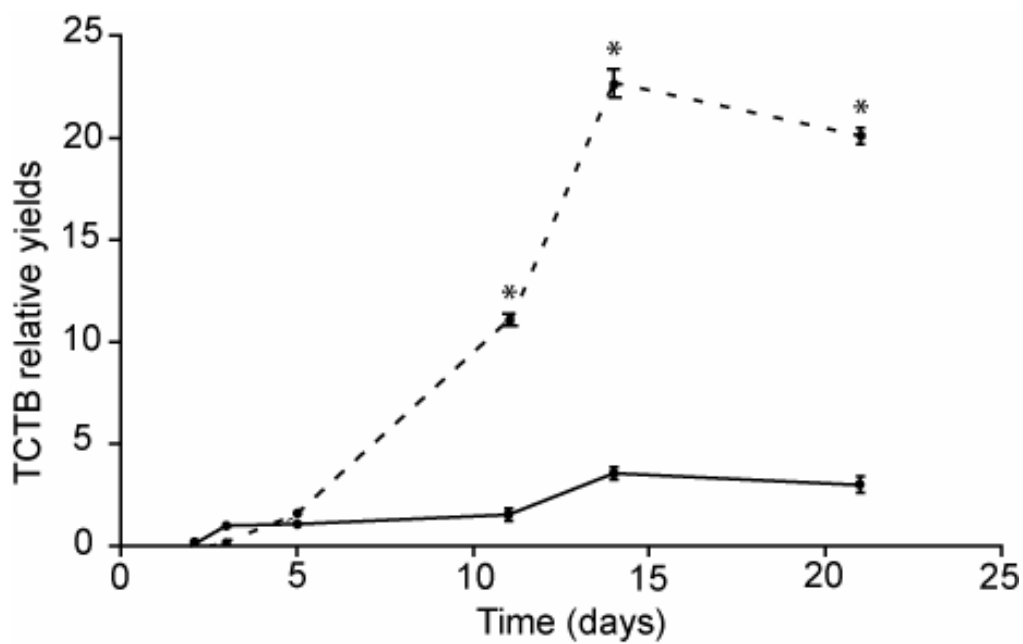
**Figure 3: DON-ADON accumulation after 40 days of GYEP cultures inoculated with spores pre-incubated, in water or hydrogen peroxide, or not-incubated for 1 hour.** The star \* indicates a significant difference when compared to the control ( $p \leq 0.05$ ). Data were normalised relative to the average DON-ADON yield in H<sub>2</sub>O-pre-incubated spores inoculated batches (40  $\mu$ g of DON plus 15ADON per gram of dry biomass). DON-ADON accumulation is reduced when spores were pre-incubated into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> treated cultures (p<0.05). These results are consistent with previous experiments that suggested H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment enhances DON-ADON accumulation in liquid cultures of *F. graminearum* (Ponts, *et al.*, 2003). The situation is different considering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>7</sub> trials. After 30 days of culture, TCTB accumulation kinetics seems to have reached a stationery stage in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>7</sub> supplemented media. These slowdowns in DON-ADON accumulation lead to a slight decrease of toxins accumulation in 30 day-old cultures.

These results show H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> supplementation has strong enhancing effects on DON-ADON accumulation 15 days later, that last as far as 30 days later. Previous data showed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> half- life in *Fusarium* GYEP cultures is about 16 hours (Ponts, *et al.*, 2003). It may suggest long-term DON-ADON accumulation modulation is closely linked with events occurring during the spore germination process. This is consistent with previous results that showed relative humidity during spore germination is related to DON biosynthesis levels 35 days later (Beyer, *et al.*, 2005). It was hypothesised the germination activation stage may be one of the possible critical steps for later DON-ADON accumulation.

### 3.1.2. Sensitivity of macroconidia to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*F. graminearum* conidia were incubated in the presence of either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or water, for 1 hour, that is to say during the germination activation stage. Germination kinetics of H<sub>2</sub>O-incubated spores was not different from not-incubated spores germination trend (data not shown). Figure 2 shows there is no difference between the treated and the untreated batches: around 50 % of the spores were germed two hours after inoculation, and 100 % after five hours. This is consistent with previous experiments dealing with fungal spore germination rate (Chitarra, *et al.*, 2004). Then, the cultures were grown for 40 days in order to determine if DON-ADON accumulation could be affected by pre-incubation. At the same time, a control set of cultures inoculated with not incubated spores was run. TCTB yields are reported in figure 3. TCTB yields in the cultures inoculated with not incubated spores were not different from the yields measured in the cultures inoculated with water-incubated spores. In cultures inoculated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-incubated spores, DON-ADON accumulation is significantly reduced (p<0.05).



**Figure 4: DON-ADON accumulation in GYEP medium daily supplemented or not by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM.** In plain line is the control; dashed lines represents the kinetics of TCTB accumulation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5mM-daily supplemented media. The star \* indicates a significant difference when compared to the control ( $p \leq 0.05$ ). Data were normalised relative to the average DON-ADON yield after 3 days of control culture (3  $\mu$ g of DON plus 15ADON per gram of dry biomass). Daily H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates DON-ADON production.

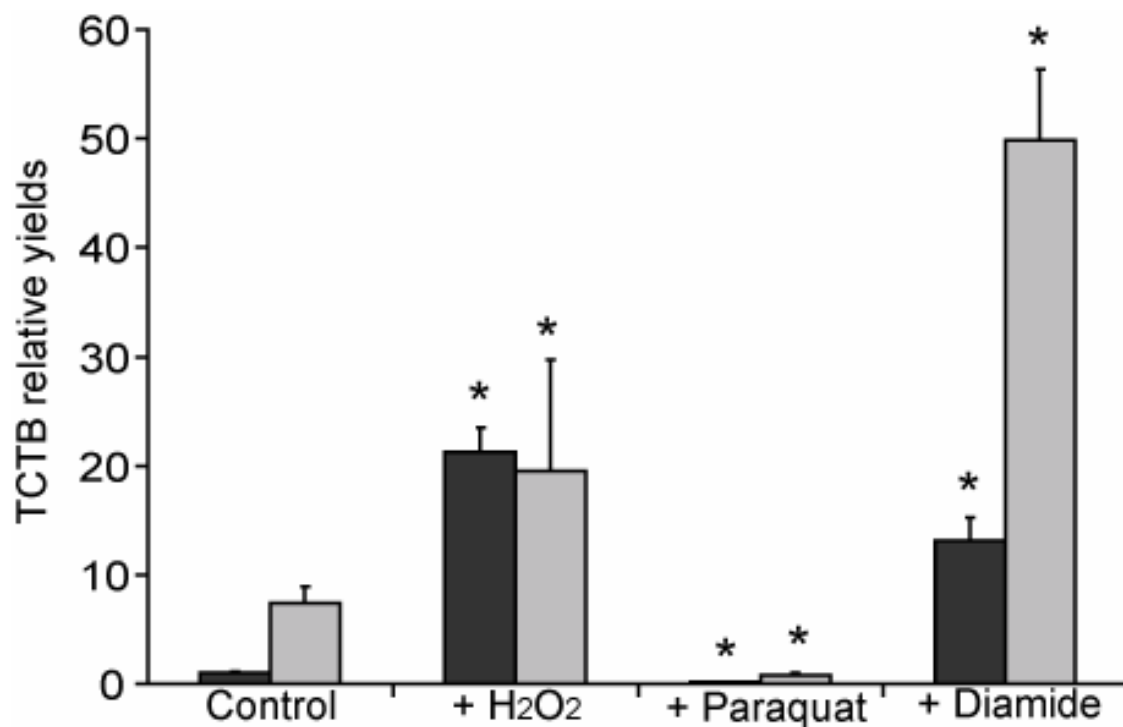
These observations suggest *F. graminearum* conidia are H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive even if germination rate is not affected. Expression of its toxin-producing potential by the fungus is closely linked to the biochemical environment surrounding its spores during germination. An H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-treatment of the spores reduces DON-ADON accumulation while H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> treatment enhances it. This observation is not surprising. Indeed, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> half-life is about 16 hours in our conditions of liquid cultures. As a consequence, exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress lasts reasonably longer in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> treatment trial than when spores are pre-incubated for one hour in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### *3.1.3. Direct effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol accumulation kinetic*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was daily added to the culture media (daily H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for the all duration of a 21 day-long culture. Daily H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not detectable anymore 24 hours after each supplementation (data not shown). Figure 4 shows very strong H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activating effect that is observed after 11 days of culture. After 21 days, TCTB accumulation is 6.7 times higher under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment than in the control cultures. This activation is more efficient than the one observed when the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> experiment was performed.

### *3.1.4. Section conclusion*

The results of these experiments show, according to timing of the treatment, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has differential and lasting effects on TCTB biosynthesis by *F. graminearum*. A point treatment synchronised with inoculation enhances DON-ADON accumulation while later treatment did not exhibit such drastic effects. Spore germination rate is not affected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nevertheless, DON-ADON accumulation is reduced when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-incubated spores are grown for 40 days. This observation may indicate levels of DON-ADON that will accumulate are H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated as soon as the germination initiation stage. As trichothecenes seem to be virulence factors for plant infection, these observations may indicate *Fusarium* aggressiveness is H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-modulated since the germination initiation stage. This should be further tested in field experiments. These results further enlighten the strong imprint of the germination process on TCTB production. A daily



**Figure 5: DON-ADON relative yields after 11 and 29 days of incubation in GYEP medium supplemented or not by either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM, diamide 0.5 mM or paraquat 0.01 mM.** The star \* indicates a significant difference when compared to the control ( $p \leq 0.05$ ). Data were normalised relative to the average DON-ADON yield in the 11 day-old cultures (17  $\mu$ g of DON and 15ADON per gram of dry biomass). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diamide both activate DON-ADON production while paraquat inhibits it.

supplementation has much more drastic effects on TCTB accumulation than a treatment at one time point which suggests an adaptative response of the fungus to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. The differences among the observed TCTB accumulation kinetics in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub>, t<sub>2</sub> or t<sub>7</sub> experiments could reflect *F. graminearum* ability to differently react to oxidative stress considering its growing and/or TCTB producing state, *i.e.* the number of fungal cells present in the culture and/or their different physiological state.

### 3.2. Effects of other oxidant compounds: paraquat and diamide effects

The experiment was run for 11 and 29 days (figure 5). After 11 days of culture, toxins accumulate 20 times more in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- supplemented media than in the control. This H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced activation occurs earlier than expected from the experiments described in section 3.1. This tendency could be ascribed to biological variations as the fungus can behave following slightly different timings from batch to batch. Nevertheless, the observed toxin-accumulation trend remains consistent between the batches. In diamide-supplemented cultures, DON-ADON accumulates 13 times more than in control cultures. By contrast, paraquat exerts strong inhibitory effects as DON-ADON accumulate nearly 10 times less than in the control experiment. In 29-days old cultures, the tendencies are confirmed for all the treatments. It is noticeable that after 11 days of culture H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the strongest activator compound, while after 29 days diamide is about twice more efficient than H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A first explanation can be that, in aqueous solutions, diamide is more stable than H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thus, diamide can exhibit direct effects much longer. A second explanation can be found in the oxidant properties of the compounds. Diamide is a specialised oxidant while H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a generic oxidant. Indeed, while H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disturbs cells redox equilibriums in a non-specific manner, diamide mainly acts towards GSH oxidations (Wax, *et al.*, 1970, Leoncini & Maresca, 1983). Therefore, the events leading to the modification of the redox status of cells by diamide may take longer time to occur. Nevertheless, both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and diamide enhanced DON-ADON accumulation. Conversely, paraquat seems to be a strong inhibitor of toxins production. This indicates that the observed trends are not entirely attributable to the oxidant potentials of the compounds but to other properties. Paraquat generates superoxide anions (Katz, *et al.*, 1993), diamide is a thiol-oxidising agent, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts as a signal molecule in many





cascade reactions.

### 3.3. Discussion

These results demonstrated strong H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on DON-ADON biosynthesis by *F. graminearum* and further enlightened about DON-ADON accumulation modulation by different pro-oxidant compounds.

Our data suggest *F. graminearum* is able to adapt to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. This is consistent with previous experiments (Medentsev, *et al.*, 2001): a one hour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre-treatment of logarithmic-phase cells from *Fusarium decemcellulare* cultures leads to the development of resistance to higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in stationary-phase cells. It was shown fungi can rapidly breakdown exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gil-Ad & Mayer, 1999, Pons, *et al.*, 2003). This ability in detoxifying the medium may be a key factor of fungus adaptation. This hypothesis is supported by recent results showing non-lethal levels of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulate fungal catalase and superoxide dismutase activities, two major radical-scavenging enzymes (Angelova, *et al.*, 2005). As a result to this adaptation, DON-ADON enhanced accumulation, observed in the case of *F. graminearum*, could be associated with resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It may explain DON-ADON accumulation is much more enhanced when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supplementation is repeated every day of the culture course. Finally, some of our preliminary trials showed nivalenol and fusarenone X accumulation in liquid cultures of *Fusarium culmorum* is not affected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment of stationary-phase cells (nivalenol and fusarenone X are both toxins belonging to the TCTB family of toxins). Conversely, daily H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>t<sub>0</sub> have both inhibitory effects on nivalenol and fusarenone X biosynthesis. After 26 days of culture, between 3 and 4.5 times less toxins accumulate in treated cultures (preliminary data not shown). This is apparently not consistent with our results dealing with DON-ADON biosynthesis by *F. graminearum* under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. However, it is strongly possible that the observed effects depend on the species, the nature of the toxins that are produced, or even the strain. Several *Fusarium* individuals should be tested.

Considering plant/pathogen interactions, *Fusarium* adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress may explain differences in *F. graminearum* virulence levels depending on its host H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-production pattern. In this case, trichothecenes may act as virulence factors.



### References

- [1] Lori, GA, Sisterna, MN, Haidukowski, M & Rizzo, I (2003) *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research* 158: 29-35.
- [2] Ios, R, Belhadj, A & Menez, M (2004) Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* 158: 351-362.
- [3] Xu, XM & Berrie, AM (2005) Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with *Fusarium* ear blight and apple blue mould: A review. *Food Additives and Contaminants* 22: 290-301.
- [4] Cossette, F & Miller, JD (1995) Phytotoxic effect of deoxynivalenol and *Gibberella* ear rot resistance of corn. *Journal of Natural Toxins* 3: 383-388.
- [5] Harris, LJ, Desjardins, AE, Plattner, RD, Nicholson, P, Butler, G, Young, JC, Weston, G, Proctor, RH & Hohn, TM (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* 83: 954-960.
- [6] Eudes, F, Comeau, A, Rioux, S & Collin, J (2000) Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with *Fusarium* in wheat head blight. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 286-292.
- [7] D'Mello, JPF, Placinta, CM & MacDonald, AMC (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80: 183-205.
- [8] CE (2005) Règlement (CE) N 856/2005 de la Commission du 6 juin 2005 modifiant le règlement (CE) n 466/2001 en ce qui concerne les toxines du *Fusarium*. *Journal Officiel de l'Union Européenne* Vol. L 143: 3-8.
- [9] Miller, JD & Greenhalgh, R (1985) Nutrients effects on biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia* 77: 130-136.
- [10] O'Neill, K, Damoglou, AP & Patterson, MF (1993) Toxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344 and *Fusarium graminearum* NRRL 5883 on grain substrates. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 625-628.
- [11] Repka, V (1999) Improved Histochemical Test for In Situ Detection of Hydrogen Peroxide in Cells Undergoing Oxidative Burst or Lignification. *Biologia Plantarum* 42: 599-607.
- [12] Kachroo, A, He, Z, Patkar, R, Zhu, Q, Zhong, J, Li, D, Ronald, P, Lamb, C & Chattoo, BB (2003) Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Transgenic Rice Leads to Cell Death and Enhanced Resistance to Both Bacterial and Fungal Pathogens. *Transgenic Research* 12: 577-586.
- [13] Zhou, WC, Kolb, FL & Riechers, DE (2004) Identification of proteins induced by *Fusarium* head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). 2nd Symposium on *Fusarium* Head Blight 1: 233.
- [14] Somleva, MN & Blechl, AE (2004) Characterization of organ specific promoters in transgenic wheat. *National Fusarium Head Blight 2nd Forum Proceedings*. 1: 263-267.
- [15] Sweeney, MJ & Dobson, ADW (1999) Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 175: 149-163.



## Chapitre 2 : Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de composés associés sur la biosynthèse de TCTB

---

- [16] Miller, JD & Blackwell, BA (1986) Biosynthesis of 3-acetyldeoxynivalenol and other metabolites by *Fusarium culmorum* HLX 1503 in a stirred jar fermentor. Canadian Journal of Botany 64: 1-5.
- [17] Ponts, N, Pinson-Gadais, L & Richard-Forget, F (2003) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on Trichothecenes B (DON, ADON) production by *Fusarium graminearum* in liquid culture. Aspects of Applied Biology No.68: 223-228.
- [18] Miller, JD, Young, JC & Trenholm, HL (1983) *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. Canadian Journal of Botany 61: 3080-3087.
- [19] Bily, AC, Reid, LM, Savard, ME, Reddy, R, Blackwell, BA, Campbell, CM, Krantis, A, Durst, T, Philogene, BJR, Arnason, JT & Regnault-Roger, C (2004) Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. Mycopathologia 157: 117-126.
- [20] Dantigny, P, Guilmart, A & Bensoussan, M (2003) Predictive mycology: some definitions. Cryptogamie Mycologie 24: 377-383.
- [21] Richard-Forget, FC & Gaillard, FA (1997) Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: A possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 2472-2476.
- [22] Beyer, M, Verreet, JA & Ragab, WS (2005) Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. International Journal of Food Microbiology 98: 233-240.
- [23] Chitarra, GS, Abee, T, Rombouts, FM, Posthumus, MA & Dijksterhuis, J (2004) Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. Applied and Environmental Microbiology 70: 2823-2829.
- [24] Wax, R, Rosenberg, E, Kosower, NS & Kosower, EM (1970) Effect of the thiol-oxidizing agent diamide on the growth of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 101: 1092-1093.
- [25] Leoncini, G & Maresca, M (1983) The effect of diamide and glutathione on the uptake of glucose by human erythrocytes. Italian Journal of Biochemistry 32: 102-110.
- [26] Katz, E, De Lacey, AL & Fernandez, VM (1993) Covalent binding of viologen to electrode surfaces coated with poly(acrylic acid) formed by electropolymerization of acrylate ions. 2. Effect of the ionization state of the polymeric coating on the formal potential of viologen. Journal of Electroanalytical Chemistry 358: 261-272.
- [27] Medentsev, AG, Arinbasarova, AY & Akimenko, VK (2001) Adaptation of the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* to oxidative stress. Microbiology 70: 26-30.
- [28] Gil-Ad, NL & Mayer, AM (1999) Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Letters 176: 455-461.
- [29] Angelova, MB, Pashova, SB, Spasova, BK, Vassilev, SV & Slokoska, LS (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. Mycological Research 109: 150-158.
- [30] Proctor, RH, Hohn, TM & McCormick, SP (1995) Reduced Virulence of *Gibberella zeae* Caused by Disruption of a Trichothecene Toxin Biosynthetic Gene. Molecular Plant-Microbe Interactions 8: 593-601.



## **I.2. Propriétés anti-oxydantes de l'acide *p*-coumarique et autres acides phénoliques et biosynthèse de TCT de type B par *F. graminearum***

*Les résultats de l'étude ci-dessous sont détaillés dans la publication présentée en suivant. Les figures citées « Article 2 – Figure x » font référence à celles de l'article.*

Les effets de 5 acides phénoliques, acides férulique, *p*-coumarique, caféique, syringique et *p*-hydroxybenzoïque, ont tout d'abord été testés sur la croissance radiaire de *F. graminearum* CBS185.32 en culture sur milieu gélosé. Les doses inhibant 50 % de la croissance (IC<sub>50</sub>) ont été établies pour chacun des 5 composés. Le composé le plus fongitoxique est l'acide férulique avec une IC<sub>50</sub> égale à 3,4 mM. A l'opposé, aucune inhibition de croissance n'a été mesurée en présence d'acide *p*-hydroxybenzoïque (Article 2 – Table 1). Il s'avère que la toxicité observée des acides phénoliques est fortement corrélée avec leurs lipophilicités : les acides phénoliques les plus toxiques sont ceux qui traversent le plus facilement la membrane plasmique. Ainsi, l'acide le moins lipophile est l'acide *p*-hydroxybenzoïque qui est aussi le seul à ne pas montrer d'effet toxique sur la croissance de *F. graminearum*.

Après 21 jours de culture, l'accumulation de toxines est seulement 2 fois plus importante dans les cultures supplémentées. Ceci peut résulter d'une disparition, dégradation et/ou piégeage de l'acide *p*-coumarique extracellulaire au cours du temps. Il semble en effet que l'acide *p*-coumarique soit stable pendant environ 24 heures dans nos conditions, mais qu'après 48 heures de culture il n'est plus détecté sans qu'aucune activité enzymatique de dégradation n'ai été mise en évidence (Favre, 2004 ; données non publiées). Il est alors probable que la diminution des quantités en acide *p*-coumarique extracellulaire soit en grande partie attribuable à la pénétration du composé dans le compartiment intracellulaire comme c'est le cas de l'acide férulique dont la lipophilicité est proche de celle de l'acide *p*-coumarique (Bily, 2003).

Afin d'observer les effets les plus nets et les plus directs possibles, les effets des acides férulique, caféique, syringique, *p*-hydroxybenzoïque et *p*-coumarique ont été étudiés après 11 jours de culture. Tous les acides phénoliques ont été testés à la concentration finale de 0,5 mM. A cette dose, le seuil IC<sub>10</sub> n'est franchi pour aucun des





acides phénoliques testés (Article 2 – Figure 2). Les acides férulique, *p*-coumarique et caféique, tous trois dérivés de l'acide cinnamique, activent la production de DON/15ADON par *F. graminearum* avec des efficacités respectivement égales à 11, 20 et 19 fois. Les acides syringique et *p*-hydroxybenzoïque sont dérivés de l'acide benzoïque. Le premier n'a pas d'effet significatif sur la production de toxines, l'acide *p*-hydroxybenzoïque inhibe 3,6 fois l'accumulation de DON et de 15ADON. Les niveaux d'accumulation de TCTB sont très fortement corrélés avec les potentiels anti-oxydants des acides phénoliques ( $r = 0,89$ ) : plus les capacités anti-oxydantes des composés testés sont importantes, plus le niveau d'accumulation de toxines est élevé. Ces données sont en accord avec les résultats de Miller & Blackwell, (1986) qui indiquent que la biosynthèse de TCTB par *Fusarium* nécessite des conditions oxydantes faibles. En revanche, les potentiels anti-oxydants des composés ne sont pas suffisants pour expliquer totalement l'activation de la production de DON et de 15ADON. En effet, nous avons testé dans les mêmes conditions les effets du butylhydroxytoluène (BHT), un composé anti-oxydant commercial utilisé en agroalimentaire (E-321), dont le potentiel anti-oxydant est proche de celui de l'acide syringique. Si l'acide syringique ne semble pas avoir d'effet observable sur la production de DON et de 15ADON, le BHT 0,5 mM l'active 24 fois. Une première ébauche d'explication pourrait résider dans le fait que le BHT est très lipophile (molécule très alkylée). Son excellente capacité à traverser les membranes pourrait compenser un potentiel anti-oxydant plus faible.

Ensuite (et surtout), les effets des acides phénoliques ne sont pas uniquement attribuables à leurs capacités anti-oxydantes. Ces acides ont de multiples cibles potentielles ; en particulier, ils sont des inhibiteurs d'activités enzymatiques oxydasiques (de type phénol oxydase, peroxydase, lipoxygénase etc.) mais aussi d'activités hydrolytiques. L'acide *p*-hydroxybenzoïque est un excellent exemple : cet acide présente des propriétés anti-oxydantes très faibles et est peu lipophile, mais pourtant il inhibe fortement l'accumulation de toxines. L'acide *p*-hydroxybenzoïque est également susceptible d'induire chez *Aspergillus* l'expression du gène *FaeB* qui code une feruloyl esterase, enzyme hydrolytique fongique responsable de la dégradation du xylane et de la pectine ce qui, *in planta*, conduit à la libération de divers composés phénoliques dont l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique (De Vries & Visser, 2001, De Vries, *et al.*, 2002). Les sécrétions de telles enzymes hydrolytiques comme leurs



activités enzymatiques sont modulées par les acides phénoliques (Reynoso, *et al.*, 2002, Paul, *et al.*, 2003). D'un autre côté, l'acide benzoïque est un inhibiteur des tyrosinases fongiques (Reid, *et al.*, 1992), ce qui est particulièrement intéressant dans la mesure où les phénol oxydases ou PO (les tyrosinases sont des PO particulières) sont des enzymes capables d'oxyder les composés phénoliques en quinones et ainsi d'en modifier les propriétés. Le caractère fongitoxique des formes quinoniques des acides phénoliques a été décrit par Gomez-Vasquez, *et al.*, (2004).

Les capacités des acides phénoliques à moduler les expressions d'activités enzymatiques peuvent être une piste de recherche quant aux mécanismes impliqués derrière les modulations de la production de DON et de 15ADON par *F. graminearum*.



*Article 2 (en cours de publication dans Journal of Applied Microbiology) :*

**Effect of anti-oxidant phenolic acids on *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol biosynthesis**

**N. Ponts, L. Favre, L. Pinson-Gadais, A.L. Boutigny, C. Barreau and  
F. Richard-Forget\***

INRA Centre de Bordeaux, UPR1264 MycSA, 71 Avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883 Villenave  
d'Ornon Cedex, France

**ABSTRACT**

**Aims:** To evaluate the fungistatic potential of the phenolic acids ferulic, *p*-coumaric, caffeic, syringic or *p*-hydroxybenzoic on *Fusarium graminearum*, and to determine how deoxynivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol accumulation in liquid cultures of *F. graminearum* may be modulated by these phenolic acids.

**Methods and Results:** Growth inhibition tests were performed on PDA plates. All phenolic acids, except for *p*-hydroxybenzoic, had fungistatic effect. IC<sub>50</sub> ranged from 3.4 mmol l<sup>-1</sup>, with regard to ferulic acid, to 10.5 mmol l<sup>-1</sup>, with regard to caffeic acid. Effects of phenolic acids on toxins accumulation were tested in GYEP cultures, at concentrations that do not affect biomass production. Ferulic and *p*-coumaric acids enhanced toxins accumulation, respectively 11 and 20 times. Syringic acid had no effect, and *p*-hydroxybenzoic supplementation strongly decreased toxins accumulation. Caffeic acid effect was unclear.

**Conclusions:** Effects of phenolic acids on deoxynivalenol and 15-deoxynivalenol production are linked to their anti-oxidant properties: the more anti-oxidant compounds are, the more toxins accumulate.

**Significance and Impact of the Study:** This study suggests that cereals composition in term of phenolic acids may be considered in selecting varieties with lower sensitiveness to mycotoxinogenesis.

---

\* Correspondence to: Florence Richard-Forget, INRA Centre de Bordeaux, UPR1264 MycSA, 71 Avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France (e-mail: [fforget@bordeaux.inra.fr](mailto:fforget@bordeaux.inra.fr))



Keywords: *Fusarium graminearum*, phenolic acid, anti-oxidant, *p*-coumaric, ferulic, DON

### INTRODUCTION

*Fusarium graminearum* is a prevalent phytopathogen on cereals and corn. *In planta*, it induces *Fusarium* Head Blight which main symptom is kernel tissue necrosis (Dalcero, *et al.*, 1997, Lori, *et al.*, 2003, Ioos, *et al.*, 2004, Xu & Berrie, 2005). Furthermore, some *F. graminearum* strains can produce deoxynivalenol (DON) and its 3- and 15-acetylated forms (3ADON and 15ADON) that belong to the type B trichothecens family of mycotoxins (TCTB). These toxins are considered as virulence factors for fungal infection (Cossette & Miller, 1995, Proctor, *et al.*, 1995, Harris, *et al.*, 1999, Eudes, *et al.*, 2000). DON was also called vomitoxin because of its historical discovery as a food and feed chain contaminant that can cause vomiting. Its toxicity has been well documented and represents a predicted public health problem in a close future (D'Mello & MacDonald, 1997, D'Mello, *et al.*, 1999). TCTB are highly stable. Their presence on kernels cannot be reduced by post harvest treatments because they resist to biodegradation, food processing, and to any suitable detoxification procedure available at the present time. In June 2005, maximum DON contamination levels in cereals and corn food stuffs have been settled in Europe (CE, 2005). As a matter of facts, limiting toxins occurrence in kernels becomes essential to manage the mycotoxicological risk.

The TCTB biosynthesis pathway, and also factors that can modulate it, are not fully understood. Previous works focused on the effect of biochemical composition of kernels *and in vitro* substrates on TCTB production without clear consistency (Miller & Greenhalgh, 1985, O'Neill, *et al.*, 1993). Several data indicate pro-oxidant compounds have strong effect on DON/ADON biosynthesis by *F. graminearum* (Angelova, *et al.*, 2005). In particular, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seems to have long-term activating effect while fungal biomass accumulation kinetics is not affected (Ponts, *et al.*, 2005). Nevertheless, the link between pro-oxidant parameters and DON/ADON accumulation has not been clearly identified. The present study aimed at completing these data using a reverse strategy: effects of anti-oxidant compounds on fungal growth and TCTB *in vitro* accumulation were tested. Phenolics are typical cereal and corn compounds with important anti-oxidant properties (Wallace & Fry, 1994, Bily, 2003). In corn kernels,





monomers and dimers of ferulic acid are largely predominant (Bakan, *et al.*, 2003). Phenolics are extensively studied with regards to *Fusarium* head blight and are known to be involved in the disease resistance (Friend, 1977, Vidhyasekaran, *et al.*, 1986, Bily, 2003). For example, phenolics content is higher in resistant maize silks infected with *F. graminearum* than in sensitive *Fusarium*-infected maize silks (Reid, *et al.*, 1992). Furthermore, some phenolics are toxic for several fungi and may inhibit their productions of mycotoxins. Caffeic and ferulic acids can reduce fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium verticillioides* (Beekrum, *et al.*, 2003). Aflatoxin production by *Aspergillus* is reduced by the phenolics benzoic acid (Chiple & Uraih, 1980), ferulic acid (Chiple & Uraih, 1980) and syringaldehyde and sinapinic acid (Hua, *et al.*, 1999). It has been suggested that the soluble phenolic compounds of the germ may play a significant role in trichothecens yields measured on *Fusarium*-infected corn kernels (Bakan, *et al.*, 2003). Finally, a preliminary experiment reported caffeic, ferulic, *p*-coumaric and 3-hydroxybenzoic acids as inhibitors of 15ADON production by *F. graminearum* (Bily, 2003). However, no evidence allowed concluding at any relationship between the anti-oxidant potential of these compound and the amplitude modulation of the effects on trichothecens accumulation.

In order to enlighten about modulation of TCTB accumulation by anti-oxidant compounds, five phenolic acids (ferulic, *p*-coumaric, caffeic, syringic and *p*-hydroxybenzoic acids) were tested. These phenolic acids were chosen for their relative abundance in cereals and their well known anti-oxidant capacities. Their effects on *F. graminearum* growth and on DON and 15ADON production were described.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Fusarium graminearum* strain

The *F. graminearum* strain CBS185.32 (Centraal Bureau vor Schimmelcultures, The Netherlands) was used throughout the study. It produces predominantly 15ADON, and at lower amount, DON. The strain was maintained on PDA slants at 4°C. When inoculums were required, spores suspensions were prepared by adding sterile distilled water to the slants with gentle shaking.

#### Growth inhibition tests



Growth inhibition tests were performed on PDA medium in Petri dishes (diameter 10 cm). PDA media were supplemented with the phenolic acid ferulic, *p*-coumaric, caffeic, syringic or *p*-hydroxybenzoic (Sigma-Aldrich Co, St Louis, USA), at 2, 3, 4, 5 or 6 mmol l<sup>-1</sup> (phenolic acids were solubilised in absolute ethanol).

For each condition, plates in triplicates were incubated at 25°C for five days, that is to say until 80 % of the Petri dish area would be overrun in the control dishes. In each plate, the mycelium extension value was given as the average of two perpendicular diameters length measurement (in cm). Growth Inhibition Values (GIV) were expressed as the average percentage of overrunning in control dishes minus the average percentage of overrunning in treated dishes. For each phenolic acid the relation  $GIV = f([\text{Phenolic Acid}])$  was plotted and Inhibitory Concentration 50 (IC<sub>50</sub>) was determined for GIV = 50 % by linear regression.

### **Liquid cultures**

The liquid medium GYEP was used throughout the study (Miller, *et al.*, 1983). The treated cultures were supplemented before inoculation with the phenolic acid ferulic, *p*-coumaric, caffeic, syringic or *p*-hydroxybenzoic (solubilized in absolute ethanol). For each tested compounds, the final concentration in phenolic acid was fixed to 0.5 mmol l<sup>-1</sup>. The control cultures were supplemented with the same volume of absolute ethanol.

100 ml GYEP in 500 ml-Erlenmeyer flasks were inoculated with 10<sup>6</sup> spores and incubated at 25°C and 150 rpm into darkness in a Multitron<sup>®</sup> incubator shaker (INFORS AG Switzerland). For each experiment, control and treated cultures were always prepared using GYEP medium and inoculum from the same batch. GYEP cultures were stopped by filtering under vacuum through Whatman<sup>®</sup> paper n°4; aliquot parts of the filtrates were stored at -20°C. TCTB levels were determined in culture filtrates and fungal biomass production was determined by weighting the mycelia after 48 h of freeze drying.

### **TCTB analysis**

15 ml of standard culture filtrates were extracted with 30 ml of ethyl acetate; twice 10 ml of the organic phase were evaporated to dryness at 70°C under a nitrogen beam.

**Table 1** Experimental IC<sub>50</sub> of five phenolic acids

Phenolic acid	Experimental IC <sub>50</sub> (mmol l <sup>-1</sup> )
Ferulic acid	3.4
<i>p</i> -Coumaric acid	5.2
Syringic acid	5.1
Caffeic acid	10.5
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	No growth inhibition

Dried samples were resuspended in 200 µl of methanol/water (50 %, v/v) before HPLC analysis.

The HPLC analysis procedure was adapted from (Bily, *et al.*, 2004). Analyses were performed on the Hewlett-Packard ChemStation Series 1100 LC-DAD system. TCTB were separated on a Zorbax Eclipse XDB-C8 column (5 µm, 150 mm × 4.6 mm; Agilent Technologies, Palo Alto USA) by an acetonitrile gradient increasing from 5 % to 30 % in 14 min, then reaching 100 % in 10 min, 100 % hold for 5 min before returning to 5 % in 2 min (flow set on 1 ml min<sup>-1</sup>). Injection volume was set on 5 µl. Analyses were monitored at 230 nm.

### **Results expression and statistical analysis**

All the results were computed from repeated experiments using three parallel samples. Data collected from different series of tests were comparable after standardisation by expressing toxins levels in micrograms per gram of dry biomass over the yield measurement after 11 days of culture in the corresponding control test. All observed effects either on DON or 15ADON accumulation processes were consistent: DON and 15ADON yields were summed (noted DON-ADON) without distinguishing both chemical species. Data are expressed as arithmetic mean values ± SD. Values were compared by computing standard Student's t-test. The value 0.05 was chosen as the point of statistical significance throughout. Correlations were evaluated by computing Pearson's correlation coefficient.

## **RESULTS**

### **Effects of phenolic acids on *Fusarium graminearum* growth**

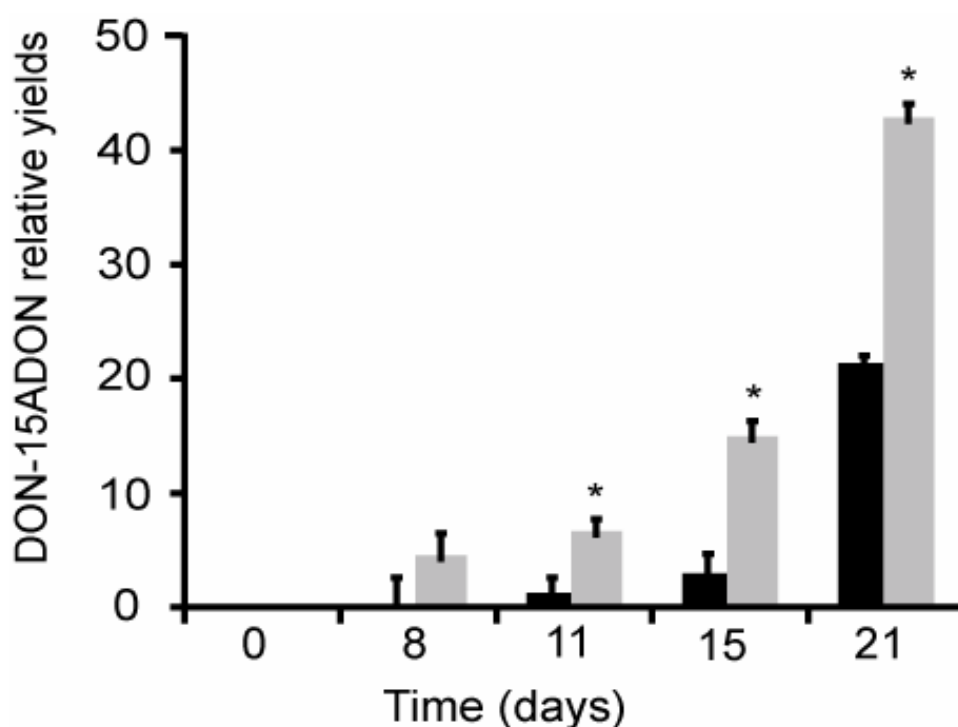
Levels that inhibit 50 % of the fungal growth (IC<sub>50</sub>) range from 3.4 mmol l<sup>-1</sup> to 10.5 mmol l<sup>-1</sup> (Table 1). The lower an IC<sub>50</sub> is, the higher antifungal properties the compound exhibits. The most toxic compound is ferulic acid and the less toxic one is *p*-hydroxybenzoic acid (no growth inhibition).

Previous studies indicated phenolic compounds toxic properties may primary depend on their lipophilic properties which determine their transfer rate into cells (Guiraud, *et al.*, 1995, Kimura, *et al.*, 1998). The degree of lipophilicity of phenolic acids can be scored using their retention times when separated by reverse-phase HPLC.

**Table 2** Retention times (in min) obtained when separation by reverse-phase HPLC is performed following four different methods

Phenolic acid	Bolarinwa and Linsensein 2005	Jandera <i>et al.</i> 2005	Antolovitch <i>et al.</i> 2004	TCTB analysis method*
Ferulic acid	51.0	53.3	14.0	11.0
<i>p</i> -Coumaric acid	42.3	37.2	13.8	10.0
Syringic acid	36.5	25.0	12.3	8.1
Caffeic acid	30.9	21.3	12.2	7.6
<i>p</i> -hydroxybenzoic	Nd <sup>†</sup>	Nd <sup>†</sup>	Nd <sup>†</sup>	6.7

\* see materials and methods; † not determined



**Fig 1** Effect of *p*-coumaric acid on DON-15ADON accumulation kinetic in GYEP cultures of *F. graminearum* CBS185.32. In black is the control; in grey is the kinetic of toxins accumulation in *p*-coumaric acid-treated cultures. Data were normalised relative to the average DON-ADON yield after 11 days of control culture (14 µg of DON and 15ADON per gram of dry biomass). The star \* indicates a significant difference when compared to the control ( $P \leq 0.05$ ).

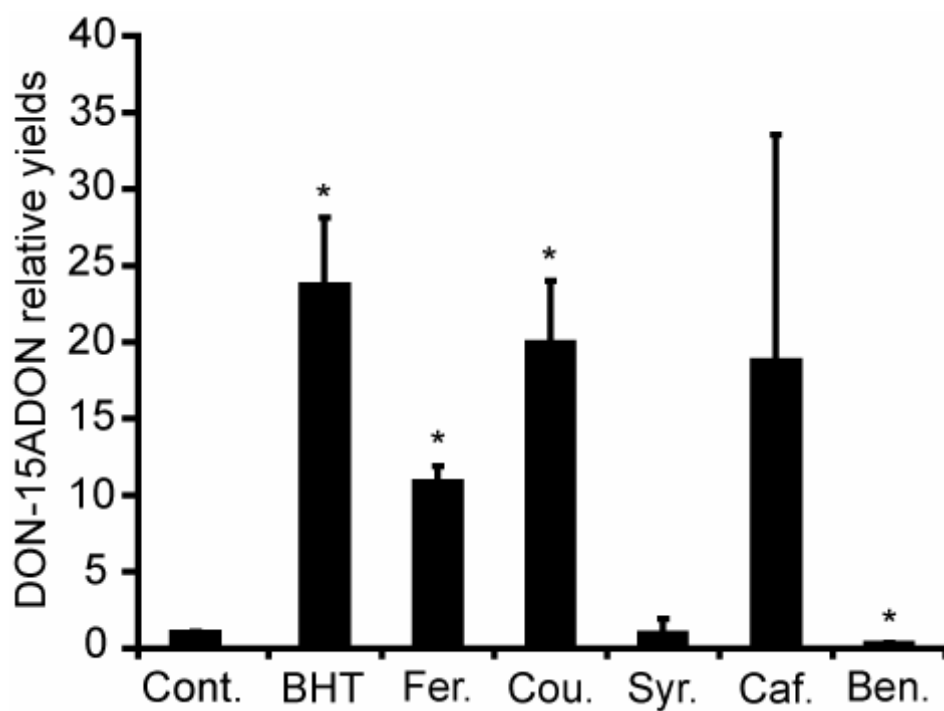
Ferulic, *p*-coumarique, syringique, caffeic and *p*-hydroxybenzoic acids were analysed by HPLC using the TCTB analysis method described in the materials and methods section. The results were compared to the retention times obtained with other methods (Antolovich, *et al.*, 2004, Bolarinwa & Linseisen, 2005, Jandera, *et al.*, 2005). All data are consistent (Table 2) and a classification of phenolic compounds depending on their decreasing degree of lipophilicity can be established: ferulic acid > *p*-coumaric acid > syringic acid > caffeic acid > *p*-hydroxybenzoic acid. Pearson's correlation coefficients between the IC<sub>50</sub> values and the retention times determined for each phenolic compound were calculated. Depending on the HPLC method that was used, Pearson's correlation coefficients range from  $r = -0.70$  (retention times determined with the method from Antolovich *et al.* 2004) to  $r = -0.86$  (retention times determined with the method from Bolarinwa and Lisensein 2005). These values show there may be a correlation link between lipophilic properties and toxicity of phenolic acids: the best fungistatic effect is obtained for compounds that are highly lipophilic, that is to say that can cross fast the membrane.

Prior testing the effects of all these phenolic acids on DON and 15ADON accumulation in liquid cultures of *F. graminearum*, *p*-coumaric effect was studied in GYEP cultures at IC<sub>10</sub>, that is to say 1 mmol l<sup>-1</sup>. At this concentration, DON and 15ADON biosynthesis may be affected while effect on growth is very weak.

### ***Effect of p-coumaric acid on DON and 15ADON accumulation in liquid cultures of Fusarium graminearum***

It was always verified that *p*-coumaric acid supplementation does not modify pH values of the treated batches compared to the control cultures that reached pH 4.5 after the first five days of culture and then remained stable (data not shown). DON-15ADON accumulation was followed for 21 days (Fig. 1).

DON-15ADON accumulation was not detectable until the 8<sup>th</sup> day of culture, neither in control nor in treated cultures. At the 8<sup>th</sup> day of culture, the DON-15ADON level is higher in treated cultures than in control cultures, in a not significant manner. This lack of significance could be an artefact due to a variance of the DON-15ADON greater in control cultures than in *p*-coumaric supplemented-cultures (which lowers the



**Fig 2** Effects of six phenolic compounds on DON-15ADON accumulation in 11 day old GYEP cultures of *F. graminearum* CBS185.32. “Cont.” = control, “Fer.” = ferulic acid, “Cou.” = *p*-coumaric acid, “Syr.” = syringic acid, “Caf.” = caffeic acid, “Benz.” = *p*-hydroxybenzoic acid. Data were normalised relative to the average DON-ADON yield in the control cultures (13 µg of DON and 15ADON per gram of dry biomass). The star \* indicates a significant difference when compared to the control ( $P \leq 0.05$ ).



power of the statistical test).

After 11 days of culture DON-15ADON accumulation is significantly enhanced in the presence of *p*-coumaric acid. This trend remains observable after the 15<sup>th</sup> and the 21<sup>st</sup> day of culture. These results show *p*-coumaric acid activates DON-15ADON accumulation in liquid cultures of *F. graminearum*. However, the kinetic of activation seems to slow down during the course of the culture: toxins accumulation is enhanced 6.4 times at the 11<sup>th</sup> day of culture, 5.4 times at the 15<sup>th</sup> day of culture, and twice at the 21<sup>st</sup> day of culture. This could indicate the activating effect of *p*-coumaric acid fades with time. The strongest effect of *p*-coumaric acid on DON-15ADON accumulation is observable at the 11<sup>th</sup> day of culture. Effects of ferulic, syringic, caffeic and *p*-hydroxybenzoic acids on DON-15ADON accumulation were tested at this time point.

### **Effects of other phenolics on DON-15ADON accumulation in 11-day old liquid cultures of *Fusarium graminearum***

Phenolic acids effects were studied at a common concentration lower than IC<sub>10</sub> (0.5 mmol l<sup>-1</sup>). As a reference, effect of butylhydroxytoluene 0.5 mmol l<sup>-1</sup> (BHT) was also tested because of its anti-oxidant properties commonly used in food and feed industry. Previous experiments showed BHT 0.5 mmol l<sup>-1</sup> does not affect biomass accumulation in GYEP cultures of *F. graminearum* (Favre, 2004, unpublished data).

DON-ADON accumulation is 24 times enhanced in the presence of BHT (Fig. 2). Ferulic and *p*-coumaric acids both activate DON-ADON accumulation (respectively 11 and 20 times). Caffeic acid also seems to enhance toxins accumulation but the high variance of toxins yields in caffeic supplemented-cultures strongly lowers the significance of this observation. Syringic acid-supplementation has no effect on DON-ADON accumulation. Only the phenolic acid *p*-hydroxybenzoic has a reliable inhibitory effect with 3 times less toxins that accumulate in the supplemented cultures compared to the control cultures.

The possibility of a link between the anti-oxidant characteristics of these phenolics and their effects on DON-15ADON accumulation was explored. To value the anti-oxidant activities of phenolic compounds is difficult because the results largely depend on the experimental protocol that is used (Chen & Ho, 1997). Nevertheless, authors' classifications of phenolic compounds according to their decreasing anti-

**Table 3** Vitamin C Equivalent Anti-oxidant Capacity (VCEAC) value of five phenolic acids

Phenolic acid	VCEAC values
Ferulic acid	170.5
<i>p</i> -Coumaric acid	186.0
Syringic acid	80.4
Caffeic acid	103.3
<i>p</i> -hydroxybenzoic	4.8

oxidant capacities are consistent (Rice-Evans, *et al.*, 1996, Forster, *et al.*, 2001, Kim & Lee, 2004). We get: *p*-coumaric acid > ferulic acid > caffeic acid > syringic acid > *p*-hydroxybenzoic acid. This last compound has a very weak antioxidant capacity. The anti-oxidant capacities of the tested phenolic acids can be valued using the Vitamin C Equivalent Anti-oxidant Capacity (VCEAC) method (Table 3). Pearson's correlation coefficient between the VCEAC values of phenolic acids and DON-15ADON yields in supplemented cultures is  $r = 0.89$ . It suggests anti-oxidant capacities of phenolic acids are tightly linked with their effect on DON-15ADON accumulation: the more anti-oxidant the supplemented phenolic acid is, the more DON and 15ADON accumulate.

### DISCUSSION

Fungistatic effects of phenolic acids seemed to be tightly linked to their degree of lipophilicity that reflect their ability to cross membranes. All the tested phenolic acids inhibited 50 % of the fungal diametric growth at concentrations ranging from 3.4 mmol l<sup>-1</sup> (ferulic acid) to 10.5 mmol l<sup>-1</sup> (caffeic acid). The only exception was the phenolic acid *p*-hydroxybenzoic that did not have any effect in our conditions. Ferulic and *p*-coumaric acids are derived from cinnamic acid and *p*-hydroxybenzoic and syringic acids are benzoic acid-derived. Our data may suggest cinnamic-derived phenolic acids are roughly more toxic than benzoic acid-derived ones. These results are consistent with previous *Aspergillus spp.* growth tests (Chipley & Uraih, 1980) and *F. spp. verticillioides* and *proliferatum* tests (Beekrum, *et al.*, 2003).

In GYEP liquid cultures of *F. graminearum*, cinnamic-derived acids (ferulic, *p*-coumaric and caffeic acids) are quite likely to enhance DON-15ADON accumulation while benzoic-derived acids are more likely to inhibit it. This is apparently in opposition with literature data that indicate caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids inhibit the biosynthesis of fumonisin B<sub>1</sub> by *F. verticillioides* (Beekrum, *et al.*, 2003), of aflatoxin by *Aspergillus spp.* (Chipley & Uraih, 1980) and of 15ADON by *F. graminearum* (Bily, 2003). However, these contradictions are not surprising. It was established results are not easily transferable from an experiment to another as phenolic acids effects on fungal metabolism are largely dependant on culture conditions (Maggon, *et al.*, 1977, Elad, 1992). The GYEP culture medium used in this study is particularly rich in glucose (50 g l<sup>-1</sup>). Previous experiments showed caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids exhibit lower



fungitoxicity on *Fusarium avenaceum* when glucose was added to the culture (Asiegbu, 2000). Similarly, differential effects of phenolic acids may be attributable to their solubilisation in ethanol as the combination of their properties may introduce bias (Asiegbu, 2000). Finally, our observations were made in rotary shaken cultures. None of the 5 tested phenolic acids nor BHT at 0.5 mmol l<sup>-1</sup> enhanced DON-15ADON accumulation by *F. graminearum* in static GYEP cultures (data not shown). Oxygenation is enhanced in shaken cultures compared to static cultures, and oxidised phenolic compounds are more fungitoxic (Gomez-Vasquez, *et al.*, 2004). Differences in phenolic acids effect may be partly explained by their higher oxidation level in shaken cultures compared to static cultures.

Anti-oxidant capacities of phenolic acids and DON-15ADON accumulation in supplemented cultures of *F. graminearum* seem to strongly and positively correlate. This observation is consistent with previous data that indicate TCTB biosynthesis by *Fusarium* requires weak oxidant conditions (Miller & Blackwell, 1986). However, BHT-associated data do not fit into this correlation. BHT VCEAC value is 77.4 (Kim & Lee, 2004), which is low compared to ferulic and *p*-coumaric VCEAC values (Table 3). Despite a weak anti-oxidant capacity, BHT activates DON-ADON accumulation 24 times. These data indicate that, even if anti-oxidant capacities seem important components of phenolic compounds effects on DON-ADON, they are not sufficient to explain all of the observed trends. BHT is very lipophilic because it is highly alkylated. BHT transfer rate into cells may be high enough to make up for a lower anti-oxidant capacity and even so enhance DON-ADON accumulation. BHT VCEAC value (77.4) is similar to the syringic acid one (80.4), and while BHT strongly enhances DON-15ADON accumulation, syringic acid has no significant effect. Their different degrees of lipophilicity may explain their different effects. Nevertheless, this hypothesis implicates that these anti-oxidant compounds exert their effects after penetrating into cells by passive diffusion. It does not take into account neither that they may act in an indirect manner without entering into cells, nor that phenolic acids may enter into cells by active or facilitated mechanisms. Furthermore, effectiveness of phenolic acids would be reduced to their anti-oxidant and/or lipophilic capacities, which is simplistic. As an example, it has been showed *p*-hydroxybenzoic acid, which has very little anti-oxidant and lipophilic properties, can directly induce gene expression (De Vries, *et al.*, 2002).



The phenolic acid *p*-hydroxybenzoic may also modulate fungal enzymatic activities such as tyrosinases (Reid, *et al.*, 1992). In a more general manner, phenolic acids were described as inhibitors of hydrolytic enzymes secretion in *Piromyces spp.* (Paul, *et al.*, 2003). BHT can also modulate hydrolytic enzymes activities in *Fusarium spp. verticillioides* and *proliferatum* (Reynoso, *et al.*, 2002).

Hydrolytic enzymes are important for *Fusarium* progression *in planta*. Several data suggest the main enzymatic activities detected in toxigenic *Fusarium* strains are different from the major ones found in not-toxigenic strains (Marin, *et al.*, 1998, Keshri & Magan, 2000). Ability of phenolic acids and BHT to modulate hydrolytic and other enzymes activities may be linked to their abilities to modulate DON-15ADON accumulation. This study showed anti-oxidant properties of phenolic acids exhibit important effect on DON and 15ADON production by *F. graminearum*. Therefore, it may be hypothesized that anti-oxidant characteristics of phenolic acids can be involved in their properties on enzymes activities. Different compositions in phenolic acids of the various varieties of cereals may reflect their different sensitiveness to mycotoxinogenesis. This hypothesis is currently investigated.

### **ACKNOWLEDGEMENT**

These results are part of Nadia Ponts' PhD project financially supported by the Conseil Régional de la Région Aquitaine and the INRA. The authors are also grateful to the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche for providing a financial support to this study, which is a part of the National Integrated Research Project "RARE fusariotoxines 2003-2006".

### **REFERENCES**

- Angelova, M.B., Pashova, S.B., Spasova, B.K., Vassilev, S.V. and Slokoska, L.S. (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res* 109, 150-158.
- Antolovich, M., Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Jardine, D., Prenzler, P.D. and Robards, K. (2004) LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. *J Agric Food Chem* 52, 962-971.
- Asiegbu, F.O. (2000) Effects of carbohydrates, ethanol and selected cell wall phenolics on *in vitro* growth of necrotrophic fungi - *Heterobasidion annosum* and *Fusarium avenaceum*. *J Basic Microbiol* 40, 139-148.





## Chapitre 2 : Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de composés associés sur la biosynthèse de TCTB

---

- Bakan, B., Bily, A.C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogene, B.J. and Richard-Molard, D. (2003) Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *J Agric Food Chem* 51, 2826-2831.
- Beekrum, S., Govinden, R., Padayachee, T. and S.Odhav, B. (2003) Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B1 Food Addit Contam 20 490-493.
- Bily, A. (2003) Rôle et importance des déhydrodimères d'acide férulique et autres phénylpropanoïdes dans les mécanismes de résistance de *Zea mays L.* à *Fusarium graminearum Schwabe*. In PhD Thesis. p.172. Pau: Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- Bily, A.C., Reid, L.M., Savard, M.E., Reddy, R., Blackwell, B.A., Campbell, C.M., Krantis, A., Durst, T., Philogene, B.J.R., Arnason, J.T. and Regnault-Roger, C. (2004) Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia* 157, 117-126.
- Bolarinwa, A. and Linseisen, J. (2005) Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 823, 143-151.
- CE (2005) Règlement (CE) N 856/2005 de la Commission du 6 juin 2005 modifiant le règlement (CE) n 466/2001 en ce qui concerne les toxines du *Fusarium*. *Journal Officiel de l'Union Européenne* L143, 3-8.
- Chen, J.H. and Ho, C.T. (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem* 45, 2374-2378.
- Chiple, J.R. and Uraih, N. (1980) Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. *Appl Environ Microbiol* 40, 352-357.
- Cossette, F. and Miller, J.D. (1995) Phytotoxic effect of deoxynivalenol and *Gibberella* ear rot resistance of corn. *J Nat Toxins* 3, 383-388.
- D'Mello, J.P.F. and MacDonald, A.M.C. (1997) Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology* 69, 155-166.
- D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M. and MacDonald, A.M.C. (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80, 183-205.
- Dalcero, A., Torres, A., Etcheverry, M., Chulze, S. and Varsavsky, E. (1997) Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. *Food Addit Contam* 14, 11-14.
- De Vries, R.P., Van Kuyk, P.A., Kester, H.C.M. and Visser, J. (2002) The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem J* 363, 377-386.
- Elad, Y. (1992) The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. *Plant pathology* 41, 417 - 426.
- Eudes, F., Comeau, A., Rioux, S. and Collin, J. (2000) Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with *Fusarium* in wheat head blight. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22, 286-292.
- Forster, A., Simon, K., Schmidt, R. and Kaltner, D. (2001) What is it about antioxidative characteristics of hops? In 28 EBC-Congress. Budapest: Joh. Barth & Sohn.
- Friend, J. (1977) Phenolic substances and plant disease. In *Biochemistry of Plant Phenolics* ed. Press, P. pp.557-588. New York, NY.



## Chapitre 2 : Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de composés associés sur la biosynthèse de TCTB

---

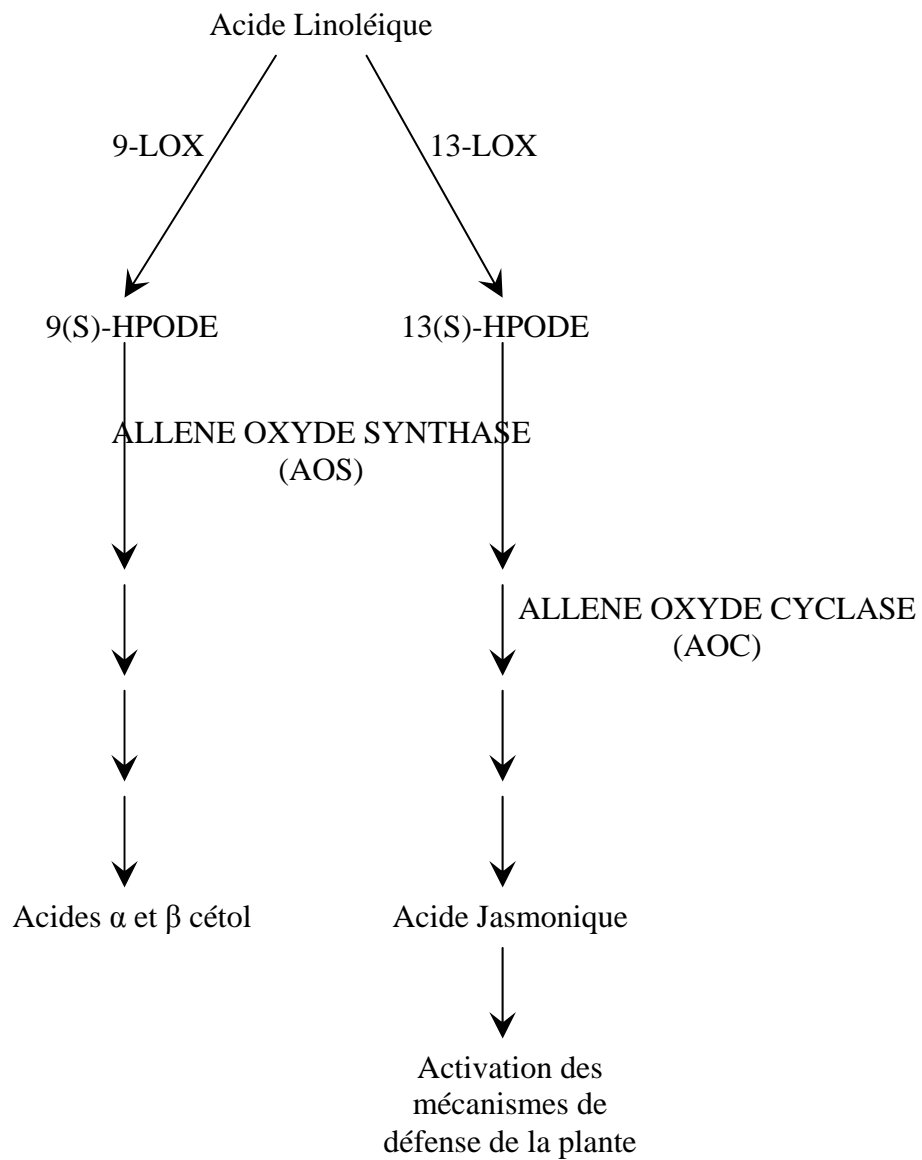
- Gomez-Vasquez, R., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J.R. and Cooper, R.M. (2004) Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and Peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Ann Bot (Lond)* 94, 87-97.
- Guiraud, P., Steiman, R., Seiglemurandi, F. and Benoitguyod, J.L. (1995) Comparison of the Toxicity of Various Lignin-Related Phenolic-Compounds toward Selected Fungi Perfecti and Fungi Imperfecti. *Ecotoxicol Environ Saf* 32, 29-33.
- Harris, L.J., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nicholson, P., Butler, G., Young, J.C., Weston, G., Proctor, R.H. and Hohn, T.M. (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* 83, 954-960.
- Hua, S.S.T., Grosjean, O.K. and Baker, J.L. (1999) Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Lett Appl Microbiol* 29, 289-291.
- Ioos, R., Belhadj, A. and Menez, M. (2004) Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* 158, 351-362.
- Jandera, P., Skerikova, V., Rehova, L., Hajek, T., Baldrianova, L., Skopova, G., Kellner, V. and Horna, A. (2005) RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector. *J Sep Sci* 28, 1005-1022.
- Kaneko, T., Kaji, K. and Matsudo, M. (1994) Protection of Linoleic-Acid Hydroperoxide-Induced Cytotoxicity by Phenolic Antioxidants. *Free Radic Biol Med* 16, 405-409.
- Keshri, G. and Magan, N. (2000) Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium spp.* using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. *J Appl Microbiol* 89, 825-833.
- Kim, D.O. and Lee, C.Y. (2004) Comprehensive study an vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44, 253-273.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Haidukowski, M. and Rizzo, I. (2003) *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiol Res* 158, 29-35.
- Maggon, K.K., Gupta, S.K. and Venkitasubramanian, T.A. (1977) Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol Rev* 41, 822-855.
- Marin, S., Sanchis, V., Rull, F., Ramos, A.J. and Magan, N. (1998) Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *J Food Prot* 61, 1489-1496.
- Miller, J.D. and Blackwell, B.A. (1986) Biosynthesis of 3-acetyldeoxynivalenol and other metabolites by *Fusarium culmorum* HLX 1503 in a stirred jar fermentor. *Canadian Journal of Botany* 64, 1-5.
- Miller, J.D. and Greenhalgh, R. (1985) Nutrients effects on biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia* 77, 130-136.
- Miller, J.D., Young, J.C. and Trenholm, H.L. (1983) *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botany* 61: 3080-3087.
- O'Neill, K., Damoglou, A.P. and Patterson, M.F. (1993) Toxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344 and *Fusarium graminearum* NRRL 5883 on grain substrates. *J Appl Bacteriol* 74, 625-628.



## Chapitre 2 : Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de composés associés sur la biosynthèse de TCTB

---

- Paul, S.S., Kamra, D.N., Sastry, V.R.B., Sahu, N.P. and Kumar, A. (2003) Effect of phenolic monomers on biomass and hydrolytic enzyme activities of an anaerobic fungus isolated from wild nil gai (*Baselophus tragocamelus*). Lett Appl Microbiol 36, 377-381.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.N., Barreau, C. and Richard-Forget, F. (2005) Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated under oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum* FEMS Microbiol Lett Submitted.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M. and McCormick, S.P. (1995) Reduced Virulence of *Gibberella zeae* Caused by Disruption of a Trichothecene Toxin Biosynthetic Gene. Mol Plant Microbe Interact 8, 593-601.
- Reid, L.M., Mather, D.E., Arnason, J.T., Hamilton, R.I. and Bolton, A.T. (1992) Changes in Phenolic Constituents of Maize Silk Infected with *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Botany 70, 1697-1702.
- Reynoso, M.M., Torres, A.M. and Ramirez, M.L. (2002) Efficacy of antioxidant mixtures on growth, fumonisin production and hydrolytic enzyme production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* *in vitro* on maize-based media. Mycol Res 106, 1093-1099.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med 20, 933-956.
- Uraih, N., Cassity, T.R. and Chipley, J.R. (1977) Partial characterization of the mode of action of benzoic acid on aflatoxin biosynthesis. Can J Microbiol 23, 1580-1584.
- Vidhyasekaran, P., Borromeo, E.S. and Mew, T.W. (1986) Host-specific toxin production by *Helminthosporium oryzae*. Phytopathology 76, 261-265.
- Wallace, G. and Fry, S.C. (1994) Phenolic components of the cell plant wall. Int Rev Cytol 151, 229-267.
- Xu, X.M. and Berrie, A.M. (2005) Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with *Fusarium* ear blight and apple blue mould: A review. Food Addit Contam 22, 290-301.



**Figure 24 : La branche allene oxyde synthase de la voie des oxylipines.**

## **II. Effets de produits d'oxydation de l'acide linoléique sur la biosynthèse de trichothécènes de type B par *F. graminearum***

Les lipoxygénases (LOX) sont des dioxygénases catalysant l'hydroperoxydation des lipides aussi bien chez les plantes que chez les animaux. Les caractéristiques détaillées de ces enzymes, en particulier végétales, ont été répertoriées par Feussner & Wasternack (2002). Les substrats des LOX sont les acides gras polyinsaturés contenant des unités cis, cis 1-4 pentadiène. Chez les plantes supérieures, les acides linoléique et linoléique, acides gras largement majoritaires, en sont les principaux substrats naturels. Les LOX sont des enzymes à spécificité positionnelle, c'est-à-dire qu'elles catalysent l'hydroperoxydation des lipides en position 9 ou 13 : on parle de 13-LOX ou 9-LOX. Les produits d'oxydation de l'acide linoléique sont donc les acides 13(S)-hydroperoxyoctadécadiénoïque et 9(S)-hydroperoxyoctadécadiénoïque notés respectivement 13(S)-HPODE et 9(S)-HPODE ; de la même façon les produits d'oxydation de l'acide linoléique sont les acides 13(S)-hydroperoxyoctadécatriénoïque et 9(S)-hydroperoxyoctadécatriénoïque notés respectivement 13(S)-HPOTE et 9(S)-HPOTE.

Chez *Zea mays*, de précédentes études ont permis de caractériser différentes LOX. Les LOX des feuilles du maïs sont majoritairement des 13-LOX tandis que les 9-LOX sont plutôt retrouvées dans les graines et les plantules (Veldink, *et al.*, 1972, Hamberg, 1991, Jensen, *et al.*, 1997).

La voie des lipoxygénases est communément activée lors d'interactions plante-pathogène. Les hydroperoxydes dérivés des acides linoléique et linoléique sont impliqués dans la voie des oxylipines<sup>33</sup> dont une des branches conduit à la formation d'acide jasmonique (Figure 24). L'implication de l'acide jasmonique dans la résistance végétale aux invasions pathogène est largement illustrée (Pieterse, *et al.*, 1998, Thomma, *et al.*, 1998, Thaler, *et al.*, 2004).

---

<sup>33</sup> Acides gras polyénoïques oxydés





Les évènements de résistance des plantes dans le cadre d'interactions plante-pathogènes ont de nombreuses fois été reliées à des activités lipoxygénasiques (Burow, *et al.*, 2000). Notamment, l'induction spécifique de lipoxygénases chez la pomme de terre est associée avec la résistance à *Phytophthora infestans* ainsi qu'au développement d'une réponse hypersensible (Kolomiets, *et al.*, 2000). Gobel, *et al.*, (2003) ont par ailleurs précisé ce dernier point en mettant en évidence que la LOX impliquée est de spécificité positionnelle 9. De façon similaire, l'accumulation de 9(S)-HPODE dans les graines d'arachide contaminées par *Aspergillus spp.* a été mise en évidence par Burow *et al.* (2000). Chez le maïs, Wilson, *et al.*, (2001) ont décrit la protéine CSSAP 92 possédant une activité lipoxygénasique de type 9-LOX : son transcrite est plus abondant dans une lignée plus sensible à l'infection par *Aspergillus flavus* et à *F. verticillioides*. Il ressort de ces études que les 9-LOX et l'acide 9(S)-HPODE seraient particulièrement importants dans les interactions hôte-pathogène.

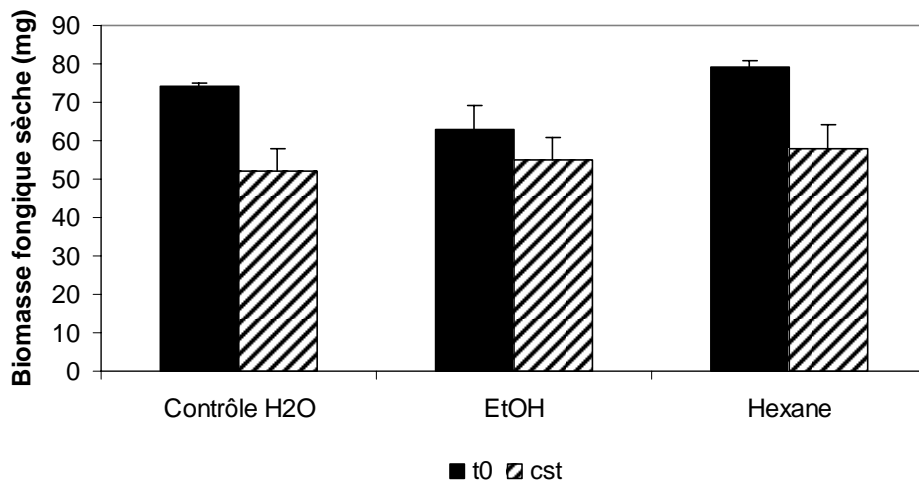
Les acides linoléique, linoléique et leurs hydroperoxydes peuvent également être perçus et avoir des conséquences sur le pathogène lui-même. Calvo, *et al.*, (1999) ont par exemple démontré que les acides linoléique, linoléique, 9(S)-HPODE et 13(S)-HPODE induisent la sporulation asexuée chez *Aspergillus spp.*, ce qui indique que les substrats et produits des LOX peuvent être perçus comme des signaux activant le développement morphologique du pathogène. Les résultats des travaux de Wilson *et al.* (2001) précédemment cités suggèrent que l'activité enzymatique de CSSAP 92 (9-LOX) plus importante dans les lignées de maïs plus sensibles à l'infection entraîne des changements biochimiques effectivement perçus par *A. flavus* et qui favorisent l'invasion fongique. Ces données laissent supposer que les composés dont la production est élicitée par l'attaque pathogène peuvent également représenter des signaux favorisant l'infection.

Lors d'interactions entre des plantes et des champignons mycotoxinogènes, les niveaux de production en toxines sont des paramètres à considérer en sus du niveau d'invasion. De la même façon que les substrats et produits des LOX sont susceptibles de moduler le développement morphologique et le niveau d'invasion du pathogène, l'hypothèse d'une altération des niveaux de production en toxines peut être émise.



Plusieurs résultats concernant la biosynthèse d'aflatoxines par *Aspergillus spp.* sont disponibles. Burow *et al.* (1997) ont montré une diminution *in vitro* de la production d'aflatoxines en présence de l'acide 13(S)-HPODE, tandis que l'acide 9(S)-HPODE a pour effet d'augmenter la demi-vie des transcrits de *ver-1*, gène impliqué dans la voie de biosynthèse des aflatoxines. En accord avec ces résultats, les travaux de Wilson *et al.* (2001) qui démontrent le rôle d'une 9-LOX (CSSAP 92) facilitant l'invasion des graines de maïs par *Aspergillus spp.* indiquent aussi que l'activité de cette enzyme contribue à la biosynthèse d'aflatoxines.

A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible quant à l'existence ou non d'effet(s) modulateur(s) de la production de TCTB par les acides 9(S)-HPODE et 13(S)-HPODE. Les travaux de Burow *et al.* (1997) sur le modèle *Aspergillus/aflatoxines* ont montré que 13(S)-HPODE 1 µM semble inhiber la production d'aflatoxines tandis que 9(S)-HPODE 1 µM augmente la durée de vie des transcrits des gènes impliqués dans la biosynthèse des aflatoxines. Sur un modèle similaire, nous avons choisi de tester en mini-cultures GYEP les effets de 1 µM en acide 13(S)- ou 9(S)-HPODE sur la biosynthèse de TCTB par *F. graminearum* CBS185.32. La néo-synthèse de ces produits est habituellement réalisée en utilisant la LOX-1 du soja (13-LOX) et la 9-LOX issue d'extraits bruts de tomates (voir matériel et méthodes). Toutefois, ces synthèses ne permettent pas l'obtention de produits purs. Le mélange des produits d'oxydation de l'acide linoléique par la LOX-1 du soja sera arbitrairement noté « mélange 13-Ox-Linoléate », et de façon similaire le mélange des produits d'oxydation de l'acide linoléique par la 9-LOX issue d'un extrait brut de tomates sera arbitrairement noté « mélange 9-Ox-Linoléate ». Les mélanges 13-Ox-Linoléate et 9-Ox-Linoléate contiennent majoritairement respectivement les hydroperoxydes 13(S) et 9(S) dérivés de l'acide linoléique, ainsi que l'acide linoléique non oxydé. Toutefois, la méthode utilisée pour la préparation du mélange 9-Ox-Linoléate entraîne très fréquemment la contamination par des caroténoïdes et de ce fait les effets observés peuvent être biaisés de façon non contrôlable par la présence de ces pigments. Des solutions pures commerciales de 13(S)-HPODE et de 9(S)-HPODE ont donc également été testées à la concentration finale de 1 µM.



**Figure 25 : Accumulation de biomasse fongique après 7 jours en mini-cultures GYEP en présence ou absence d'éthanol ou d'hexane.**

EtOH = milieux supplémentés en éthanol 0,65% ; Hexane = milieux supplémentés en hexane 0,65% ; Contrôle H<sub>2</sub>O = milieux supplémentés en eau ; t<sub>0</sub> = milieux supplémentés avant inoculation ; cst = milieux supplémentés toutes les 24 heures du jour de l'inoculation au 6<sup>e</sup> jour de culture inclus.

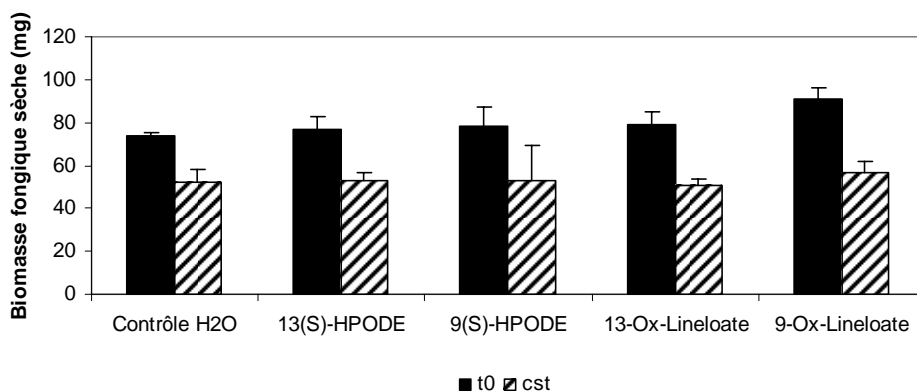
Les effets des acides 13(S)- et 9(S)-HPODE ainsi que ceux des mélanges 13-Ox-Linoleate et 9-Ox-Linoleate ont chacun été testés selon deux modes d'introduction : soit une supplémentation unique juste avant l'inoculation des milieux (essai noté « t<sub>0</sub> »), soit une supplémentation quotidienne jusqu'au 6<sup>e</sup> jour inclus, après inoculation (essai noté « cst »). Les niveaux de production en DON et 15ADON ont été mesurés après 7 jours de culture. Ce temps, 7 jours, a été choisi d'après les recommandations de Boutigny A.L. (2004, communication personnelle) comme un temps de culture suffisant pour l'obtention de quantités importantes de toxines en conditions de mini-cultures.

Les hydroperoxydes commerciaux ont été utilisés en solution dans de l'éthanol tandis que les mélanges néo-synthétisés sont en solution dans de l'hexane. Les toxicités de ces solvants ainsi que leur(s) effet(s) sur la biosynthèse de toxines ont été évalués en même temps que ceux des hydroperoxydes et des mélanges 13- et 9-Ox-Linoleate.

### **II.1. Fongitoxicité(s) de l'éthanol ou de l'hexane 0,65 % et des hydroperoxydes et autres produits d'oxydation de l'acide linoléique par des lipoxygénases de spécificité positionnelle 13 ou 9**

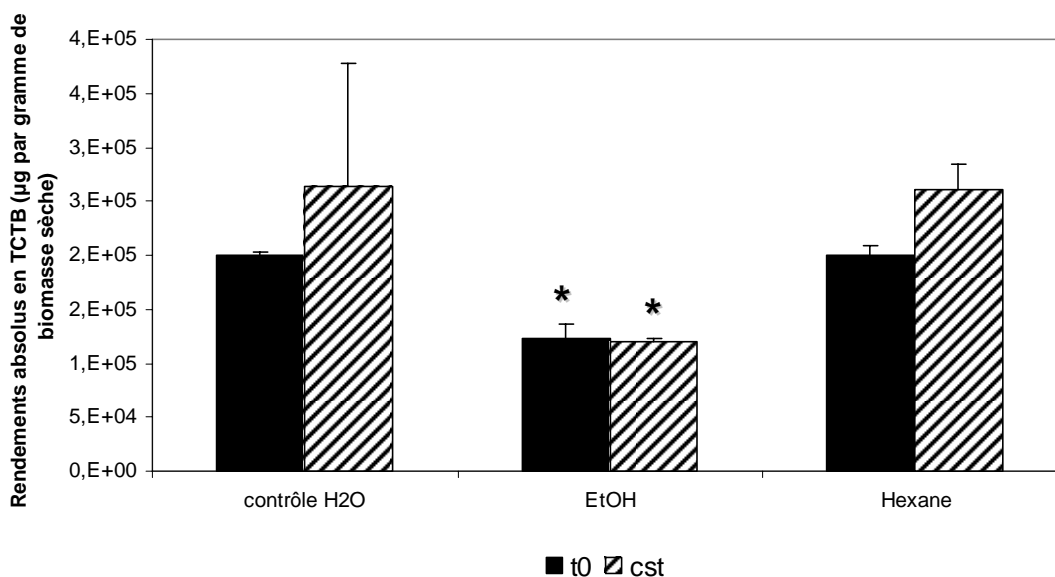
Les fongitoxicités (dans nos conditions) de l'éthanol et de l'hexane 0,65 % et des hydroperoxydes et autres produits d'oxydation de l'acide linoléique par des lipoxygénases de spécificité positionnelle 13 ou 9 ont été évaluées par la comparaison des biomasses fongiques sèches mesurées après 7 jours de mini-culture GYEP supplémentée ou non avec l'un des composés.

La figure 25 représente les niveaux d'accumulation de biomasse fongique en milieux supplémentés en eau, en éthanol ou hexane 0,65 % (mode de culture t<sub>0</sub> ou cst). Il apparaît tout d'abord que les niveaux d'accumulation de biomasse fongique sont globalement inférieurs (de façon non statistiquement significative) lors de supplémentations quotidiennes en comparaison avec les essais en mode de supplémentation unique, et ce y compris dans les cultures contrôles supplémentées en eau. Les cultures fusariennes ayant lieu à l'obscurité et à 25°C, il est probable que les sorties quotidiennes des mini-cultures entraînant une chute de la température et



**Figure 26 : Accumulation de biomasse fongique après 7 jours en mini-cultures GYEP en présence ou absence de divers produits d'oxydation de l'acide linoléique.**

t<sub>0</sub> = milieux supplémentés avant inoculation ; cst = milieux supplémentés toutes les 24 heures du jour de l'inoculation au 6<sup>e</sup> jour de culture inclus.



**Figure 27 : Accumulation de DON et 15ADON après 7 jours en mini-cultures GYEP en présence ou absence d'éthanol ou d'hexane.**

EtOH = milieux supplémentés en éthanol 0,65% ; Hexane = milieux supplémentés en hexane 0,65% ; Contrôle H<sub>2</sub>O = milieux supplémentés en eau ; t<sub>0</sub> = milieux supplémentés avant inoculation ; cst = milieux supplémentés toutes les 24 heures du jour de l'inoculation au 6<sup>e</sup> jour de culture inclus ; \* = différence statistiquement significative p ≤ 0,05.

l'exposition à la lumière soit un facteur de stress pour le champignon. De la même façon, dans ce type de culture la surface du milieu est rapidement entièrement recouverte par un « tapis » mycélien, et l'introduction de liquide peut également constituer un stress modifiant la croissance fongique. La même observation est réalisée lorsque les milieux sont supplémentés avec des hydroperoxydes ou autre produits d'oxydation de l'acide linoléique par des lipoxygénases de spécificité positionnelle 13 ou 9 (Figure 26).

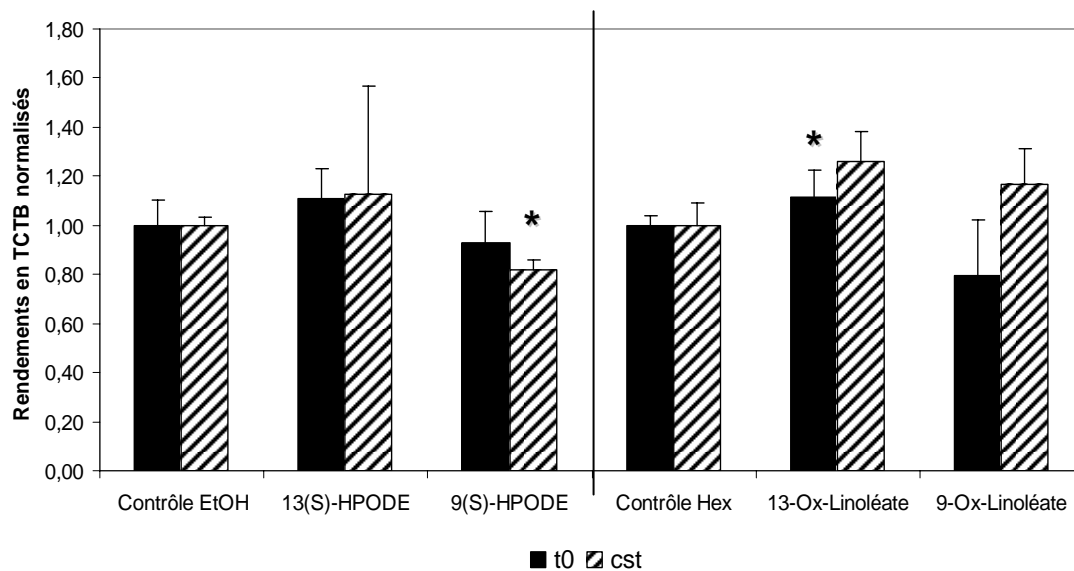
Si le mode de supplémentation semble moduler le niveaux de croissance de *Fusarium*, la nature du composé ajouté dans le milieu de culture ne parait pas, dans nos conditions, moduler les niveaux d'accumulation de biomasse fongique : pour un même mode de supplémentation, il n'y a pas de différence significative entre les biomasses fongiques accumulées dans les milieux supplémentés en eau, avec de l'éthanol ou de l'hexane 0,65 % (Figure 25), ni même lorsque les milieux sont supplémentés avec les hydroperoxydes 13(S)-ou 9(S)-, ou les mélanges des produits d'oxydation 13-Ox-Linoleate ou 9-Ox-Linoleate.

### **II.2. Modulation(s) de la production de TCTB par l'ajout d'éthanol ou d'hexane 0,65 % et d'hydroperoxydes et autres produits d'oxydation de l'acide linoléique**

La(les) modulation(s) de la production de DON et de 15ADON par *F. graminearum* par l'éthanol ou l'hexane 0,65 % et par des hydroperoxydes et autres produits d'oxydation de l'acide linoléique ont été évaluées après 7 jours de mini-cultures GYEP supplémentées ou non avec l'un des composés.

#### **II.2.a. Effets d'éthanol ou d'hexane 0,65 %**

La figure 27 représente les rendements en DON/15ADON (exprimés en  $\mu\text{g}$  par gramme de biomasse sèche) en fonction du mode de supplémentation ( $t_0$  ou cst) et du solvant ajouté. L'accumulation de DON/15ADON est fortement réduite en présence



**Figure 28 : Accumulation de DON et 15ADON après 7 jours en mini-cultures GYEP en présence ou absence de divers produits d'oxydation de l'acide linoléique.**

t<sub>0</sub> = milieux supplémentés avant inoculation ; cst = milieux supplémentés toutes les 24 heures du jour de l'inoculation au 6<sup>e</sup> jour de culture inclus ; \* = différence statistiquement significative p ≤ 0,05.



d'éthanol 0,65 % ( $p = 0,006$ ) tandis que l'hexane à la même concentration ne semble pas avoir d'effet.

En considérant ces résultats, les rendements obtenus lors des tests de chacun de nos composés seront normalisés par rapport à la production obtenue dans le solvant correspondant. Cette normalisation est nécessaire afin de rendre les résultats comparables entre eux.

### ***II.2.b. Effets des composés 13(S)-HPODE, 9(S)-HPODE, 13-Ox-Linoleate ou 9-Ox-Linoleate***

La figure 28 représente les rendements en TCTB obtenus après 7 jours en mini-cultures supplémentées avec l'un de nos composés, normalisés par rapport aux rendements moyens obtenus en présence du solvant correspondant.

Une première observation globale indique que quel que soit le mode d'introduction considéré 13(S)-HPODE et 13-Ox-Linoleate semblent être plutôt activateurs de la production de toxines tandis que 9(S)-HPODE et 9-Ox-Linoleate semble plutôt réduire l'accumulation de DON et de 15ADON dans les milieux de culture. Toutefois, ces résultats sont statistiquement peu significatifs et ne permettent pas de tirer des conclusions claires.

La faible puissance du test statistique pourrait s'expliquer par le mode de culture en lui-même. En mini-culture, les rendements en toxines pour la souche *F. graminearum* CBS185.32 sont plus de 30 fois supérieurs qu'en cultures agitées classiques. Il n'est donc pas à exclure que la machinerie cellulaire de *Fusarium* atteint dans ces conditions un seuil maximal de fonctionnement ne permettant plus d'activation et atténuant les intensités des effets observés.

Malgré une indéniable faiblesse de la significativité de l'étude, il semble que les produits d'oxydation de l'acide linoléique et en particulier ses hydroperoxydes 13(S) et 9(S) modulent la production de DON et de 15ADON. De plus, 13(S)-HPODE semble plutôt activer la production de toxines tandis que l'ajout de 9(S)-HPODE dans les milieux de culture semble la réduire.



### **III. Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et autres composés pro/anti oxydants : conclusion**

Dans ce chapitre, les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de DON/ADON par *F. graminearum* ont été particulièrement étudiés.

D'une façon générale, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM semble plutôt activer l'accumulation de toxines dans nos conditions. Une réponse adaptative du champignon au stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été mise en évidence, réponse dont les mécanismes ne sont pas encore élucidés. Cependant, il convient de moduler ces résultats dans la mesure où les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de toxine semblent être dépendant de la phase de croissance dans laquelle se trouve *Fusarium* au moment de la première exposition à ce stress. Si le premier contact avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a lieu après 2 jours de culture et au-delà, l'adaptation au stress semble très différente et en particulier la production de toxine n'est pas activée. Il est même possible qu'elle soit inhibée sur le long terme. *In planta*, la cinétique de réponse à l'invasion fongique avec génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut alors s'avérer déterminante en termes de risque mycotoxique. La sélection de variétés dont la réponse au pathogène ne favorise pas l'accumulation de toxines peut représenter un des éléments permettant de limiter l'occurrence des TCTB au champ.

L'utilisation d'autres composés pro-oxydants et de composés anti-oxydants nous ont permis d'en déduire que les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de toxines sont spécifiques de la molécule.

Les effets du diamide, composé capable d'oxyder les fonctions thiol, et le paraquat, composé générateur d'anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ont tout d'abord été testés. Le diamide active la production de toxines tandis que le paraquat l'inhibe de façon très importante. Les mécanismes des réponses de *Fusarium* à ces différents stress oxydatifs ne sont pas connus. En particulier, pourquoi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le diamide ont-ils des effets similaires tandis que le paraquat inhibe très efficacement la production de toxines ? Un



élément de réponse peut être apporté par des études réalisées chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il a été mis en évidence que la localisation nucléaire du facteur de transcription YAP1 est modulée en conditions de stress oxydatifs et que les cellules déficientes en YAP1 sont hypersensibles à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Moye-Rowley, 2003). YAP1 active la transcription du gène de la thioredoxine impliquée dans la tolérance à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que le gène codant la GSH1, enzyme particulièrement importante pour la biosynthèse de glutathione (le plus important des composés thiols impliqués dans le maintien de la balance redox cellulaire). Il semble que le diamide comme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soient capable d'induire la localisation nucléaire de YAP1 *via* un domaine protéique C-terminal riche en cystéines. L'induction de la localisation cellulaire par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et uniquement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impliquerait également un autre domaine riche en cystéine localisé cette fois vers l'extrémité N-terminale de la protéine YAP1 (Moye-Rowley, 2003). Ainsi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le diamide pourraient agir *via* des mécanismes relativement proches pouvant expliquer des effets similaires. Des mécanismes de régulation transcriptionnelle semblent particulièrement impliqués dans ces modulations de la production de toxines

Les effets d'acides phénoliques, composés aux propriétés anti-oxydantes largement connues, ont ensuite été étudiés. Certains composés phénoliques semblent activer la production de toxines (acides férulique et *p*-coumarique) tandis que d'autres semblent l'inhiber (acide *p*-hydroxybenzoïque). Ces différences d'effets ont été associées aux différents potentiels anti-oxydants des acides phénoliques testés : plus le potentiel oxydant de l'acide phénolique est important, plus l'accumulation de toxines dans les milieux supplémentés est importante. Ce résultat est en accord avec les travaux de Miller et Blackwell (1986) ayant indiqué que la biosynthèse de DON par *Fusarium* nécessite des conditions anti-oxydantes faibles. Les acides phénoliques et autres composés anti-oxydants ont été particulièrement décrits comme des inhibiteurs des sécrétions et/ou d'activités d'enzymes hydrolytiques (Marin, *et al.*, 1998, Keshri & Magan, 2000, Reynoso, *et al.*, 2002, Paul, *et al.*, 2003). Les effets des acides phénoliques pourraient alors être liés à des modulations d'activités enzymatiques impliquées dans la biosynthèse des TCTB.

Enfin, les effets d'hydroperoxydes de l'acide linoléique ont également été testés sur la production de DON/15ADON par *F. graminearum*. Comme précédemment



décrit, ces composés sont également des pro-oxydants impliqués dans les mécanismes de défense de la plante en réponse aux invasions pathogène (Figure 12). Il semble que les produits d'oxydation 13(S) seraient plutôt activateurs de la production de toxines tandis que les produits 9(S) seraient plutôt inhibiteurs. Toutefois, ces résultats n'ont pas été obtenus dans des conditions de culture standard mais en mini-cultures (conditions exigées par les faibles quantités de standards disponibles). Or, dans de telles mini-cultures, les rendements en DON et 15ADON par la souche *F. graminearum* utilisée tout au long de nos essais sont activés de façon spectaculaire (un minimum de 30 fois plus de toxines produites dès les premiers jours de culture). La machinerie cellulaire de production de toxines est peut être à un maximum et il devient alors particulièrement difficile de l'activer plus. Ensuite, les mini-cultures étant non agitées, les mycelia en croissance ne sont pas totalement immergés et il se forme à la surface du liquide un « tapis » cellulaire dont une face est au contact du liquide et l'autre face au contact de l'air. Les cellules au contact de l'air ne sont donc pas au contact du produit testé. Enfin, la non-agitation des cultures pourrait également impliquer une mauvaise répartition du produit ajouté au milieu de culture et donc des gradients de concentration pouvant moduler les effets observés. Ces soupçons quant aux biais introduits en utilisant des mini-cultures ont été confirmés en utilisant dans ces conditions H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le diamide, le paraquat et les acides phénoliques déjà testés en conditions standard. Aucune activation significative n'était plus observable, et seules les inhibitions par le paraquat et l'acide *p*-hydroxybenzoïque persistaient. En particulier, les effets activateurs de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, du diamide, et des acides férulique et *p*-coumarique étaient totalement effacés ce qui tend à confirmer notre hypothèse de saturation de la machinerie cellulaire.

Il conviendrait donc de re-tester les 13(S)HPODE et 9(S)HPODE en conditions standard de culture. Cependant, les volumes des cultures standards sont 12,5 fois plus grands qu'en mini-cultures. Il n'est alors pas possible de tester les effets de composés purs commerciaux en raison du coup très élevé de ces produits. Une mise au point méthodologique est alors nécessaire pour la préparation au laboratoire d'hydroperoxydes de qualité satisfaisante. Ces expériences n'ont pu être réalisées dans le cadre de cette thèse et représentent une suite immédiate à ces travaux.

Malgré ces difficultés expérimentales, il semble que les hydroperoxydes modulent la production de DON et de 15ADON par *F. graminearum*. La spécificité positionnelle





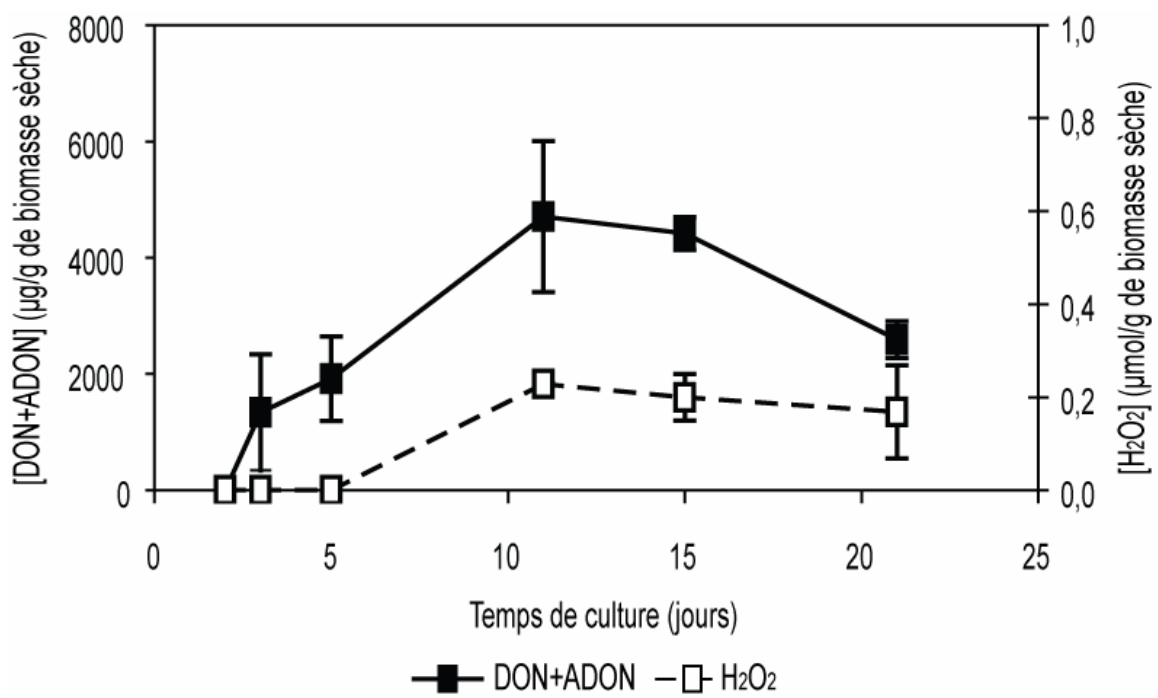
des LOX catalysant *in planta* la peroxydation de l'acide linoléique dans un organe donné sont particulièrement importantes en termes de sens de la modulation de la production de toxines : la présence majoritaire d'une 13-LOX pourrait impliquer une activation de la production de toxines, tandis qu'une 9-LOX pourrait participer à la limitation de l'accumulation de DON/ADON. Là encore, une connaissance de la diversité variétale de l'équipement enzymatique des plantes et de son induction lors d'une attaque pathogène pourrait participer à la limitation du risque mycotoxique.

Kim, *et al.*, (2003) ont purifié et caractérisé une LOX (codée par le gène noté *Lox*) de semis de maïs spécifiquement exprimée 2h après une augmentation du niveau endogène en acide jasmonique (Figure 24). Cette LOX a la particularité de conduire à l'accumulation de 9S- ou de 13S-HPODE avec des spécificités presque identiques (4:6 ratio). Les résultats obtenus semblent indiquer qu'un « burst » d'acide jasmonique déclenche rapidement l'expression de *Lox* ce qui facilite la production d'acide jasmonique endogène à travers son activité 13-LOX. Le système serait ensuite capable de s'auto entretenir grâce à l'implication de son activité 9-LOX dans sa phase tardive d'expression. Ces données sont en accord avec les travaux de Itoh, *et al.*, (2002) ayant indiqué une possible régulation par le jasmonate de la branche 9-LOX de la voie de biosynthèse des oxylipines. Une LOX bi-spécifique serait alors un outil utilisable de façon ubiquitaire pour réguler la voie des lipoxygénases dans le processus de réponse au stress chez les plantes monocotylédones de façon à produire une réponse spécifique. La qualité de ces réponses pourrait alors jouer un rôle important dans l'invasion de la plante par *Fusarium* et dans la production de toxines.

Ces résultats ont été obtenus dans le cadre d'études des modulations de la production de DON/ADON par *F. graminearum* par des stress oxydatifs. Des études préliminaires réalisées sur *F. culmorum* producteur de NIV/FX ont montré que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit des effets opposés à ceux observés chez *F. graminearum* producteur de DON/ADON. Des expériences complémentaires sont alors nécessaires afin de déterminer si les effets que nous décrivons ici dépendent de l'espèce, du chemotype et/ou encore de la souche considérée.



***Chapitre 3 : Métabolisme oxydatif  
fongique et biosynthèse de TCTB***



**Figure 29 : Cinétique de production de DON/15ADON et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire par *F. graminearum* en cultures standard GYEP.**

Certains de nos résultats préliminaires indiquent que *F. graminearum* excrète de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  extracellulaire et que la cinétique d'accumulation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  semble être synchronisée avec la production de DON/ADON (Figure 29, d'après Ponts *et al.*, 2003). Cette synchronisation pourrait indiquer l'existence d'un lien entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  fongique extracellulaire et production de TCTB.

Plusieurs types d'activités enzymatiques qui conduisent à la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ont été rapportés chez *Fusarium spp.* En particulier, des activités de type superoxyde dismutase<sup>34</sup> (Kwon & Anderson, 2001, Medentsev, *et al.*, 2001, Ayar-Kayali, *et al.*, 2002) ou galactose oxydase<sup>35</sup> (Barbosa-Tessmann, *et al.*, 2001, Wilbert & Kimmelmeier, 2003) ont été caractérisées chez *F. spp. graminearum*, *culmorum* et *proliferatum*. En revanche, aucune donnée n'est à notre connaissance disponible quant à un éventuel lien entre cet  $\text{H}_2\text{O}_2$  fongique extracellulaire et la biosynthèse de toxines.

Afin d'éclaircir la signification (ou non) de cet  $\text{H}_2\text{O}_2$  fongique extracellulaire en termes de production de toxines, plusieurs stratégies ont été élaborées. Tout d'abord, nous avons tenté d'identifier un éventuel lien direct entre production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et biosynthèse de TCTB. Plusieurs souches de *F. culmorum* et *graminearum* productrices de DON/ADON ou de NIV/FX ont été caractérisées en termes de production de toxines et de production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  extracellulaire en cultures liquides GYEP. En parallèle, les activités catalase<sup>36</sup> et superoxyde dismutase intracellulaires de ces souches ont été étudiées. Enfin, l'importance de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fongique extracellulaire pour la biosynthèse de DON/ADON par *F. graminearum* a été évaluée.

#### **I. Accumulation de $\text{H}_2\text{O}_2$ fongique extracellulaire et production de trichothécènes de type B par *F. culmorum* et *graminearum***

---

<sup>34</sup>  $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

<sup>35</sup>  $\text{R-CH}_2\text{OH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{R-CHO} + \text{H}_2\text{O}_2$

<sup>36</sup>  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^-$



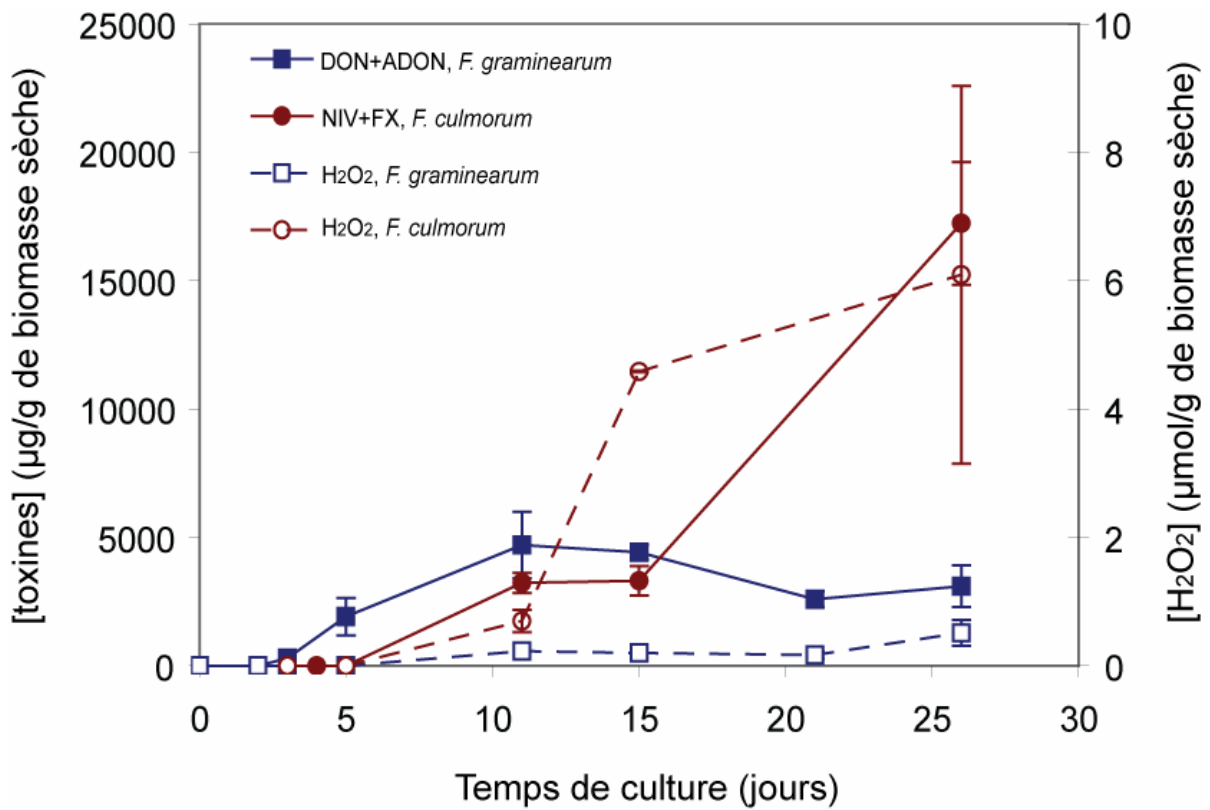
#### **I.1. Etude de l'existence d'un lien statistique entre accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire et production de toxines**

Nous avons sélectionné différentes souches de *F. culmorum* et *graminearum* productrices de chemotypes DON ou NIV (voir matériel et méthodes) que nous avons caractérisées en termes de production de toxines et de production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire en milieu GYEP après 15 jours de culture (le temps 15 jours a été choisi comme un temps de culture auquel la production de toxines a atteint un maximum en cultures standard GYEP). Ces productions sont exprimées en rendement par gramme de biomasse sèche (les niveaux en TCTB étant mesurés en microgrammes et ceux en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en micromoles).

Lorsque l'ensemble des souches est considéré, il n'y a pas de corrélation entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire et production de toxines. En revanche, les calculs de coefficients de corrélation de Pearson pour les données relatives d'une part aux souches appartenant à l'espèce *culmorum* et d'autre part aux souches appartenant à l'espèce *graminearum* révèlent l'existence potentielle d'un lien négatif entre biosynthèse de toxines et production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les souches *F. graminearum* ( $r^2 = 0,60$ ). Ce lien semble se renforcer ( $r^2 = 0,73$ ) lorsque seules les souches *F. graminearum* de chemotype NIV sont considérées.

Ces résultats semblent indiquer que les évènements conduisant à la production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et à la biosynthèse de TCTB par *F. graminearum* sont négativement liés, et tout particulièrement lorsque la souche considérée est de chemotype NIV (par opposition au chemotype DON) : une forte production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique serait associée à une faible production de NIV (ou une faible production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique serait associée à une forte production de NIV).

Cependant, ces conclusions sont à moduler pour plusieurs raisons que nous allons détailler en suivant.



**Figure 30 : Différences des cinétiques de production en TCTB et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction des souches considérées.**



### **I.2. Force du lien statistique**

#### ***I.2.a. Contraintes expérimentales liées à *Fusarium* et à la production de toxines***

Une faiblesse du protocole expérimental utilisé réside dans le caractère ponctuel (ici à 15 jours) de la mesure effectuée. En effet, les cinétiques de production de toxines ne sont pas forcément identiques entre différents individus, et il semble qu'il en soit de même pour la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se placer, comme c'est le cas ici, au temps 15 jours pour observer un lien entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique et accumulation de toxines peut alors se révéler très judicieux dans certains cas et beaucoup moins dans d'autres.

A titre d'exemple, nous avons comparé les cinétiques de production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de notre souche modèle *F. graminearum* CBS185.32 (chemotype DON/ADON) à celle de la souche *F. culmorum* INRA 337 (chemotype NIV/FX). Les cinétiques d'accumulation de toxines dans les milieux de culture de ces deux souches ont également été comparées (Figure 30).

#### ***Comparaison entre *F. graminearum* de chemotype DON et *F. culmorum* de chemotype NIV***

La production de NIV/FX ne devient détectable qu'entre 5 et 11 jours de culture alors que la présence de DON/ADON dans les milieux est observée dès le 3<sup>e</sup> jour de culture. La cinétique d'accumulation de NIV/FX semble retardée de quelques jours par rapport à celle de DON/ADON. Il n'en est pas de même en ce qui concerne les cinétiques de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Que ce soit dans les cultures de *F. culmorum* ou dans celles de *F. graminearum*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est toujours pas détectable au 5<sup>e</sup> jour de culture. Les productions en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par ces deux espèces de *Fusarium* semblent s'initier peu avant le 11<sup>e</sup> jour de culture pour ensuite diverger. La production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *F. graminearum* semble se stabiliser de la même façon que l'accumulation de DON/ADON se stabilise.

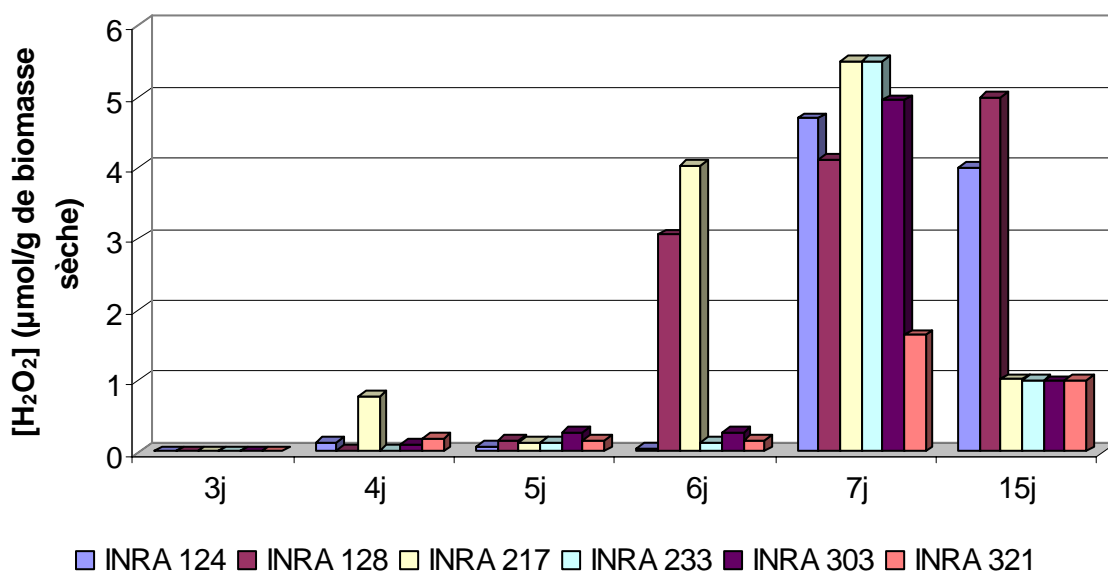


Figure 31 : Profils de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour 6 souches *F. culmorum* de chemotype DON.

### ***Chapitre 3 : Métabolisme oxydatif fongique et biosynthèse de TCTB***

---

En revanche, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *F. culmorum* augmente de façon importante jusqu'à 15 jours de culture et semble se stabiliser par la suite. C'est aussi entre 15 et 21 jours de culture que l'accumulation de NIV/FX dans les milieux semble s'accélérer. Ainsi, chez *F. graminearum* CBS185.32, il semble que l'initiation de la production de DON/ADON soit un évènement ayant lieu avant que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne s'accumule dans les milieux. Par la suite, la production de DON/ADON comme la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atteint très rapidement un niveau stable. La situation chez *F. culmorum* INRA 337 est très différente. Les initiations des productions de NIV/FX et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semblent synchronisées. Puis, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente la première de façon rapide, et ce n'est qu'à la fin de cette augmentation que l'accumulation de NIV/FX s'accélère de nouveau, après 21 jours de culture.

Ces observations pourraient représenter un indice supplémentaire quant à un lien possible entre production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et accumulation de toxines. En particulier, la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *F. culmorum* semble particulièrement liée à la cinétique d'accumulation de NIV/FX. De plus, elles illustrent des variations physiologiques des profils de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre individus sans toutefois nous permettre de savoir si ces variations sont espèces, chemotypes ou encore souches dépendantes.

#### ***Observations espèce, chemotype et/ou souche dépendantes***

Nous avons suivi les profils de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de six souches *F. culmorum* de chemotype DON. Les rendements en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire ont été mesurés après 3 jours, 4 jours, 5 jours, 6 jours, 7 jours et 15 jours de culture. Les résultats sont rapportés sur la figure 31.

Il apparaît que, chez 4 souches parmi les 6 testées, la production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente entre le 6<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour de culture. Les souches INRA 128 et INRA 217 semblent produire H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de façon plus précoce (24 heures plus tôt). Une constante est toutefois observable : 100 % des souches testées ont atteint un niveau quasi optimum de production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 7 jours de culture. Cet optimum est maintenu jusqu'à 15 jours pour seulement deux des six souches (INRA 124 et INRA 128) indiquant que le choix



## ***Chapitre 3 : Métabolisme oxydatif fongique et biosynthèse de TCTB***

---

de se placer après 15 jours de cultures n'est pas adapté à toutes les souches. Se placer à 7 jours semble plus ubiquitaire en terme de production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les observations sont différentes en ce qui concerne la toxinogénèse. En effet, il n'est pas rare que la biosynthèse de toxines après 7 jours de cultures ne soit pas détectable pour de nombreuses souches. C'est le cas en ce qui concerne les souches de cette étude pour lesquelles la production de toxines n'a pas été détectée jusqu'au 7<sup>e</sup> jour de culture inclus (données non présentées). L'utilisation d'une technique très sensible de détection et de dosage des TCTB pourrait permettre des analyses à des temps de culture inférieurs ou égaux à 7 jours (voir chapitre 1 de cette thèse).

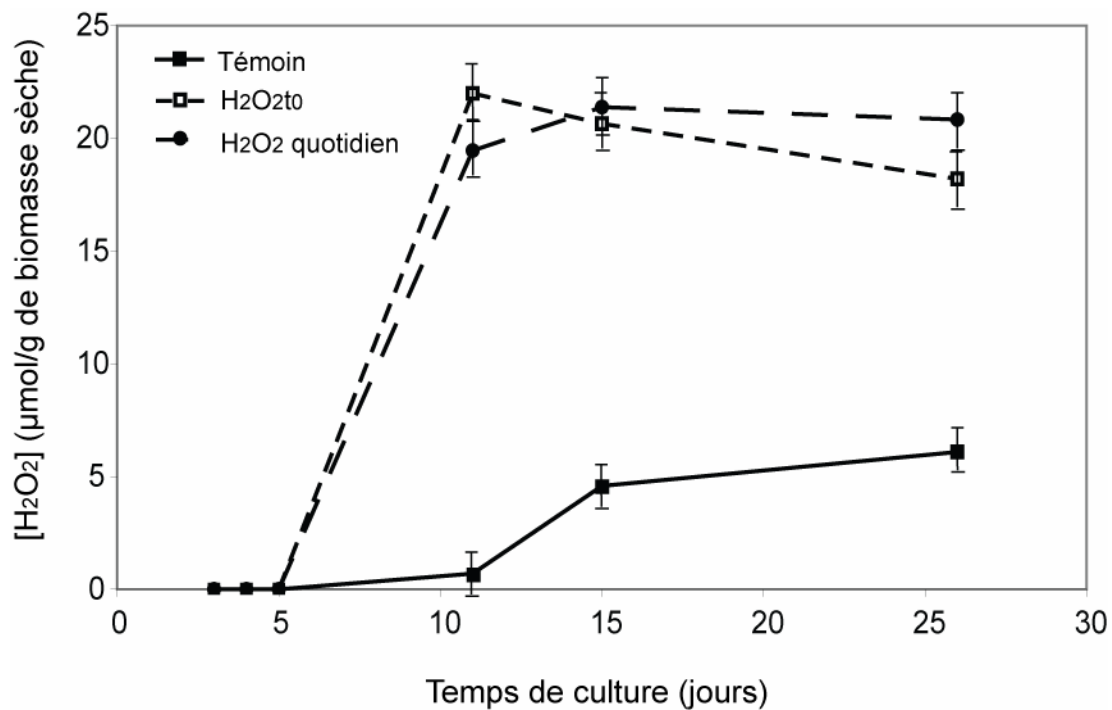
Ces observations confirment l'existence d'un biais lorsqu'une mesure ponctuelle est utilisée.

### ***1.2.b. Puissance du test statistique***

Un autre paramètre à considérer lors de l'interprétation de nos analyses de corrélation est que le lien révélé est le résultat de l'interprétation d'une valeur statistique, le coefficient de Pearson, à laquelle il ne faut pas donner plus de signification qu'elle n'en a. La mise en évidence d'une corrélation statistique entre deux évènements n'implique pas de causalité. Ensuite, en statistiques, l'effectif doit être plus important pour donner au test une puissance plus satisfaisante afin d'accroître la confiance que l'on peut accorder au test (risque  $\beta$  d'attribuer au hasard une différence qui est en fait significative). Le protocole idéal est d'utiliser un nombre plus élevé de souches (N = 30 au minimum) pour chaque chemotype de chaque espèce (c'est-à-dire un minimum de 120 souches au total). A l'heure actuelle, nous ne disposons pas des souches et du matériel nécessaires à la réalisation d'une telle expérience.

### ***1.2.c. Echantillonnage et représentativité***

Une autre raison d'ordre mathématique nous incite à moduler l'interprétation de nos résultats. Notre échantillonnage présente un biais dont l'importance n'était pas



**Figure 32 : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulé dans les milieux de culture GYEP au cours de la production de NIV et de FX par *F. culmorum* INRA 337 en cultures GYEP supplémentées ou non par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène.**

Les mesures de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> présentées dans cette figure ont été réalisées dans les mêmes cultures que celles utilisées lors des mesures des rendements en toxines décrites dans la figure 23.

### ***Chapitre 3 : Métabolisme oxydatif fongique et biosynthèse de TCTB***

---

mesurable lors de la sélection des souches à utiliser dans notre étude. En effet, une seule des souches *F. culmorum* testées est de chemotype NIV alors que parmi les souches *F. graminearum* utilisées pour cet essai il y a autant de souches de chemotype DON que de souches de chemotype NIV. L'origine de ce biais est identifiée : l'échantillon choisi est représentatif de la population des souches à notre disposition en collection (isolées après des prélèvements en champs français ayant eu lieu ces dix dernières années), et il s'avère que les souches de chemotype NIV y sont largement minoritaires. Ainsi, le lien statistique apparent entre production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et biosynthèse de TCTB par *F. graminearum* (chemotypes confondus), qui ne semble pas exister chez les souches *F. culmorum*, peut n'être attribuable qu'aux souches *F. graminearum* de chemotype NIV. Il n'est alors pas possible de déterminer s'il s'agit d'une observation plutôt liée à l'espèce, au chemotype, ou encore aux deux paramètres. Il n'est donc pas à exclure l'existence d'un lien statistique entre production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et biosynthèse de NIV/FX pour des souches *F. culmorum*.

Nous avons voulu tester cette hypothèse sur la souche *F. culmorum* INRA 337 de chemotype NIV que nous avons utilisée précédemment (chapitre 2) : les milieux de culture GYEP ont été supplémentés ou non en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène. Au cours de cette expérience nous avons montré que supplémenter les milieux avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au moment de l'inoculation tout comme les supplémenter de façon quotidienne pendant 26 jours réduit de façon significative l'accumulation de NIV/FX dans les cultures (chapitre 2, figure 23). Notre hypothèse est la suivante : puisque les cinétiques d'accumulation de NIV/FX dans les cultures supplémentées en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène, que ce soit au moment de l'inoculation ou quotidiennement, sont similaires, alors les profils d'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire dans ces cultures doivent être tout autant similaires entre eux. Nous avons mesuré les quantités en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulées au cours de ces cinétiques. Les résultats sont présentés figure 32.

Il est tout d'abord important de noter qu'après 3 jours de culture la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas détectable dans les milieux quelle que soit la condition de culture considérée : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène disparaît rapidement après son introduction, et cette disparition est liée à la présence du champignon (en milieu GYEP stérile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas

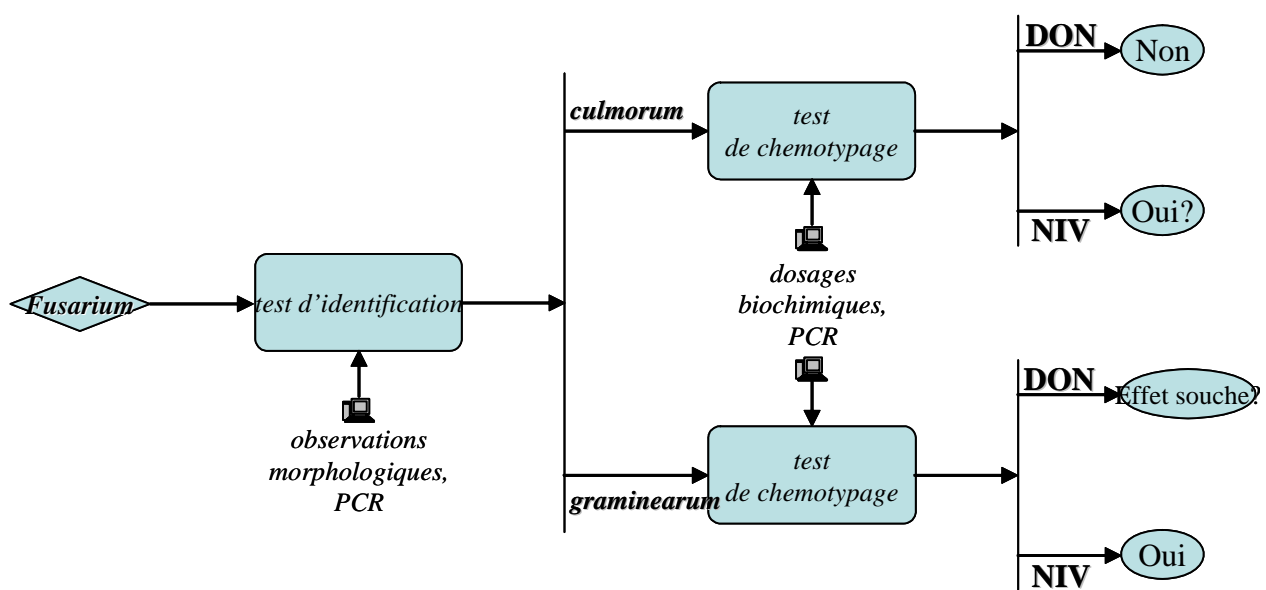


Figure 33 : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique est-il négativement lié à l'accumulation de toxines?



dégradé, donnée non présentée). Il semble donc que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> détecté dans les jours suivants soit effectivement le résultat d'une production fongique. Le choix d'exprimer les niveaux en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en micromoles par gramme de biomasse fongique sèche est donc justifié. En s'intéressant aux profils d'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les milieux de culture supplémentés la conclusion est immédiate : ils sont tout aussi similaires que les cinétiques d'accumulation de NIV/FX correspondantes le sont, ce qui vérifie notre hypothèse. Enfin, après 11 jours de culture, les concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mesurées dans les milieux supplémentés sont jusqu'à 31 fois plus importantes que dans le témoin ce qui est en accord avec l'hypothèse de l'existence d'un lien négatif entre production de NIV/FX et production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### I.3. Synthèse

La question posée au début de ces travaux est claire : existe-t-il un lien entre production fongique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et production de TCTB ?

La réponse qui y est faite est moins définitive que l'interrogation elle-même. La figure 33 synthétise l'ensemble des éléments de réponse que nos travaux ont permis d'apporter. Il semble que les évènements d'accumulation *in vitro* des TCTB ne soient pas totalement indépendants des productions fongiques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> même si aucun lien causal ne peut être établi. D'une façon plus précise il semble que l'expression du chemotype NIV soit négativement associée à la production fongique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quelle que soit l'espèce considérée, *culmorum* ou *graminearum*. La production de DON/ADON par *F. graminearum* uniquement semble également être négativement associée à la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sans qu'un effet souche dépendant ne puisse être écarté. De la même façon, il n'est pas éliminé que le lien entre production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et production en NIV/FX par *F. culmorum* peut lui aussi être souche dépendant. En revanche, il n'a été mis en évidence aucun lien entre production de DON/ADON et production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *F. culmorum*.

L'ensemble de ces résultats confirme également l'existence d'une production fongique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *F. graminearum* CBS185.32 (mise en évidence par Ponts *et al.*,



2003) mais aussi par d'autres souches *F. graminearum* et par des souches *F. culmorum* (chemotypes DON et NIV confondus). Des activités enzymatiques de type catalase et superoxyde dismutase impliquées dans le métabolisme de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été particulièrement décrites chez divers microorganismes pathogènes. Il s'avère qu'elles sont largement impliquées dans les agressivités des pathogènes vis-à-vis de leurs hôtes respectifs. Chez le modèle *Claviceps/riz* l'inhibition de la transcription des gènes codant des catalases entraîne une diminution de l'agressivité du pathogène (Nathues, *et al.*, 2004). Chez le modèle *Botrytis/haricot* une Cu-Zn-superoxyde dismutase a été identifiée comme un facteur d'agressivité (Rolke, *et al.*, 2004), mais aussi comme un facteur d'agressivité non essentiel chez le modèle *Claviceps/riz* (Moore, *et al.*, 2002). Kwon et Anderson (2001) ont montré que certaines isozymes de superoxyde dismutase et de catalase de *Fusarium* sont particulièrement actives lors du processus d'infection du blé.

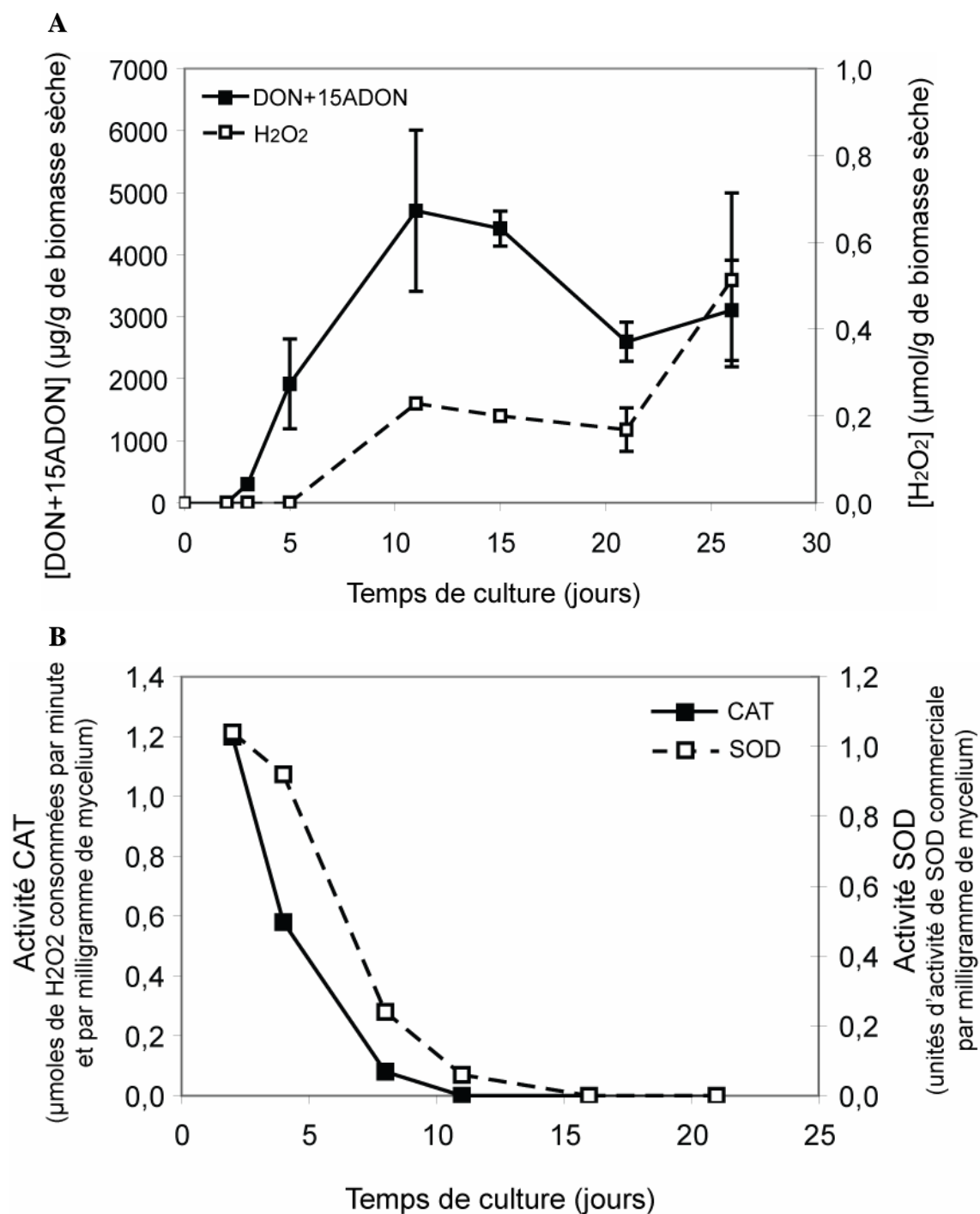
Nous nous sommes intéressés aux variations des activités superoxyde dismutases et catalases de *F. graminearum* au cours de la production de toxines en milieu liquide GYEP. Nos résultats ont été comparés aux cinétiques d'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> précédemment décrites. L'approche enzymatique est en effet complémentaire de ces travaux. Affranchis des limites imposées par la méthode de dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il est alors possible d'évaluer de façon plus fiable l'importance du métabolisme oxydatif de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **II. Activités enzymatiques (catalase et superoxyde dismutase) et biosynthèse de trichothécènes de type B**

*(Encadrement d'un projet de recherche d'année universitaire de Master Recherche, Couëdelo, 2005).*

### **II.1. Cinétiques enzymatiques CAT et SOD**

Les essais enzymatiques ont été réalisés à partir d'extraits bruts issus de mycéliums de *F. graminearum* CBS185.32 âgés de 2 à 21 jours (cultures liquides



**Figure 34 : Activités enzymatiques CAT et SOD extraites des mycéliums de *F. graminearum* CBS185.32 au cours de la cinétique de production de DON et de 15ADON.**

A : Production de DON plus 15ADON et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *F. graminearum* ; B : Activités enzymatiques CAT et SOD.

standard GYEP). Les procédures expérimentales sont décrites dans le matériel et méthodes.

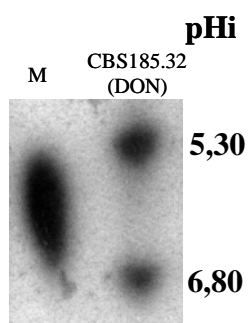
La figure 34B montre les résultats des mesures des activités superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT) dans les extraits protéiques des mycéliums de *F. graminearum* CBS185.32 ; la figure 34A rappelle les cinétiques de production de DON/ADON et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associées à *F. graminearum* CBS185.32.

La figure 34B révèle que les activités enzymatiques sont les plus fortes après 2 et 3 jours de culture, c'est-à-dire avant que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne soit détectable dans les milieux et de façon synchronisée par rapport à l'accumulation de DON/ADON. Le fait que l'activité CAT des mycéliums jeunes soit élevée est en accord avec de précédentes observations (Ponts, *et al.*, 2003) indiquant que *F. graminearum* semble pouvoir éliminer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène de son milieu de façon rapide, entre 0 et 48 heures maximum en fonction de la dose inférieure ou égale à 1 mM introduite. Cette activité CAT importante pourrait également expliquer que malgré une importante activité SOD, génératrice de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il n'y a pas de détection de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans nos milieux avant au moins 5 jours de culture. En revanche, si l'activité CAT réduite et stabilisée observée de 8 à 21 jours de culture est en accord avec une augmentation des niveaux en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les milieux, l'allure décroissante régulière de la courbe d'activité SOD n'explique pas la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire. Cette observation indique que la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par *F. graminearum* n'est que très partiellement attribuable à une activité SOD.

L'activité CAT de ces milieux semble tout particulièrement intéressante. Nous avons voulu aller plus loin en recherchant l'existence éventuelle d'isoformes.

#### **II.2. Mise en évidence de différentes isoformes de CAT chez *F. graminearum* et *F. culmorum***

La présence dans les extraits bruts de différentes isoformes de CAT a été mise en évidence par isoélectrofocalisation sur gel (gradient de pH 3.0 à 9.0).



**Figure 35 : Isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide des isoformes de CAT contenues dans des extraits bruts de *F. graminearum* CBS185.32 de chemotype DON.**

M = extrait de catalase commerciale témoin positif de révélation.

#### ***II.2.a. Mise en évidence de la présence d'isoformes de CAT chez notre souche modèle *F. graminearum* CBS185.32***

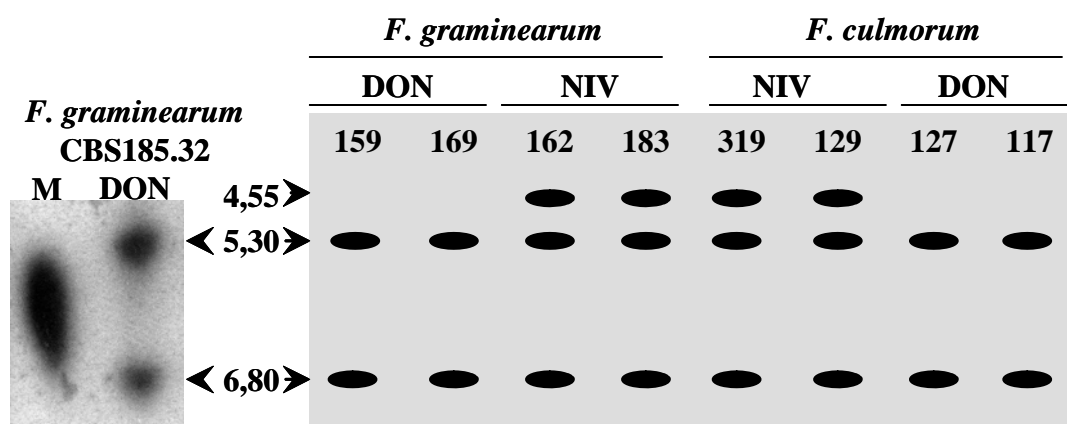
Ceci a été réalisé sur des mycéliums de *F. graminearum* CBS185.32 âgés de 4 jours (cultures standard liquides GYEP). La figure 35 révèle la présence de deux isoformes dont les points isoélectriques sont à pHi 5.3 et pHi 6.8. L'existence de plusieurs formes de catalase chez *F. graminearum* est en accord avec divers travaux qui ont identifié différentes isoformes chez *Fusarium spp. proliferatum*, *oxysporum* et *equiseti* (Kono, *et al.*, 1995, Kwon & Anderson, 2001, Ayar-Kayali, *et al.*, 2002).

Il semble que les activités de ces deux isoformes ne soient pas régulées de la même manière. Les activités catalasiques (estimées d'après l'intensité des signaux visualisés sur les gels d'isoélectrofocalisation) de ces deux isoformes ont été suivies pendant 21 jours en cultures GYEP. Au cours du temps, une diminution progressive de l'activité associée à l'isoforme pHi 6,8 est observée tandis que celle associée à l'isoforme pHi 5,3 semble stable (données non présentées). Ces données semblent suggérer que la diminution d'activité CAT observée sur la figure 34 pourrait être associée, au moins en grande partie, à la diminution de l'activité de l'isoforme pHi 6,8.

#### ***II.2.b. Mise en évidence de la présence d'isoformes de CAT chez des souches *F. graminearum* et *culmorum* de différents chemotypes***

A la suite des résultats obtenus chez *F. graminearum* CBS185.32, de chemotype DON, nous avons recherché la présence d'isoformes de catalase chez d'autres souches de *Fusarium* après 4 jours de culture GYEP (activité CAT potentiellement importante).

L'analyse a été réalisée sur les souches *F. culmorum* INRA 117 et INRA 127 (chemotypes DON), INRA 129 et INRA 319 (chemotype NIV) et les souches *F. graminearum* INRA 159 et INRA 169 (chemotype DON), et INRA 162 et INRA 183 (chemotype NIV). Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus chez *F. graminearum* CBS185.32 de chemotype DON.



**Figure 36 :** Représentation schématique des profils isoélectrophorétiques des extraits bruts de *F. graminearum* et *culmorum* de chemotypes DON ou NIV.

Pour comparaison, le résultat de l'isoélectrofocalisation du système catalasique de *F. graminearum* CBS185.32 est représenté.



La figure 36 montre la représentation schématique des profils électrophorétiques obtenus. Les isoformes de catalase à pHi à 5,3 et pHi 6,8 initialement mises en évidence chez *F. graminearum* CBS185.32 sont retrouvées chez toutes les souches testées. En revanche, une nouvelle isoforme de pHi égal à 4,55 semble être détectée chez les souches *F. graminearum* et *culmorum* de chemotype NIV (respectivement INRA 162 et 183, et INRA 319 et 129), isoforme non visualisée pour les souches de chemotype DON. Il pourrait alors être possible que cette isoforme ne soit présente que chez les souches productrices de NIV.

Nous avons comparé les niveaux d'activités CAT totales des 9 souches de cet essai à leurs niveaux de production de toxines. Il semble qu'il n'y ait pas de lien entre les deux évènements (données non présentées). Cependant, il n'est pas à exclure que seules les activités de certaines isoformes puissent être liées à la production de toxines.

### **II.3. Synthèse**

Nos travaux ont permis d'établir, en fonction du temps, des profils de variation des activités catalase et superoxyde dismutase de *F. graminearum* CBS185.32. Ces cinétiques enzymatiques ont ensuite été comparées à la cinétique de production fongique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nous avons montré que les activités CAT et SOD étudiées sont élevées dans les premiers jours de culture puis déclinent très rapidement. Les allures de ces courbes ne suffisent pas à expliquer l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que nous observons dans les milieux de culture : si la courbe d'activité catalase est en accord avec une accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> détectable après quelques jours de culture, l'activité SOD ne peut à elle seule expliquer cette production et d'autres mécanismes enzymatiques sont impliqués. Comme nous l'avons cité en introduction de ce chapitre, d'autres activités enzymatiques générant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, activités de type galactose oxydase (Barbosa-Tessmann, *et al.*, 2001, Wilbert & Kimmelmeier, 2003), ont été rapportées chez *F. spp. graminearum*, *culmorum* et *proliferatum*.



### ***Chapitre 3 : Métabolisme oxydatif fongique et biosynthèse de TCTB***

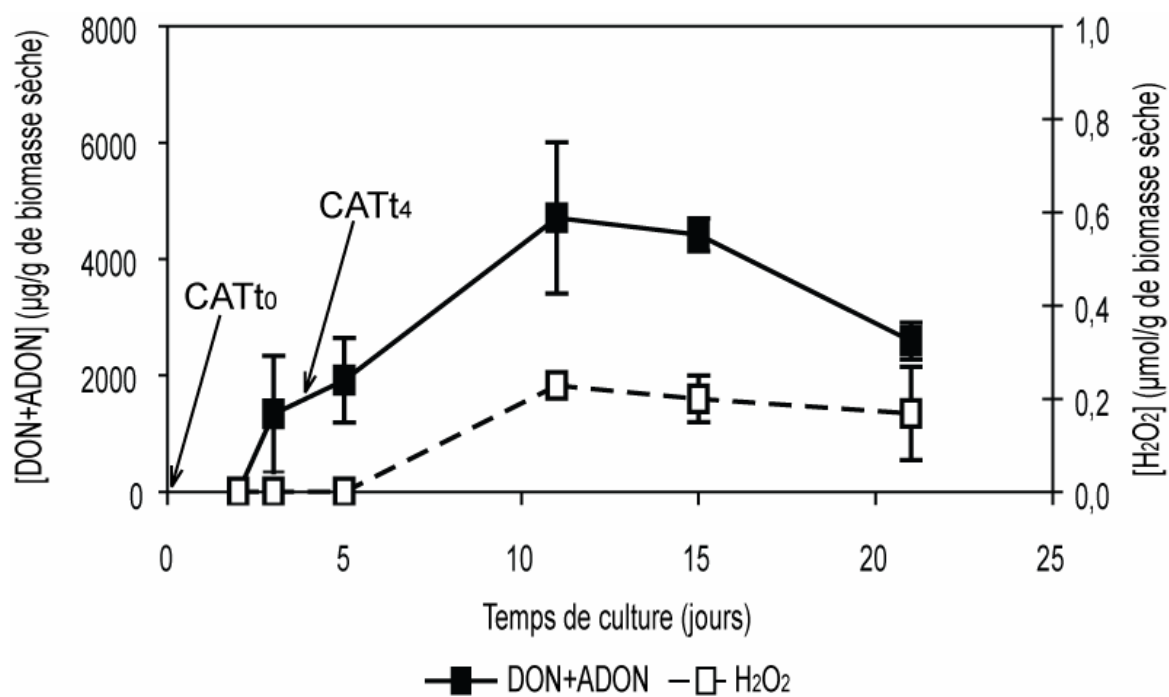
---

Nous nous sommes ensuite intéressés aux diverses isoformes de catalase rencontrées chez *F. culmorum* et *graminearum*.

Il semble que quels que soient l'espèce et le chemotype considérés, deux isoformes de CAT soient détectées, l'une dont le pHi est égal à 6,80, l'autre dont le pHi est égal à 5,30. L'activité de l'isoforme à pHi 6,80 diminuerait dans le temps ce qui est en accord avec la diminution de l'activité CAT totale observée dans les extraits bruts.

Chez les souches de chemotype NIV, l'existence d'une isoforme à pHi 4,55 a été mise en évidence sans que cette isoforme n'ait pu être détectée dans aucune des souches de chemotype DON testées. Ces données semblent en accord avec nos résultats de la première partie de ce chapitre, à savoir que l'importance du métabolisme de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique pour la production de toxine semble être espèce et surtout chemotype dépendant. En particulier, une production importante en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le chemotype NIV semblent être fortement négativement liés : l'isoforme de catalase au pHi égal à 4,55 (une forme donc anionique de catalase) pourrait être particulièrement impliquée dans ces régulations.

Ces résultats ouvrent de nombreuses pistes de recherches. En particulier, la caractérisation des diverses isoformes de catalase chez un large panel de souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* tous chemotypes confondus pourrait être entreprise par des approches biochimiques et enzymatiques mais aussi moléculaires (identification des gènes codant ces isoformes et analyse de leurs niveaux d'expression dans différentes souches *etc.*). De plus, la (les) activité(s) responsable(s) de l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'a(ont) pas encore été identifiée(s). Les activités SOD mesurées dans les extraits bruts ne permettent pas d'expliquer la cinétique d'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire. Nous avons cependant noté que les activités SOD mesurées chez *F. culmorum* de chemotype NIV sont environ 10 fois plus élevées que dans le cas des autres souches (données non présentées). La signification de cette observation n'est pas connue, et une exploration plus fine des activités SOD chez *Fusarium spp.* serait nécessaire pour déterminer si ce fait a un lien avec la production de toxines.



**Figure 37 : Cinétiques d'accumulation de DON/15ADON et rendements en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenus pour la souche *F. graminearum* CBS185.32 en cultures standard GYEP.**

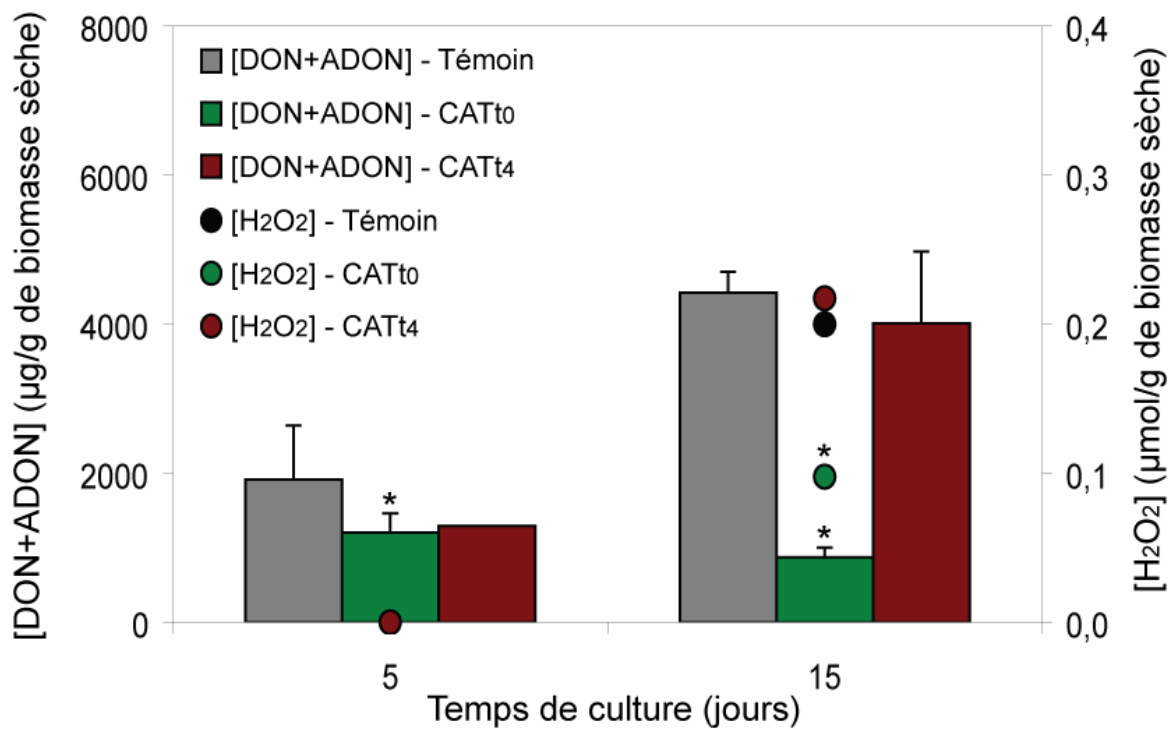
CATt<sub>0</sub> et CATt<sub>4</sub> indiquent à quel moment le métabolisme fongique sera perturbé par l'ajout de catalase.

Les propriétés de dégradation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la catalase ont ensuite été utilisées dans le but d'évaluer l'importance de l'accumulation en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire pour la biosynthèse de DON/ADON par *F. graminearum*. Les milieux de culture ont été supplémentés avec de la catalase commerciale au moment de l'inoculation ou 4 jours après inoculation. Les niveaux en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire et les niveaux en toxines ont été mesurés après le 5<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour de culture.

### **III. Importance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire pour la biosynthèse de DON/ADON par *F. graminearum***

Afin d'évaluer le degré d'importance du métabolisme de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire dans la production de toxines par *F. graminearum* CBS185.32, nous avons supplémenté les milieux de culture en catalase commerciale (Sigma-Aldrich numéro de produit C9322). Son activité en milieu GYEP à pH 6.1 a été vérifiée : après 24 heures d'incubation à 25°C (à l'obscurité et sous agitation à 150 rpm), 47 unités de catalase ont dégradé 0,3 micromoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 94 unités de catalase ont dégradé 1 micromole de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dans un volume total de 100 mL dans les deux cas ; l'activité CAT obtenue dans nos conditions est environ 2 fois inférieure à l'activité optimale donnée par le fournisseur). Habituellement, les quantités en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulées dans les milieux de culture de *F. graminearum* CBS185.32 ne dépassent pas 1 µmole. L'activité de 94 unités de cette catalase, dans nos conditions, est donc suffisante pour permettre la dégradation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire.

La figure 37 représente les cinétiques d'accumulation de DON/ADON ainsi que les rendements en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mesurés dans les milieux de culture non supplémentés en catalase. Les allures de ces cinétiques sont celles classiquement obtenues avec la souche *F. graminearum* CBS185.32. Nous avons supplémenté nos cultures avec 94 unités de catalase au moment de l'inoculation ou 4 jours après inoculation (notés respectivement CAT<sub>t0</sub> et CAT<sub>t4</sub>). Les biomasses sèches dans ces milieux ont été mesurées et ne sont pas différentes de celles obtenues dans notre témoin (données non présentées). Les



**Figure 38 : Rendements en DON/ADON et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 5 et 15 jours de culture en milieux supplémentés avec de la catalase exogène.**

CAT<sub>0</sub> = supplémentation au moment de l'inoculation ; CAT<sub>4</sub> = supplémentation 4 jours après inoculation ; \* = différence significative (Test de Student, p < 0,05).

Le rendement en DON/ADON obtenu après 5 jours de culture en condition CAT<sub>4</sub> est le résultat d'une mesure unique et, de ce fait, dont la significativité par rapport au témoin ne peut pas être établie.

### ***Chapitre 3 : Métabolisme oxydatif fongique et biosynthèse de TCTB***

---

rendements en DON/ADON et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les milieux supplémentés ont été mesurés après 5 jours et 15 jours de culture. Les résultats sont présentés figure 38.

Les rendements en DON/ADON dans les milieux supplémentés au moment de l'inoculation, c'est-à-dire CAT<sub>t0</sub>, sont significativement réduits ( $p < 0,05$ ). En particulier, après 15 jours de culture, l'accumulation en DON/ADON est réduite 5 fois. Il n'en est pas de même après 15 jours de culture dans les milieux supplémentés 4 jours après inoculation (CAT<sub>t4</sub>), milieux pour lesquels il n'y a pas de différence significative entre les rendements mesurés dans nos échantillons traités en comparaison avec notre témoin<sup>37</sup>. La même tendance est observée en ce qui concerne les rendements en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après 15 jours de culture, les valeurs relevées dans les milieux supplémentés au moment de l'inoculation sont inférieures à celles mesurées dans les cultures témoins. En revanche, il n'y a pas de différence entre les rendements en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenus dans les cultures témoins et ceux obtenus dans les cultures CAT<sub>t4</sub>.

Ces résultats sont en accord avec l'ensemble des données de ce chapitre : il semble qu'il existe un lien entre le métabolisme de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la production de DON/ADON par *F. graminearum* CBS185.32. Toutefois, quelques commentaires s'imposent. Dans les cultures témoins, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas détectable au cours des 5 premiers jours de culture. Or, nous venons de voir qu'ajouter de la catalase en début de culture a pour effets de réduire les rendements en DON/ADON et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique 15 jours plus tard. Il est donc probable que les rendements de production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours des premiers jours de culture de *F. graminearum* ne soient pas nuls, malgré la non détection de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les milieux.

Revenons tout d'abord sur la méthode de dosage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui a été utilisée. La technique utilisée, imposée par sa simplicité et sa rapidité d'exécution, ne permet pas de détecter des teneurs en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inférieures à 1 µM (à titre indicatif, dans nos cultures standards, 1 µM est environ équivalent à 0,1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par gramme de mycélium). En cultures GYEP, les milieux inoculés avec *F. graminearum* se colorent très rapidement en orange foncé tirant vers le brun puis le marron foncé ce qui traduit la

---

<sup>37</sup> Dans le cas de CAT<sub>t4</sub>, il n'a été possible de mesurer le rendement en DON/ADON après 5 jours de culture que dans un réplicat biologique unique, ce qui explique que malgré une valeur numérique inférieure au témoin il n'y ait pas d'analyse statistique de significativité proposée, et donc aucune conclusion possible.





présence de pigments. La présence de pigments de couleurs foncées traduit l'oxydation de composés phénoliques par des peroxydases (entre autres activités enzymatiques) qui vont consommer  $H_2O_2$  au fur et à mesure de sa production. Il ne nous est alors pas possible de déterminer si  $H_2O_2$  est effectivement produit et immédiatement dégradé ou bien s'il n'est simplement pas produit. La dégradation de  $H_2O_2$  par des peroxydases pourrait expliquer que lorsque CAT est ajouté 4 jours après inoculation, c'est-à-dire dans des milieux très pigmentés, CAT exogène ne semble pas (ou peu) avoir d'effet sur la production de toxines :  $H_2O_2$  utilisé pour l'oxydation des phénols n'est alors pas disponible pour la CAT. L'analyse des activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme fongique de  $H_2O_2$  permet de contourner l'obstacle expérimental lié à la détection de  $H_2O_2$  présent dans les milieux de culture. La caractérisation de ces enzymes (affinités pour leurs substrats, comme par exemple affinité des peroxydases et catalases fongiques pour  $H_2O_2$ ) permettrait de mieux comprendre le métabolisme oxydatif du champignon.

#### **IV. Métabolisme oxydatif fongique et biosynthèse de TCTB : discussion**

L'ensemble de nos résultats semble indiquer que le métabolisme de  $H_2O_2$  chez *Fusarium* est un élément important à prendre en compte lorsque la biosynthèse de trichothécènes de type B est considérée.

Le lien semble particulièrement fort chez *F. graminearum*, notamment en ce qui concerne les souches de chemotype NIV. Chez *F. culmorum*, un lien semble suggéré chez la souche INRA 337 de chemotype NIV, tandis qu'il semble que production en  $H_2O_2$  et production de DON/ADON par *F. culmorum* soient des événements indépendants (synthèse figure 33). Ces observations ont été complétées avec des données enzymologiques.

Il semble que des activités catalase soient particulièrement impliquées dans ces relations. En revanche, la cinétique d'accumulation en  $H_2O_2$  observée chez *F.*



### ***Chapitre 3 : Métabolisme oxydatif fongique et biosynthèse de TCTB***

---

*graminearum* CBS185.32 ne peut être expliquée en considérant uniquement les activités superoxide dismutase fongiques. Un indice supplémentaire quant au rôle important des catalases dans l'accumulation de TCTB par *Fusarium spp. graminearum* et *culmorum* est apporté par la recherche d'isoformes de catalase dans les mycéliums. Deux isoformes de pHi 5,30 et 6,8 sont présentes chez toutes les souches testées. L'activité de l'isoforme à pHi 6,8 semble diminuer avec le temps ce qui est en accord avec la cinétique enzymatique CAT mesurée dans les extraits bruts. En revanche, les souches *F. graminearum* et *F. culmorum* de chemotype NIV possèdent une isoforme supplémentaire dont le pHi est égal à 4,55. La présence d'une isoforme supplémentaire pourrait coïncider avec la dépendance des événements de production de TCTB et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Toutefois, ces données ne sont que les résultats de travaux préliminaires et aucune conclusion ne peut en résulter avant d'avoir vérifié la répétition de ces observations chez d'autres souches *F. culmorum* et *F. graminearum*.

La dépendance des productions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de DON/ADON par *F. graminearum* CBS185.32 a également été confirmée par une diminution de la production de DON/ADON causée par une augmentation de l'activité catalasique, par ajout de catalase exogène, présente en début de culture. En revanche, si la catalase exogène est ajoutée plus tardivement, au 4<sup>e</sup> jour de culture, la production de DON/ADON ne semble pas affectée. Ceci rappelle nos observations quant à la sensibilité accrue de *Fusarium* lors d'un stress oxydatif précoce par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène en terme de production de TCTB (chapitre 2 de cette thèse).

L'ensemble de nos résultats est en accord avec de précédents travaux qui indiquent l'implication particulière de catalase lors d'un stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Angelova, *et al.*, 2005). Il semble également que la nature du stress oxydatif détermine la nature de la réponse en termes d'activités enzymatiques : l'augmentation des activités catalase seraient associées à un stress par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tandis qu'un stress par du methyl viologen (composé générateur d'anions superoxydes) conduirait à l'augmentation des activités SOD (Angelova, *et al.*, 2005).

Une suite à l'ensemble des expériences composant ce chapitre serait de confirmer ces données sur un grand nombre de souches mais aussi de s'intéresser à d'autres



### ***Chapitre 3 : Métabolisme oxydatif fongique et biosynthèse de TCTB***

---

activités enzymatiques telles des glucose-6-phosphate deshydrogénases ou des glutathion réductases dont les implications lors de réponses adaptatives à un stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été démontrées chez d'autres microorganismes (Lee, *et al.*, 1993).

Nous avons décrit de nombreux effets de divers stress oxydatifs, en particulier chez *F. graminearum* de chemotype DON/15ADON. Nous avons notamment observé que les effets d'un stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appliqué au moment de l'inoculation semblent opposés aux effets d'un stress « inverse » lié à l'ajout de catalase exogène également appliqué au moment de l'inoculation. Dans le chapitre suivant, nous avons choisi d'aborder ces données particulières selon une approche transcriptomique.



***Chapitre 4 : Variations du profil du transcriptome de *F. graminearum* de chemotype DON/15ADON en conditions de stress oxydatif***





Au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence que différents paramètres oxydatifs du milieu modulent de façon très importante la production de TCTB par *Fusarium*. Toutefois, les mécanismes impliqués derrière ces modulations ne sont pas élucidés. Dans le chapitre 3 de cette thèse, nous nous sommes intéressés au métabolisme oxydatif de *Fusarium* d'un point de vue enzymatique. L'étape suivante consistait à s'intéresser au transcriptome de *Fusarium* et aux variations de son profil au cours de la cinétique de production de toxines en conditions standard de culture et sous l'effet de stress oxydatifs.

Deux techniques ont été envisagées. La première repose sur l'utilisation de biopuces à ADN (microarrays) et consiste en une approche transcriptomique globale de criblage des gènes dont les niveaux d'expressions sont modulés en conditions de stress oxydatifs. La deuxième technique utilisée est une technique de RT-PCR dite en temps réel permettant une analyse plus fine (approche locale) des variations des niveaux d'expressions de gènes candidats.

Ces techniques sont complémentaires. L'approche globale est une approche « sans *a priori* » qui permet de déterminer quels sont les gènes dont les expressions sont modulées dans nos conditions. Il s'agit d'un essai dont la réussite peut ouvrir un nombre important de perspectives de recherche. L'approche ciblée par RT-PCR en temps réel analyse précisément les niveaux d'expression de gènes choisis, ce qui implique d'avoir un minimum de connaissance quant aux gènes dont les niveaux d'expression sont susceptibles d'être modulés dans nos conditions de stress.

En considérant la voie de biosynthèse des TCT présentée en introduction et au cours du chapitre 1 de cette thèse (Figure 19), le premier gène dont l'étude semble être incontournable est *Tri5* qui code la trichodiène synthase, l'enzyme catalysant la formation du trichodiène, précurseur de tous les trichothécènes. Des données préliminaires ont indiqué qu'en mini-cultures liquides, *Tri5* a été fortement détecté chez *F. graminearum* au 3<sup>e</sup> jour de culture, et que son expression augmente en même temps que la production de DON et de 15ADON (Bernarde, 2005). De plus, de précédents résultats ont indiqué que l'expression de *Tri5* est activée chez *F. graminearum* issu de cultures GYEP supplémentées en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM (Ponts, *et al.*, 2003). Sur des épis de blés inoculés artificiellement 8 jours après la floraison (stade aqueux), le gène *Tri5*



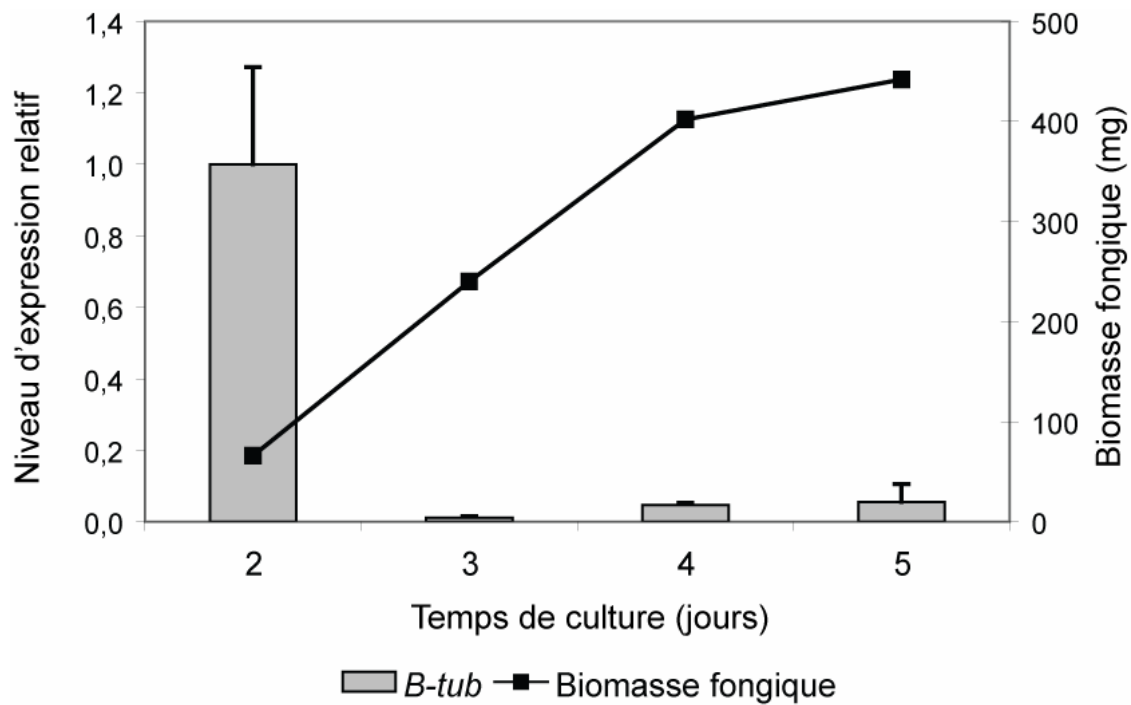
semble être fortement exprimé 5 jours après inoculation et au moins jusqu'au 12<sup>e</sup> jour après inoculation (Barreau C., communication personnelle). L'expression de *Tri5* semble être un excellent indicateur de l'induction de la toxigenèse.

Le niveau d'expression de 5 autres gènes *Tri* impliqués directement dans la voie des TCTB ont été étudiés. Nous avons d'abord choisi de nous intéresser à *Tri6* et *Tri10* qui codent les deux régulateurs transcriptionnels positifs des autres gènes *Tri*. Puis nous avons sélectionné *Tri4* qui code une monooxygénase, de type cytochrome P450, impliquée de façon précoce dans la voie de biosynthèse. L'étude de *Tri12* a également son importance puisqu'il code une protéine transporteur responsable de la sécrétion des TCTB. Enfin, *Tri101* a également été étudié. TRI101 est une C3-O-acétylase : l'acétylation des trichothécènes en C3 semble diminuer leurs toxicités (Kimura, *et al.*, 1998, Kimura, *et al.*, 1998, McCormick, *et al.*, 1999). L'implication de TRI101 dans l'accumulation de 15ADON a été par ailleurs évoquée dans le chapitre 1 de cette thèse.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé au cours d'un séjour de 3 mois au sein du laboratoire de T. Ouellet et avec la collaboration de L. Harris (Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa (ON), CANADA). Ces laboratoires disposent en effet de l'équipement nécessaire à la réalisation de biopuces et de l'expérience nécessaire à la mise en œuvre de nos expériences même si ces équipes travaillent habituellement sur du matériel nucléaire d'origine végétale (blé ou maïs).

### I. Approche locale : RT-PCR en temps réel

Traditionnellement, l'expression constitutive du gène  *$\beta$ -tub* codant la  $\beta$ -tubuline est utilisée comme référence interne pour la normalisation des niveaux d'expression des autres gènes étudiés. Nos premiers essais ont donc concerné l'analyse de l'expression de  *$\beta$ -tub*. Les niveaux d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri12*, *Tri6*, *Tri10* et *Tri101* ont ensuite été étudiés en conditions de stress oxydatifs après avoir décrit leurs cinétiques d'expression en conditions standard de culture GYEP.



**Figure 39 : Expression du gène  $\beta$ -*tub* codant la  $\beta$ -tubuline au cours des 5 premiers jours de croissance de *F. graminearum* CBS185.32.**

Le facteur de normalisation est arbitrairement choisi comme étant le niveau d'expression de  $\beta$ -*tub* après 2 jours de culture.

*Les réactions de transcription inverse (RT) ont été réalisées sur 5 µg d'ARN total. Les valeurs présentées sont les moyennes des niveaux d'expression obtenus entre 2 replications biologiques. Pour chacun des replications 2 extractions d'ARN totaux ont été réalisées, et 2 réactions de transcription inverse ont été effectuées pour chaque extrait. Pour chacun des lots d'ADNc ainsi obtenus et pour chaque gène à étudier, 2 analyses PCR en temps réel indépendantes ont été réalisées (échantillon en tripliquât à chaque fois).*

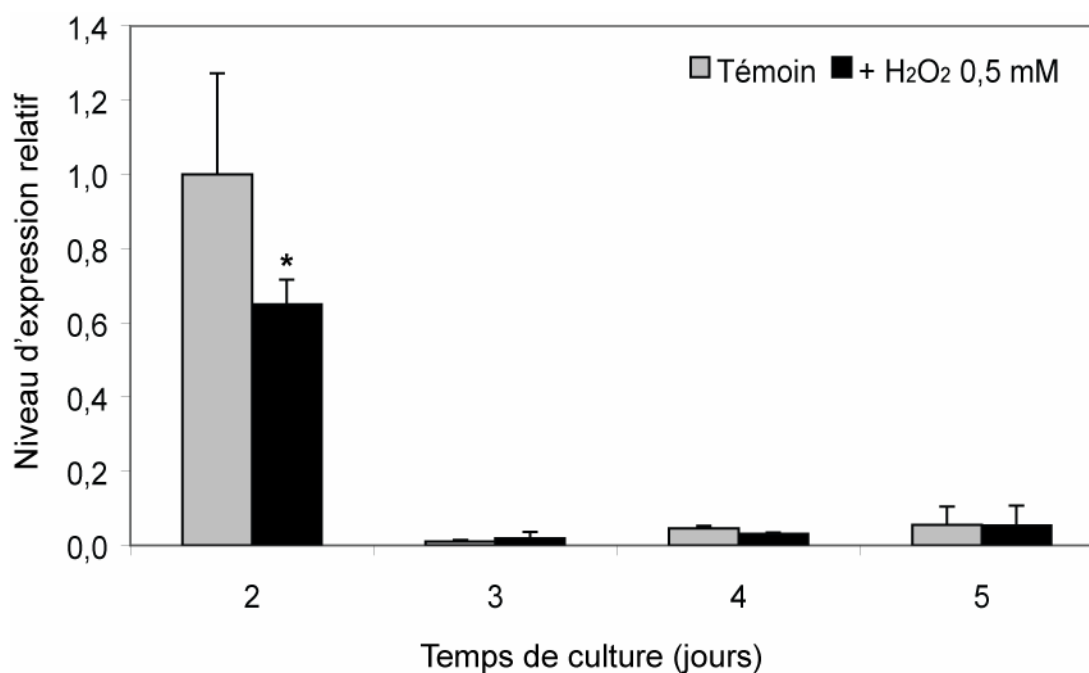
### **I.1. Gène constitutif et référence interne dans le cadre de stress oxydatifs : le gène $\beta$ -*tub* codant la $\beta$ -tubuline**

#### ***I.1.a. Cinétique d'expression du gène $\beta$ -*tub* au cours de la croissance de *F. graminearum* CBS185.32 en culture standard***

La cinétique d'expression de  $\beta$ -*tub* a été suivie du 2<sup>e</sup> au 5<sup>e</sup> jour de croissance dans nos cultures témoins et a été comparée à la cinétique d'accumulation de biomasse fongique (Figure 39).

Il apparaît que  $\beta$ -*tub* est fortement exprimé au 2<sup>e</sup> jour de culture. Ce niveau d'expression chute près de 100 fois au 3<sup>e</sup> jour puis remonte lentement (variations non significatives) jusqu'au 5<sup>e</sup> jour de culture. Ainsi, si  $\beta$ -*tub* est un gène constitutif il n'en reste pas moins que son expression n'est pas constante sur notre fenêtre de temps. L'utilisation de l'expression de ce gène comme référence interne pour chaque échantillon paraît donc délicate.

Lorsque la cinétique d'expression de  $\beta$ -*tub* est comparée à la cinétique d'accumulation de biomasse fongique, il apparaît qu'il n'y a pas de corrélation entre expression de  $\beta$ -*tub* et biomasse fongique. Pourtant, constituant des microtubules du cytosquelette des cellules, la  $\beta$ -tubuline est une protéine essentielle à la croissance fongique.



**Figure 40 : Effet de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM sur la cinétique d'expression du gène *β-tub* codant la *β*-tubuline au cours des 5 premiers jours de croissance de *F. graminearum* CBS185.32.**

Le facteur de normalisation est arbitrairement choisi comme étant le niveau d'expression de *β-tub* après 2 jours de culture témoin.

\* = différence d'expression statistiquement significative (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test<sup>®</sup>, logiciel REST<sup>®</sup>,  $p \leq 0,05$ , voir matériel et méthodes).

Une explication possible pourrait être que la  $\beta$ -tubuline n'est pas codée par un gène unique mais par deux gènes (au minimum) dont les cinétiques d'expressions pourraient être différentes et décalées dans le temps. Cette hypothèse semblerait étayée par l'existence possible d'au moins deux gènes codant la  $\beta$ -tubuline révélée par l'annotation du génome de *F. graminearum*<sup>38</sup>.

Une autre explication pourrait être qu'au cours de la culture en GYEP il y a accumulation d'inhibiteurs de RT et/ou de PCR qui ne sont pas présents (ou en quantité non effectives) dans les cultures âgées de 2 jours. La chute brutale de l'expression de  $\beta$ -*tub* après 3 jours de culture serait alors un artefact.

### ***1.1.b. Cinétique d'expression du gène $\beta$ -*tub* au cours de la croissance de *F. graminearum* CBS185.32 en cultures standards supplémentées en $H_2O_2$ au moment de l'inoculation***

La cinétique d'expression de  $\beta$ -*tub* a été suivie du 2<sup>e</sup> au 5<sup>e</sup> jour de croissance dans des cultures traitées avec  $H_2O_2$  0,5 mM (supplémentation en début de culture) et a été comparée avec la cinétique d'expression de  $\beta$ -*tub* en cultures témoin (Figure 40)<sup>39</sup>.

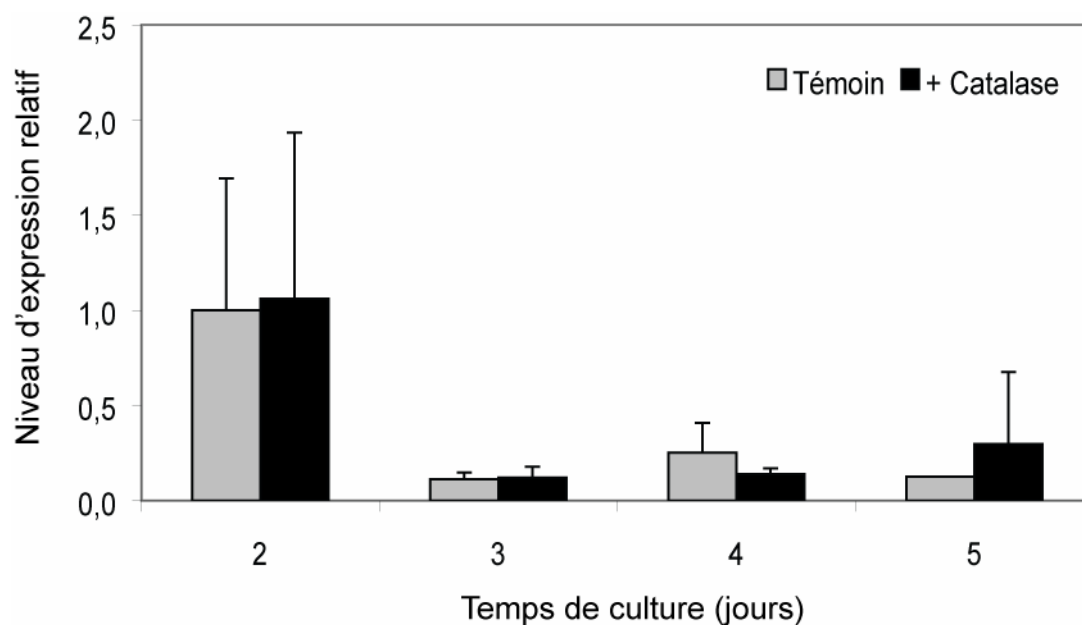
La cinétique d'expression de  $\beta$ -*tub* dans les cultures traitées avec  $H_2O_2$  est parallèle à notre cinétique témoin. Toutefois, au 2<sup>e</sup> jour de culture, l'expression de  $\beta$ -*tub* est significativement réduite en présence de  $H_2O_2$  0,5 mM. Les niveaux d'expression observés dans les cultures âgées de 3 à 5 jours ne sont en revanche pas différents de ceux observés dans les cultures témoin.

La mesure de l'accumulation de biomasse fongique est un indicateur de croissance parmi d'autres : elle ne reflète pas forcément l'état physiologique des cellules fongiques. Il semble que ce soit ici le cas : l'expression de  $\beta$ -*tub* est réduite tandis que l'accumulation de biomasse ne semble pas affectée. Ensuite, puisque l'expression de  $\beta$ -*tub* semble être modulée par le traitement par  $H_2O_2$ , son utilisation comme référence interne dans nos conditions est à rejeter.

---

<sup>38</sup> <http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/>, gène Fg06611

<sup>39</sup> La biomasse fongique n'a pas été représentée dans la mesure où notre traitement par  $H_2O_2$  n'affecte pas la cinétique d'accumulation de biomasse fongique (voir chapitre 2 de cette thèse).



**Figure 41 : Effet de catalase sur la cinétique d'expression du gène  $\beta$ -tub codant la  $\beta$ -tubuline au cours des 5 premiers jours de croissance de *F. graminearum* CBS185.32.**

Le facteur de normalisation est arbitrairement choisi comme étant le niveau d'expression de  $\beta$ -tub après 2 jours de culture témoin.



### ***I.1.c. Cinétique d'expression du gène $\beta$ -tub au cours de la croissance de *F. graminearum* CBS185.32 en cultures standard supplémentées en catalase au moment de l'inoculation***

Là encore, la cinétique d'expression de  $\beta$ -tub a été suivie du 2<sup>e</sup> au 5<sup>e</sup> jour de croissance dans des cultures supplémentées en catalase (supplémentation en début de culture) et a été comparée avec la cinétique d'expression de  $\beta$ -tub en cultures témoin (Figure 41)<sup>40</sup>.

La cinétique d'expression de  $\beta$ -tub dans les cultures supplémentées en catalase est identique à notre cinétique témoin. L'ajout de catalase dans les milieux de culture ne semble donc pas avoir d'effet sur l'expression de  $\beta$ -tub. La prudence dans l'utilisation de ce gène comme référence interne reste donc inhérente uniquement à son expression non constante. Il est notable que, dans cet essai, la diminution d'expression de  $\beta$ -tub entre le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> jour de culture est moins importante (bien que toujours significative) que dans notre essai précédent (variations biologiques).

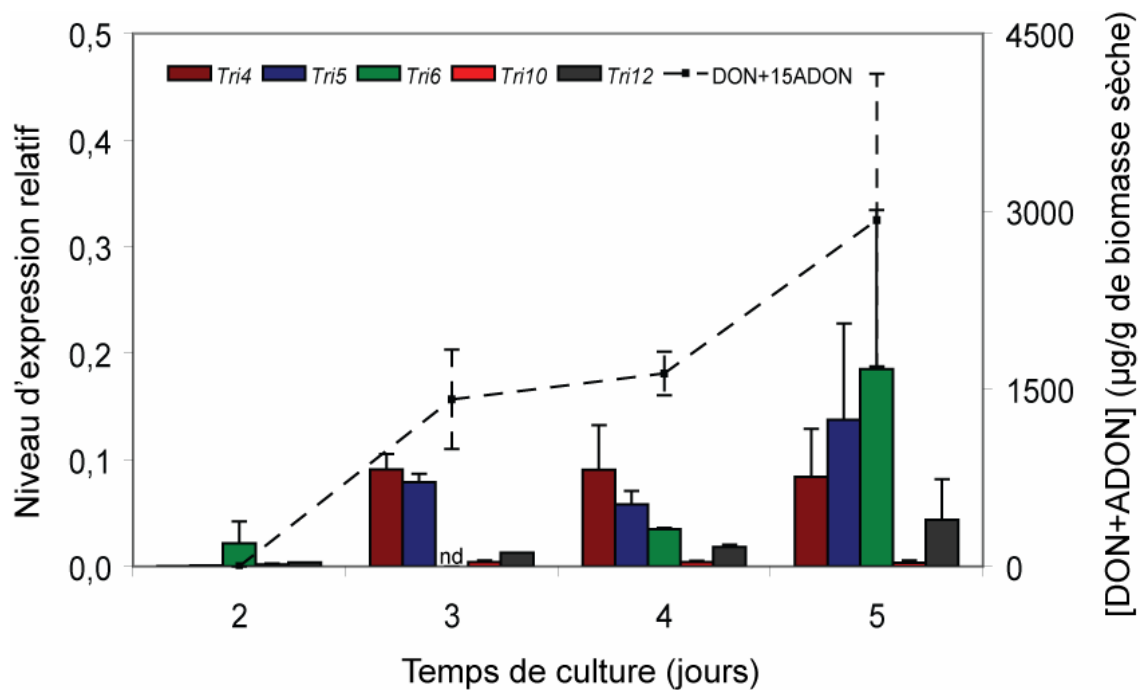
Pour nos essais, nous faisons le choix de normaliser nos résultats par rapport à la quantité d'ARN total utilisé dans les réactions de transcription inverse sans utiliser le gène  $\beta$ -tub comme référence interne.

### ***I.2. Cinétique d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Tri101* au cours de la biosynthèse de DON et de 15ADON par *F. graminearum* CBS185.32 en cultures standard***

Les gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* et *Tri12* sont tous les cinq groupés dans une région génomique commune, le cluster *Tri*, tandis que le gène *Tri101* est hors cluster (Introduction, figure 8). Cette organisation en cluster pourrait jouer un rôle dans leur

---

<sup>40</sup> La biomasse fongique n'a pas été représentée puisque la cinétique d'accumulation de biomasse fongique n'est pas modifiée dans ces conditions (voir chapitre 3).



**Figure 42 : Expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* et *Tri12* appartenant au cluster *Tri* au cours des 5 premiers jours de croissance de *F. graminearum* CBS185.32.**

Le facteur de normalisation est arbitrairement choisi comme étant le niveau d'expression de  $\beta$ -*tub* après 2 jours de culture.

nd = niveau d'expression de *Tri6* non déterminé après 3 jours de culture.

Les variations des niveaux d'expression de l'ensemble des gènes sont significatives entre le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> jour de culture. Entre le 3<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> jour, les variations observées ne sont pas significatives. Entre le 4<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour de culture, seule l'augmentation de l'expression de *Tri6* apparaît comme significative ( $p \leq 0,05$ ).

régulation (Hohn, *et al.*, 1993), mettant ainsi les mécanismes de régulation de *Tri101* à part puisque ce gène est localisé sur une région génomique différente.

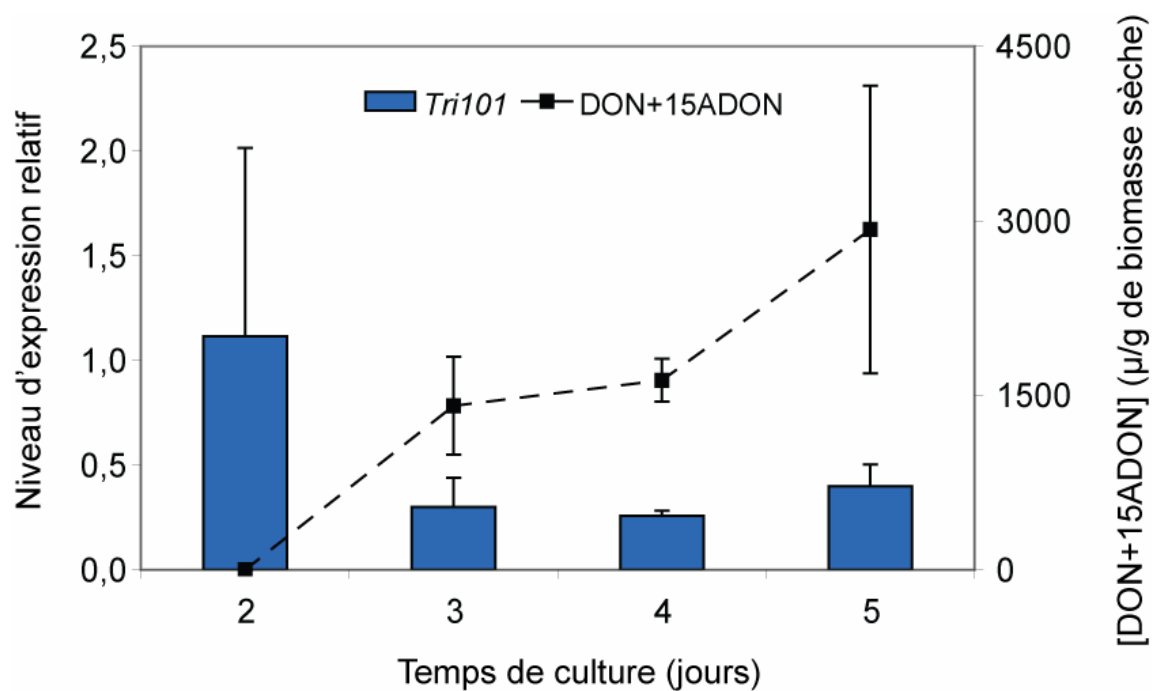
### ***I.2.a. Expression des gènes localisés dans le cluster Tri***

La figure 42 représente les cinétiques d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* et *Tri12* dans des cultures standard non traitées ; la cinétique d'accumulation de DON et de 15ADON dans ces mêmes cultures est également représentée. Une observation immédiate révèle qu'après 2 jours de culture, les gènes du cluster sont globalement moins exprimés que le gène  $\beta$ -tub.

Les gènes *Tri4* et *Tri5* ont des cinétiques d'expression parallèles : ils sont très faiblement exprimés après 2 jours de culture. Leur expression augmente brutalement en même temps que l'accumulation des toxines est initiée (3<sup>e</sup> jour de culture). Les expressions de *Tri4* et *Tri5* restent ensuite relativement stables. Ces observations suggèrent que l'activation de ces deux gènes impliqués dans les premières étapes de la voie de biosynthèse des trichothécènes (voir figure 19) est déterminante pour l'initiation de la production de DON/15ADON mais que ces gènes sont en revanche peu régulés dans la suite de la cinétique d'accumulation des toxines.

La cinétique d'expression de *Tri12* – TRI12 est un transporteur impliqué dans la sécrétion des TCT – est très différente. Après 2 jours de culture, *Tri12* est très faiblement exprimé. Son expression est ensuite progressivement et régulièrement croissante au cours du temps. Il pourrait être possible que l'expression de *Tri12* soit modulée au cours du temps en fonction des besoins, parallèlement à l'accumulation de toxines : plus les toxines s'accumulent, plus *Tri12* est exprimé.

*Tri6* et *Tri10* codent les facteurs régulateurs positifs de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des trichothécènes. Leurs cinétiques d'expression semblent très différentes. *Tri10* semble être faiblement exprimé mais de façon relativement stable au cours du temps. *Tri6* est quant à lui exprimé de façon



**Figure 43 : Expression du gène *Tri101* n'appartenant pas au cluster *Tri* au cours des 5 premiers jours de croissance de *F. graminearum* CBS185.32.**

Le facteur de normalisation est arbitrairement choisi comme étant le niveau d'expression de  $\beta$ -*tub* après 2 jours de culture.

La diminution du niveau d'expression de *Tri101* entre le 2<sup>e</sup> et le 3<sup>e</sup> jour de culture apparaît comme étant significative ( $p \leq 0,05$ ).

significative dès le 2<sup>e</sup> jour de culture, c'est-à-dire avant que l'expression des gènes *Tri4* et *Tri5* de même que l'accumulation de toxines ne soient détectables dans les milieux de culture. Cette expression semble ensuite rester stable au cours du temps avec une possible augmentation après le 5<sup>e</sup> jour de culture. Il est notable que de précédents résultats ont présenté *Tri10* comme un régulateur de *Tri6*, entre autres (Peplow, *et al.*, 2003). Nos résultats suggèrent que l'activation de la transcription de *Tri6* est temporellement antérieure à l'activation de *Tri10* ce qui semble indiquer que *Tri10* n'est pas le seul activateur de *Tri6*.

### ***1.2.b. Expression du gène *Tri101* localisé en-dehors du cluster *Tri****

La figure 43 représente la cinétique d'expression du gène *Tri101* parallèlement à la cinétique d'accumulation de DON et de 15ADON dans les mêmes cultures.

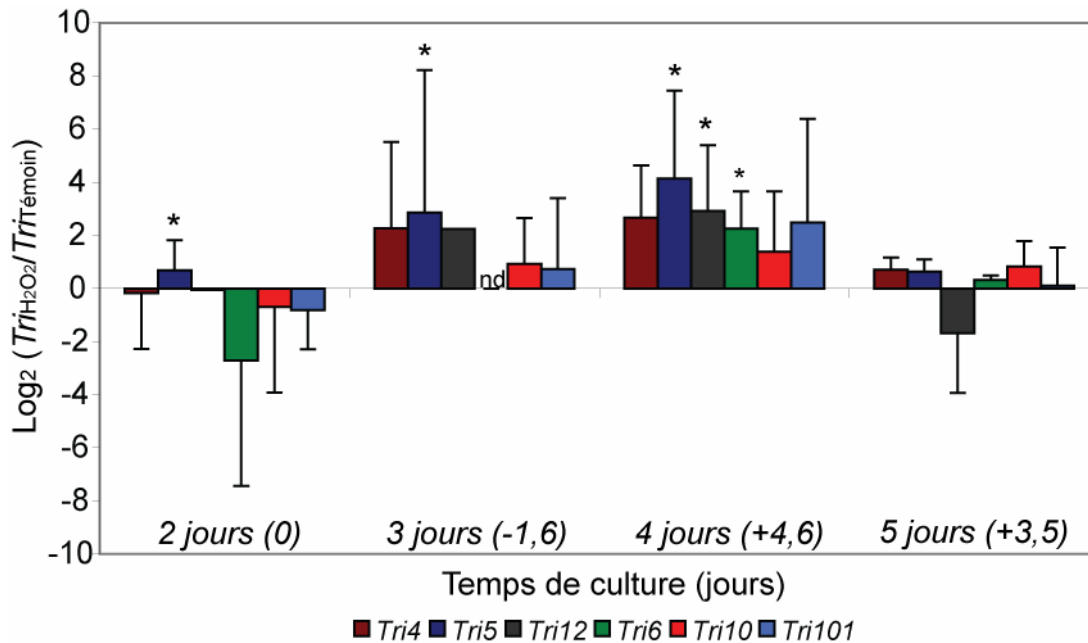
L'allure de la cinétique d'expression de *Tri101* est similaire à celle du gène  $\beta$ -*tub* (Figure 39). Dans nos conditions, même si, à l'instar des autres gènes *Tri* de notre étude, *Tri101* peut être une cible de TRI6 (possède un site de fixation de TRI6 dans la séquence du promoteur, figure 8)<sup>41</sup> il semble exprimé de façon aussi constitutive que  $\beta$ -*tub*.

Le fait que *Tri101* soit exprimé selon une cinétique différente de celles des autres gènes *Tri* du cluster est en accord avec l'hypothèse de Hohn *et al.* (1993) selon laquelle la proximité géographique des gènes du cluster est un facteur important dans leur régulation.

### ***1.2.c. synthèse***

---

<sup>41</sup> La fonctionnalité de ce site de fixation n'a pas été démontrée à ce jour.



**Figure 44 : Modulation des expressions des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Tri101* au cours des 5 premiers jours de croissance de *F. graminearum* CBS185.32 en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM.**

Les niveaux d'expression des gènes *Tri*, notés  $Tri_{Témoin}$  dans le cas des cultures témoins non traitées et  $Tri_{H_2O_2}$  dans le cas des cultures supplémentées en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sont normalisées par rapport à la quantité d'ARN total utilisée pour chacune des réactions de transcription inverse. L'expression des résultats par le logarithme en base 2 du ratio  $Tri_{H_2O_2} / Tri_{Témoin}$  permet de visualiser directement sur le graphique les effets du traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : un gène surexprimé en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est représenté par un histogramme positif de valeur égale au facteur de surexpression tandis qu'un gène réprimé en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est représenté par un histogramme négatif de valeur absolue égale au facteur de répression.

Les valeurs numériques indiquées entre parenthèses à la suite du temps de culture indiquent les sens et les intensités des variations des rendements en toxines dans les cultures traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport aux cultures témoins. « 0 » signifie que la présence de toxines n'a été détectée ni dans les cultures témoins ni dans les cultures traitées.

\* = différence d'expression statistiquement significative (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test<sup>®</sup>, logiciel REST<sup>®</sup>,  $p \leq 0,05$ ) ; nd = niveau d'expression de *Tri6* non déterminé après 3 jours de culture.

A notre connaissance, il n'a jamais été présenté de cinétiques d'expression du gène *β-tub* et des gènes *Tri* déterminées en utilisant la technique de RT-PCR en temps réel.

Nos résultats indiquent que, dans nos conditions de culture, l'expression de *β-tub* n'est pas constante dans le temps. L'utilisation de ce gène comme référence interne n'est donc pas appropriée.

Nos résultats semblent également indiquer que les gènes du cluster *Tri* sont faiblement exprimés tandis que *Tri101*, situé hors cluster, est plus fortement exprimé. Enfin, il semblerait que l'organisation en cluster de la majorité des gènes *Tri* peut jouer un rôle dans leurs régulations. Ainsi, les gènes *Tri* hors cluster pourraient être exprimés selon des cinétiques différentes.

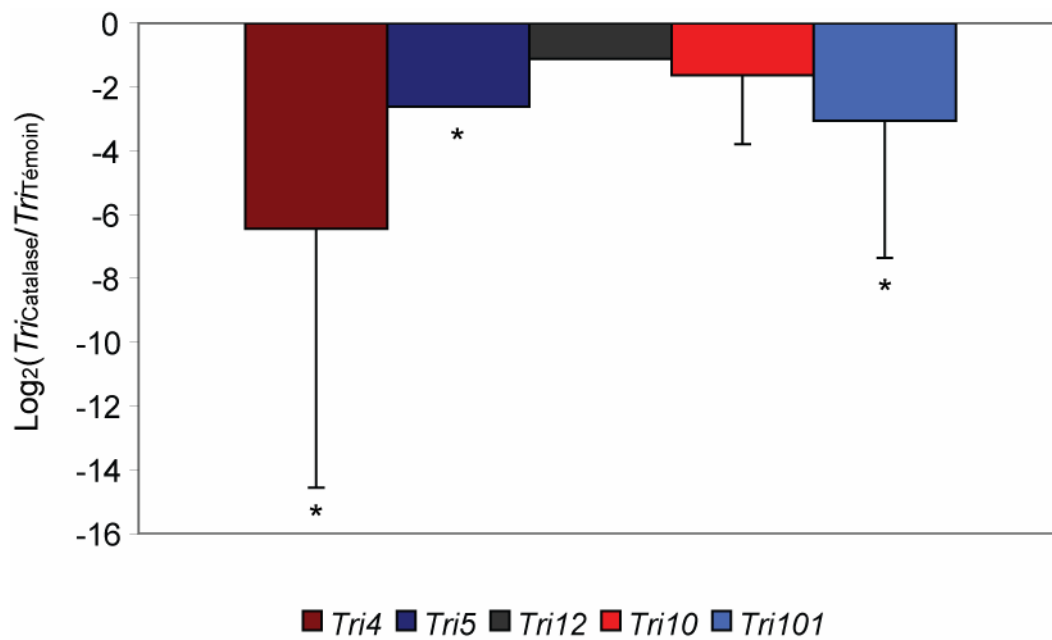
### **I.3. Modulation des niveaux d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Tri101* en conditions de stress oxydatifs**

#### ***I.3.a. Modulation des niveaux d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* et *Tri101* en cultures supplémentées par $H_2O_2$***

La production de DON et de 15ADON est globalement activée de façon durable en cultures GYEP en présence de stress oxydatif induit par  $H_2O_2$  (voir chapitre 2).

Dans cet essai, la production de toxines est détectée après 3 jours de culture à des niveaux similaires entre les cultures témoins et les cultures traitées. Après 4 jours de culture, la production de toxines semble plus de 4,6 fois activée en présence de  $H_2O_2$ , activation qui perdure après 5 jours de culture (3,5 fois) et 15 jours de culture (4,8 fois). Nous avons mis en parallèle les niveaux en toxines accumulées en présence de stress oxydatif et les variations des niveaux d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri12*, *Tri6*, *Tri10* et *Tri101*. Les résultats sont présentés sur la figure 44.

Il semble qu'au 2<sup>e</sup> jour de culture les niveaux d'expression des gènes étudiés soient globalement plus faibles en présence de  $H_2O_2$ , à l'exception de *Tri5* dont l'expression semble significativement activée. Aux 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> jours de culture, les niveaux



**Figure 45 : Modulation des expressions des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri10*, *Tri12* et *Tri101* après 3 jours de croissance de *F. graminearum* CBS185.32 en présence de catalase.**

Représentation graphique identique à celle utilisée en figure 44.

La production de toxines est réduite 13 fois dans les milieux supplémentés en catalase.

\* = différence d'expression statistiquement significative (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test<sup>©</sup>, logiciel REST<sup>©</sup>,  $p \leq 0,05$ ).



d'expression sont nettement activés en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après 5 jours de culture, la présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne semble pas avoir d'effet important sur les niveaux d'expression des gènes étudiés. Il semblerait que tout se passe comme si après une phase de latence au cours des deux premiers jours de culture avait lieu une augmentation transitoire des niveaux d'expression des gènes impliqués dans la production de toxines jusqu'au 4<sup>e</sup> jour de culture. Cette impulsion supplémentaire serait alors suffisante pour permettre des niveaux d'accumulation en toxines plus élevés après 15 jours de cultures traitées. Cependant, il semble que seules les activations des niveaux d'expression des gènes *Tri5*, *Tri12*, et *Tri6* soient significatives. Il convient donc de rester prudents dans l'interprétation de nos résultats.

### ***I.3.b. Modulation des niveaux d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri10*, *Tri12* et *Tri101* en cultures de 3 jours supplémentées en catalase***

La production de DON et de 15ADON est globalement inhibée de façon durable en cultures GYEP en présence de catalase (voir chapitre 3).

Dans cette expérience, après 3 jours de culture, les quantités accumulées en toxines dans les milieux supplémentés en catalase sont 13 fois inférieures à celles retrouvées dans les cultures non traitées. Les niveaux en toxines accumulées en présence de catalase et les variations des niveaux d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri12*, *Tri10* et *Tri101* ont été rapprochés. Les résultats sont présentés sur la figure 45.

Il apparaît clairement que l'ensemble des gènes testés est globalement réprimé dans les milieux supplémentés en catalase au moment de l'inoculation. Les diminutions des niveaux d'expression observées sont significatives dans le cas de *Tri4*, *Tri5* et *Tri101*.

### ***I.3.c. Synthèse***

D'une manière générale, nos essais ont mis en évidence que lors de stress oxydatifs l'augmentation de la production de toxines est associée à une augmentation de



la transcription des gènes *Tri*, et la diminution de la production de toxines est associée à une diminution de la transcription des gènes *Tri*. Les gènes *Tri4* et *Tri5*, impliqués dans les premières étapes de la voie de biosynthèse des trichothécènes, semblent répondre de façon précoce aux modifications du milieu de culture.

Dans le cas d'une activation de la production de toxines par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le gène *Tri6* (facteur de transcription positif) semble plus activement transcrit ce qui pourrait permettre une activation générale de la voie de biosynthèse et ainsi ne pas créer de « goulot d'étranglement » au niveau d'une des étapes de la chaîne de production. L'existence d'un facteur de transcription négatif a été suggérée chez *Fusarium sporotrichioides* avec la mise en évidence du gène *Tri15* localisé en-dehors du cluster *Tri* (Alexander, *et al.*, 2004). L'existence de ce gène à l'état fonctionnel et modulant la production de TCTB par *F. graminearum* n'a, à ce jour, pas été mise en évidence. Lorsque la production de toxines semble inhibée (en présence de catalase), le gène *Tri101* est négativement régulé selon un mécanisme non encore élucidé : *Tri15* et/ou un autre facteur de transcription pourrait être impliqué. La diminution de l'expression de *Tri101* soulève une autre question que nous avons évoquée dans le premier chapitre de cette thèse. Il semblerait que le substrat de TRI101, l'isotrichodermol, puisse s'accumuler dans les milieux de cultures sous certaines conditions non maîtrisées pour le moment. Nous avons analysé les profils chromatographiques des milieux supplémentés en catalase sans détecter la présence éventuelle d'isotrichodermol. Ces données semblent suggérer que les diminutions des niveaux d'expression de *Tri5* et *Tri4*, gènes situés en amont de *Tri101* dans la voie de biosynthèse des TCT, sont suffisantes pour éviter la saturation de TRI101 et l'accumulation d'isotrichodermol.

En dernière remarque, il semblerait que *Tri12* soit activé lorsque l'accumulation de toxines est activée mais il ne semble pas réprimé lorsque l'accumulation de toxines est réduite. Le schéma d'expression de *Tri12* semblerait être différent des autres gènes du cluster et de *Tri101* avec, dans nos conditions, l'absence de procédure d'inactivation ou alors une inactivation plus tardive.

### **I.4. Commentaires et recommandations méthodologiques**



La méthodologie utilisée pour la réalisation de ces expériences de RT-PCR en temps réel entraîne une charge expérimentale élevée. En effet, pour chaque replication biologique ont été réalisés : 2 extractions d'ARN totaux, 2 réactions de transcription inverse pour chaque extrait, 2 analyses de PCR en temps réel indépendantes pour chacun des lots d'ADNc avec 3 « runs » réalisés pour chaque échantillon d'ADNc. Au total, 24 « run » ont été réalisés pour chaque replication biologique, pour une étude d'un gène donné.

Il s'avère que les principales sources de variations sont les habituelles variations biologiques, mais également les variations attribuées aux réactions de PCR en temps réel elles-mêmes. Ainsi, il n'est pas indispensable de répéter plusieurs fois une extraction d'ARN pour un même échantillon, tout comme il n'apparaît pas indispensable de répéter la réaction de transcription inverse (dans nos conditions). En revanche, la répétition de l'analyse de PCR en temps réel reste nécessaire. Il est tout aussi nécessaire de réaliser 3 « runs » au minimum pour chaque échantillon au cours d'une même analyse de PCR en temps réel. Appliquer ces principes permet de limiter la charge expérimentale à 6 « runs » pour chaque replication biologique, pour une étude d'un gène donné.

## **II. Approche globale : microarrays (biopuces)**

Les biopuces à ADN utilisées pour cette étude ont été construites par David Sprott (Laboratoire de L. Harris, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON) en utilisant une banque privée de séquences d'EST<sup>42</sup> issues de *F. graminearum* (en collaboration avec T. Ouellet, ECORC, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON).

L'objectif de ces travaux était d'obtenir les profils d'expression différentielle des gènes de *F. graminearum* en conditions de stress oxydatif induites par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'ajout de catalase exogène.

Les équipes scientifiques d'accueil travaillent habituellement sur du matériel nucléaire d'origine végétale (blé ou maïs). Les protocoles d'extraction de l'ARN végétal sont établis et donnent des échantillons satisfaisants en termes de quantités et de

---

<sup>42</sup> Expressed Sequence Tag



qualité permettant la réalisation de biopuces de qualité. Il s'est avéré que le matériel nucléaire issu de nos cultures de *F. graminearum* est d'une nature plus délicate et impose de nouvelles contraintes expérimentales. Une phase d'adaptation du protocole à nos conditions a donc été nécessaire. Cette phase ayant été particulièrement coûteuse en temps, nos expériences n'ont pas encore permis d'obtenir de profil d'expression des gènes de *F. graminearum* en conditions de stress oxydatif. Ces essais sont toujours en cours, et il semblerait que certaines difficultés expérimentales aient été résolues permettant l'obtention de résultats utilisables dans un délai raisonnable. Nous allons ici discuter des difficultés expérimentales particulières rencontrées, des solutions proposées, et des perspectives de résultats que nous espérons obtenir prochainement.

### **II.1. Les étapes**

Une des premières contraintes à l'utilisation de biopuces à ADN est la nécessité de disposer de quantités en ARN importantes. Une puce hybridée représente généralement 10 µg d'ARN total par condition (échantillon traité et non traité)<sup>43</sup>. La qualité des ARN doit être suffisante pour ensuite réaliser une réaction de transcription inverse permettant l'obtention d'ADNc complets.

Les ADNc ainsi obtenus sont ensuite marqués par couplage avec un fluorophore (Cy3 et Cy5 sont les fluorophores les plus communément utilisés). L'efficacité du marquage est déterminante pour la qualité de la future image de la biopuce après hybridation. Un marquage de mauvaise qualité entraîne une diminution du rapport signal/bruit dont la conséquence immédiate est la difficulté d'interprétation des résultats. La valeur du rapport signal/bruit est également sous la dépendance d'une purification efficace des ADNc marqués. Cette purification a pour objectif l'élimination des excédents de fluorophore et également celle de nucléotides non incorporés lors de la réaction de transcription inverse. Les ADNc trop courts susceptibles d'interférer avec la réaction d'hybridation doivent également être éliminés par cette purification.

---

<sup>43</sup> Cette quantité est variable en fonction du protocole utilisé.





Les ADNc marqués et purifiés sont alors hybridés sur la biopuce qui est ensuite scannée. Le traitement statistique des données issues de l'image ainsi générée est l'étape finale critique d'exploitation des résultats. De nombreux logiciels capables de réaliser de telles analyses ont été développés. Nous ne nous attarderons pas sur cet aspect. Toutefois, il est important de signaler l'importance de la prudence à adopter lors de l'utilisation des outils statistiques à disposition eut égard à la puissance des sciences statistiques. Les conclusions qui découlent d'une expérience utilisant la technique des biopuces sont très largement dépendantes de la façon dont les outils statistiques de traitement des résultats sont maniés. Cet aspect est primordial dans la fiabilité des résultats.

### **II.2. Les difficultés**

La réussite entière de l'expérience dépend tout d'abord de la qualité des ARN utilisés. Les ARN doivent être abondants, non dégradés et avec un maximum de pureté. La présence excessive de contaminations est susceptible d'inhiber une des étapes de l'expérience, et en particulier l'étape de transcription inverse.

Pour nos essais, nous avons utilisé une méthode d'extraction sur coussin de césium apparemment satisfaisante en termes de quantité et de qualité des ARN obtenus. Lors de la première tentative de marquage réalisée en utilisant le protocole optimisé pour du matériel nucléique végétal, la fluorescence mesurée dans les échantillons, à l'issue du protocole de purification, n'était que résiduelle. Une hybridation n'était alors pas envisageable. Il s'est avéré que la réaction de RT puis le marquage n'étaient pas en cause eux-mêmes : nous avons mesuré les quantités en acide nucléique et les intensités des fluorescence dans les extraits obtenus après chacune des étapes de purification des ADNc marqués. Ces contrôles ont révélé que la quasi totalité du matériel nucléique marqué est perdue au cours des étapes de purification. Nous nous sommes donc intéressés à l'amélioration du protocole de purification des ADNc marqués.



## *Chapitre 4 : Transcriptome de F. graminearum et stress oxydatif*

---

La purification est réalisée par accrochage des ADNc marqués sur une membrane de silicate, rinçage, puis élution (voir matériel et méthodes). A ce jour, il s'agit de la méthode la plus répandue pour la purification des ADNc marqués avant hybridation de biopuces. L'accrochage des acides nucléiques sur la membrane dépend du pH et de la concentration en sels chaotropiques (pH acide variant de 4,5 à 6,5, et concentration en sels élevée pour l'accrochage sur la membrane). L'acidification était traditionnellement réalisée par l'ajout d'acide acétique concentré à l'échantillon. Nous avons remplacé cette étape par l'ajout de tampon acétate de sodium 100 mM pH 5,5. En plus de l'acidification de la solution, la concentration en sels a été augmentée. Les pertes en ADNc marquées ont été ainsi réduites de 5 à 10 % (selon les échantillons). Cependant, les quantités en matériel nucléaire marqué étaient encore trop faibles pour espérer obtenir une hybridation exploitable.

Nous avons alors remis en cause la qualité des extraits d'ARN conduisant à des ADNc de mauvaise qualité et donc difficilement utilisables. Ces ARN ont été testés par RT-PCR en temps réel en utilisant 5 µg d'ARN totaux pour réaliser la réaction de RT (conditions standard). Les résultats obtenus étaient satisfaisants. Nous avons émis l'hypothèse que, dans le cas des biopuces, l'utilisation de solutions d'ARN concentrées participe à la concentration de contaminations potentiellement présentes à la fin de l'extraction des ARN totaux. Ces contaminations pourraient alors être des inhibiteurs de la réaction de RT générant ainsi des quantités très (trop) élevées d'ADNc incomplets (au détriment des ADNc complets).

Cette hypothèse a été testée. Le gène *Tri5* a été amplifié avec les amorces Tox5-1 et Tox5-2 (la taille de l'amplifiat est de 560 bp voir matériel et méthodes) à partir d'ADNc préparés selon la méthode dédiée à la réalisation de biopuces. La présence d'ADNc incomplets dans les échantillons a ainsi été révélée (T. Ouellet, communication personnelle).

A moins de mettre au point une nouvelle méthode d'extraction des ARN ou de purifier les ARNm avant la réaction de RT (ce qui nous était impossible pour cause de



manque de temps et de matériel biologique) il semblait donc difficile d'obtenir des ADNc complets marqués à hybrider sur la biopuce.

La méthode de purification a donc été modifiée (réalisé par David Sprott) afin que les ADNc incomplets mais marqués ne soient pas éliminés (utilisation de colonnes de purification différentes, Ouellet T., 2005, communication personnelle). Les biopuces alors hybridées présentent un bruit de fond plus élevé que lorsqu'une purification plus stricte est appliquée. Cependant, il semble que les résultats soient satisfaisants et exploitables (Ouellet T., 2005, communication personnelle).

Ces expériences sont en cours de réalisation.

### **II.3. Synthèse**

Lors de la préparation d'échantillons d'ARN, la nature du tissu biologique est critique pour la qualité de l'extraction. Il semble que le mycélium de *Fusarium* en culture dans nos conditions standard soit une matrice particulièrement délicate à utiliser. Il n'est pas rare que les échantillons d'ARN soient contaminés par des inhibiteurs, notamment des inhibiteurs de la réaction de transcription inverse. En conditions classiques de retro-transcription (5 µg d'ARN par réaction), ces inhibiteurs sont suffisamment dilués pour ne pas interférer de façon significative avec la réaction. Dans le cas des biopuces, les transcriptions inverses sont réalisées sur 20 µg d'ARN total, soit 4 fois plus (quantité nécessaire pour un essai avec inversion des fluorophores). Il est possible que dans ces conditions, les efficacités des réactions de retro-transcription aient été diminuées.

Pour nos essais, il semble que l'utilisation d'ADNc incomplets permette d'obtenir des résultats exploitables à condition de consentir à un bruit de fond relativement élevé. Les expériences étant en cours, il nous est impossible de conclure. Notre objectif est d'aboutir à l'établissement de profils du transcriptome de *F. graminearum* en présence de stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de la biosynthèse de DON et de 15ADON.



### **III. Transcriptome de *F. graminearum* : Conclusion**

Nos expériences ont décrit, chez *F. graminearum*, les profils d'expression de  $\beta$ -*tub* et de plusieurs gènes *Tri* en cultures standards GYEP au cours de la biosynthèse de DON et de 15ADON. Ces profils ont été comparés à ceux obtenus lorsque les cultures ont été supplémentées avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de la catalase au moment de l'inoculation.

Lors d'un stress par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'accumulation de toxines est plus importante, et l'expression des gènes *Tri* est globalement activée : il semble que la voie de biosynthèse soit, dans ces conditions, activée dans son ensemble. Cette suggestion est renforcée par le fait que *Tri6*, régulateur positif de la quasi totalité des gènes *Tri*, est lui-même activé en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A l'opposé, lors de l'ajout de catalase exogène, la production de toxines est fortement diminuée, et il semble que les gènes *Tri* sont globalement réprimés. Il n'y a pas d'indice permettant de suspecter une inhibition globale de la voie dans la mesure où aucun facteur négatif de transcription impliqué dans la régulation de la production de TCTB par *F. graminearum* n'a été identifié. Un candidat, TRI15, a cependant été suggéré chez *F. sporotrichioides* (Alexander, *et al.*, 2004). L'étude du profil d'expression de *Tri15* dans nos conditions de stress par ajout de catalase pourrait permettre d'étudier l'implication éventuelle de TRI15 dans la répression de la voie de biosynthèse des TCT. De plus, il est possible que d'autres facteurs transcriptionnels négatifs existent sans qu'ils aient, pour le moment, été mis en évidence.

La compilation de l'ensemble de nos résultats nous permet de construire une hypothèse selon laquelle *Tri6*, dont l'expression est précoce et variable en intensité, est responsable de l'initiation de la biosynthèse de DON/ADON tandis que *Tri10*, exprimé de façon constante et à un faible niveau, intervient dans le maintien de la production de TCT. *Tri6* serait ici également responsable des activations transitoires de la voie de biosynthèse et des pics d'accumulation de toxines.

Nos résultats suggèrent également que *Tri6* et *Tri10* ne sont pas les seuls régulateurs positifs des autres gènes *Tri*. Ceci semble particulièrement vrai pour *Tri101*





dont le profil d'expression est très différent des autres gènes *Tri*<sup>44</sup> et possède une allure similaire au profil d'expression de  *$\beta$ -tub*. Cette donnée pourrait indiquer que *Tri101* n'est pas un gène spécifique de la voie de biosynthèse des TCT. Enfin, la régulation de l'expression des gènes *Tri* par des mécanismes autres que l'existence d'un facteur de transcription particulier n'est pas à exclure. Il est possible que ce soit le cas de *Tri12* (TRI12 est une protéine impliquée dans la sécrétion des trichothécènes) dont la transcription pourrait être activée lorsque les toxines s'accumulent dans le mycélium.

---

<sup>44</sup> Dans nos conditions, l'expression de *Tri101* est toutefois régulée dans le même sens que les autres gènes *Tri*



## *Discussion Générale et Perspectives*



## *Discussion Générale et Perspectives*

---

Les recherches effectuées au cours de ces trois années de thèse ont participé à l'accumulation de connaissances sur la voie de biosynthèse des TCTB par *Fusarium* et à la compréhension des modulations possibles causées par des composés naturels des plantes hôtes. Notre choix s'est porté sur les composés oxydants qui déclenchent la réponse hypersensible de défense de la plante en réponse aux attaques de pathogènes virulents. La voie de biosynthèse de TCTB impliquant de nombreuses oxydases, la modulation de la production de toxines par un stress oxydatif était fortement suspectée. De façon plus précise, nous nous sommes intéressés à la production du DON et de ADON par *F. graminearum*, contaminant majoritaire du maïs en Europe, avec l'hypothèse de travail que les modifications des paramètres oxydatifs des grains sont susceptibles d'interférer dans le métabolisme secondaire de *F. graminearum* et de moduler les niveaux de production en DON. Les interactions entre métabolisme oxydatif fongique et production de trichothécènes de type B ont été étudiées par des approches biochimiques et moléculaires.

Les avancées apportées par ces travaux peuvent être regroupées en trois volets : (I) progrès et perspectives autour des méthodes et procédures expérimentales, (II) des stress oxydatifs causés par des composés naturels des plantes modulent la production de TCTB, et (III) quelles sont les régulations mises en jeu lors de tels stress.

### **I. Méthodes et procédures expérimentales : progrès et perspectives**

Au préalable, toutes nos expériences ont nécessité certaines mises au point méthodologiques et notamment la mise en place d'une méthode de détection et de dosage des trichothécènes par HPLC-DAD. Au-delà des améliorations techniques et expérimentales attendues, de nouveaux éléments vers la compréhension des mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des trichothécènes ont été apportés.



## *Discussion Générale et Perspectives*

---

Au cours de nos premières expériences nous avons dû faire face à des difficultés techniques en termes de répétabilité et de reproductibilité des cultures de *Fusarium* en milieu liquide. La standardisation des procédures de mise en culture a permis de diminuer les variabilités entre les cultures. En particulier, l'accent a été mis sur la qualité de l'extrait de levure utilisé en milieu GYEP et sur l'harmonisation des échanges gazeux avec le milieu extérieur en utilisant des bouchons commerciaux pour fioles Erlenmeyer tout à fait identiques entre eux.

Malgré ces avancées, il n'est pas rare d'observer de façon ponctuelle et aléatoire des irrégularités voire des diminutions presque totales du niveau de production de toxines. A ce jour, la cause de ce phénomène reste indéterminée. De nombreuses hypothèses ont été avancées. Les repiquages successifs des souches pourraient provoquer des dégénérescences dont une des conséquences serait l'altération de la capacité à produire des toxines. Des essais réalisés au laboratoire sur *F. graminearum* (producteur de TCTB) et *F. proliferatum* (producteur de fumonisines) n'ont pas vérifié cette hypothèse. Ces souches ont été repiquées sur milieu PDA avec différentes fréquences et pendant une année complète. Dans le même temps, des mesures régulières de la capacité à produire des toxines en milieu GYEP ont été effectuées. Au cours de l'année de test, il a plusieurs fois été observé des diminutions brutales des niveaux de production de toxines, niveaux par ailleurs restaurés au cours de l'essai suivant sans aucun traitement particulier (Ducos, 2004, communication personnelle). Une autre hypothèse pourrait être apportée par les travaux de Beyer *et al.* (2005) dont les résultats montrent que le niveau de production de DON par *F. graminearum* est modulé par le taux d'humidité relative ambiant au moment de la germination des spores. Par extension, il n'est pas à exclure que des paramètres similaires intervenant au cours de la sporulation puissent également moduler les niveaux de production en toxines. Nous n'avons, pour l'instant, pas d'argument qui nous permette de valider ou infirmer cette hypothèse.

De façon parallèle, il a été développé au laboratoire un milieu synthétique (Boutigny A.L., 2004, communication personnelle) dont le principal avantage par rapport au milieu GYEP est de s'affranchir des différences de composition de l'extrait de levure. Boutigny (2004) a initialement testé ce milieu en conditions de cultures standard et en mini-culture pour la souche *F. culmorum* INRA 117 productrice de DON





## *Discussion Générale et Perspectives*

---

et de 3ADON : dans les deux conditions les productions en toxines sont élevées (ce qui n'est pas le cas en cultures standard en milieu GYEP). La procédure de mini-culture a été testée en milieu synthétique et en milieu GYEP pour notre souche modèle *F. graminearum* CBS185.32. Il n'y a pas de différence significative entre les niveaux de production obtenus dans les deux milieux (données non présentées). En revanche, les rendements de production de toxines dans ces mini-cultures est très supérieur, de l'ordre de 30 fois, à ce qui est classiquement obtenu en cultures standard GYEP.

Ceci semble indiquer que la méthode de culture utilisée est déterminante sur les niveaux de production de toxines. Quelques hypothèses ont été formulées pour expliquer de telles différences de production. Tout d'abord, il est probable que la qualité des échanges gazeux soit différente en mini-culture par rapport au mode de culture standard. La configuration des petites boîtes de Pétri, de même que le critère statique de la culture modifie considérablement les paramètres d'oxygénation. Une deuxième hypothèse est née de l'observation macroscopique du mycélium au cours de la culture. En mini-culture, les cellules fongiques forment très rapidement une couche de mycélium homogène et relativement dense à la surface du liquide. En culture standard, le mycélium est immergé et prend soit un aspect filamenteux soit un aspect levuriforme. Il est à suspecter que les cellules fongiques dans ces situations si différentes sont susceptibles de produire des toxines à des niveaux différents. De ces observations ressort un inconvénient majeur à la mini-culture. Le mycélium étant sous la forme d'un tapis cellulaire dense à la surface du liquide, les différentes cellules fongiques ne sont pas exactement dans les mêmes conditions, les unes étant plutôt à l'air libre, les autres plutôt immergées et au contact du milieu.

L'intérêt des mini-cultures réside dans la miniaturisation des essais. En revanche, l'absence d'agitation et l'aspect que prend le mycélium dans ces conditions nous a conduit à conserver le mode de culture standard. Le mode mini-culture a cependant dû être utilisé au cours de nos tests sur l'effet des hydroperoxydes en raison des faibles quantités de standard disponible.

Dans des conditions où la production en TCTB est fortement diminuée, l'utilisation d'une méthode de détection et de dosage des toxines par HPLC-DAD a



## Discussion Générale et Perspectives

---

permis la mise en évidence de composés qui s'accumulent dans les milieux de culture avec des intensités proportionnelles à la diminution de l'accumulation de toxines. Il semblerait qu'en fonction du chemotype de la souche mise en culture ces composés sont différents.

Des analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées sur des cultures de *F. graminearum* de chemotype DON dont la production de toxines était inférieure à ce qui est habituellement observé. Elles nous ont amenés à suspecter l'accumulation de trichodermol, de trichotriol et d'isotrichotriol.

L'isotrichodermol est le substrat de TRI101, une C3-O-acétyltransférase (McCormick, *et al.*, 1999). Nous nous sommes alors particulièrement intéressés à *Tri101*. *Tri101* est un gène situé hors du cluster *Tri* et qui possède des homologues fonctionnels chez d'autres *Fusarium*, y compris des *Fusarium* qui n'ont pas la capacité de produire des trichothécènes c'est-à-dire qui ne possèdent pas le cluster *Tri* dans leur génome (Tokai, *et al.*, 2005). Il semblerait alors possible que la protéine TRI101 ne soit pas uniquement impliquée dans la biosynthèse des trichothécènes mais aussi dans d'autres réactions. TRI101 remplace le groupement -OH en C3 par un acétyle, ce qui a pour conséquence de diminuer la toxicité de la molécule (Alexander, *et al.*, 1999). L'activité de TRI101 permettrait une protection du champignon contre ses propres toxines (Kimura, *et al.*, 1998).

Nos résultats ont indiqué que, en conditions standard, *Tri101* est fortement exprimé et de façon quasi constitutive. Une baisse de son niveau d'expression pourrait alors entraîner l'accumulation d'isotrichodermol et des composés en amont (voir figure 19). L'analyse des niveaux d'expression de *Tri101* en condition de production de toxines altérée pourrait nous permettre de vérifier cette hypothèse.

Nous avons recherché l'éventuelle présence de ces composés dans des milieux de cultures dans lesquelles la production de toxines est à un niveau habituel (comparaison des chromatogrammes). Il semble que ces composés soient toujours présents dans les milieux mais à des niveaux réduits (signal de faible intensité). L'accumulation de ces composés semble s'accroître avec le temps. Lorsque les essais sont réalisés en mini-culture GYEP (niveaux de production de toxines 30 fois supérieurs), la présence de ces composés n'est jamais détectée.



## *Discussion Générale et Perspectives*

---

Ces observations nous amènent à construire une hypothèse selon laquelle l'activité de TRI101 deviendrait limitante au fur et à mesure que les trichothécènes s'accumulent dans les milieux de culture. Les rendements élevés en toxines obtenus en mini-culture pourraient résulter d'une augmentation de la transcription de *Tri101* (ou de l'activité de TRI101). La voie de biosynthèse pourrait avoir atteint un maximum d'activation. Un argument en faveur de cette hypothèse pourrait être qu'en cultures standard supplémentées en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la production de DON/ADON semble activée tandis qu'en mini-culture supplémentée en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elle semble plutôt diminuée (chapitre 2).

Une suite à donner à ces expériences serait d'étudier les profils d'expression de *Tri101* dans nos différentes conditions de culture afin d'en comprendre les mécanismes de régulation. Son rôle détoxifiant en a fait un candidat idéal comme gène de résistance à *Fusarium* (infection, invasion...). Okubara, *et al.*, (2002) ont créé une variété de blé transgénique exprimant *Tri101* et leurs résultats semblent encourageants. Ces auteurs ont observé que l'expression de *Tri101* confère aux transformants une résistance partielle à la progression de *F. graminearum* producteur de DON. Cependant, rien n'apparaît quant à la résistance aux *Fusarium* producteurs de NIV. TRI101 intervient en amont du point à partir duquel les branches « NIV » et « DON » divergent (Figure 19). Il est alors particulièrement étonnant que le trichodermol, le trichotriol et l'isotrichotriol ne soient pas détectés lors de l'altération de la production de NIV et/ou de FX. Ce point reste à ce jour sans réponse et ne sera éclairci qu'avec la détermination des composés s'accumulant lors de diminutions inexplicables de NIV et/ou de FX.

L'ensemble de ces avancées méthodologiques ont été utilisées afin d'étudier les effets de stress oxydatifs sur la production de TCTB, axe central de notre problématique.

## **II. Stress oxydatifs et production de trichothécènes de type B**



## *Discussion Générale et Perspectives*

---

D'une manière générale, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agirait comme un activateur de la production de trichothécènes de type B. Cette conclusion est toutefois à moduler. En effet, les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dépendent largement de son mode d'introduction et de la souche considérés.

La production de DON/ADON par *F. graminearum* semble activée lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est introduit en début de culture ou de façon quotidienne. En revanche, lorsqu'il est ajouté aux cultures 2 ou 7 jours après inoculation, la production de toxines ne semble pas affectée. L'allure de la courbe d'accumulation de toxines semblerait même suggérer une inhibition.

Ces effets différents de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction du mode d'introduction pourraient s'expliquer par des disponibilités différentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lorsqu'il est ajouté dans la culture : lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est ajouté après 2 ou 7 jours de culture, il n'est pas impossible qu'il soit piégé ou dégradé dès son introduction. Les cultures GYEP de *F. graminearum* et *F. culmorum* sont, avec le temps, de plus en plus colorées avec des teintes tirant en quelques jours vers le marron foncé. La présence de pigments est le reflet de l'oxydation de composés phénoliques par, entre autres, des peroxydases qui vont consommer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dès son introduction. L'absence d'effet significatif de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de toxines lorsqu'il est introduit après 2 ou 7 jours de culture pourrait ainsi être expliqué, au moins partiellement.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer nos résultats reposerait sur la mise en place d'une réponse adaptative par le champignon. Cette adaptation se manifesterait alors, à terme, par une augmentation de la production de toxines et dépendrait de la phase de croissance dans laquelle se trouve *Fusarium* au moment de la première exposition au stress induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nos résultats, ayant mis en évidence un lien apparent entre un traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des spores avant la germination et une diminution de l'accumulation de toxines 40 jours plus tard, sembleraient soutenir cette hypothèse.

En étudiant les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de NIV et de FX par *F. culmorum*, nos résultats ont révélé une diminution de la production de toxine lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est introduit au moment de l'inoculation ou de façon quotidienne. En revanche, lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est introduit 7 jours après inoculation, l'allure de la cinétique d'accumulation de NIV/FX suggère une activation à plus long terme de la production de toxines. En d'autres termes, les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de NIV/FX par *F. culmorum* sont opposés à ceux observés sur la production de DON/ADON par *F. graminearum*. Les





## *Discussion Générale et Perspectives*

---

effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de trichothécènes seraient alors espèce, chemotype et/ou souche dépendants. Des indices pourraient être apportés par l'étude des variations des niveaux d'expression de *Tri7* et *Tri13* impliqués dans la biosynthèse de NIV et de FX mais qui n'interviennent pas dans la production de DON et de ADON (ils sont non fonctionnels chez les souches de chemotype DON ; Brown, *et al.*, 2001, Brown, *et al.*, 2002).

Une autre approche consiste à aborder la réponse au stress oxydatif induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sous un angle enzymologique en étudiant des activités enzymatiques de détoxification, c'est-à-dire des activités de type catalase, peroxydase, superoxyde dismutase *etc.* Nous nous sommes particulièrement intéressés aux activités CAT de *Fusarium spp. graminearum* et *culmorum*.

Deux isoformes de CAT, l'une de pHi 5,3 et l'autre de pHi 6,8, ont été détectées, quelle que soit l'espèce considérée. L'activité de l'isoforme à pHi 6,8 semble décliner avec le temps, ce qui est en accord avec une modification de la réponse adaptative selon la phase de croissance dans laquelle se trouve *Fusarium*. Ces résultats sont à rapprocher des travaux de Kawasaki, *et al.*, (1997) qui ont démontré, chez *Aspergillus*, l'existence de deux gènes codant des catalases intervenant dans la protection contre des stress induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours des différentes phases de croissance du champignon. Une isoforme supplémentaire de CAT de pHi 4,55 n'a été détectée que chez les souches de chemotype NIV, espèces *graminearum* et *culmorum* confondues. Cette observation pourrait être un début d'explication des différences observées entre les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de DON/ADON par *F. graminearum* et ceux sur la production de NIV/FX par *F. culmorum*. Les effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de TCTB dépendraient alors du chemotype de la souche considérée.

Nos travaux n'ont pas concerné la caractérisation des activités CAT et SOD lors de stress oxydatifs. Il s'agit néanmoins d'une piste à développer afin de permettre la compréhension de l'adaptation de *Fusarium* à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène. Michan, *et al.*, (2002), chez *Neurospora crassa*, ont mis en évidence que la CAT impliquée dans la réponse au stress induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est différente de celle impliquée dans la réponse au stress induit par le methyl viologen. Chez divers champignons filamenteux, dont *F. oxysporum*, Angelova *et al.* (2005) ont démontré que des activités SOD sont particulièrement



## *Discussion Générale et Perspectives*

---

impliquées dans la réponse au stress induit par le methyl viologen tandis qu'une augmentation des activités CAT est associée à des stress induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les mécanismes activés chez le champignon, en réponse à des stress oxydatifs, seraient spécifiques de la nature du stress. Le même phénomène est observé en terme de production de toxines en conditions de stress oxydatifs induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, du methyl viologen ou du diamide (introduction au moment de l'inoculation) : la production de DON/ADON est activée en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de diamide mais elle est inhibée en présence de methyl viologen. La modulation de la production de toxines par des stress oxydatifs semblerait dépendre de la nature du stress.

Dans le cadre d'interactions hôte/pathogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les autres ROS sont toxiques pour le pathogène (Figure 22). La capacité de *Fusarium* à détoxifier son milieu, résultante de son équipement enzymatique, pourrait faciliter l'attaque pathogène (Mayer, *et al.*, 2001). Les enzymes alors impliquées pourraient être considérées comme des facteurs d'agressivité (Hwang, *et al.*, 2002). Les trichothécènes sont également considérés comme des facteurs d'agressivité (Cossette & Miller, 1995, Proctor, *et al.*, 1995, Harris, *et al.*, 1999, Eudes, *et al.*, 2000), et nos résultats démontrent qu'en fonction du chemotype considéré les profils enzymatiques relatifs aux CAT sont différents. Il serait alors possible qu'il y ait un lien entre production de toxines et arsenal enzymatique de détoxification. Ce lien reste à explorer.

Considérons à présent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire. De précédents travaux ont permis la mise en évidence, chez *F. graminearum* de chemotype DON, d'une production fongique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dont la cinétique d'accumulation semble suivre celle des TCTB (Ponts, *et al.*, 2003). Les résultats présentés dans le chapitre 3 de cette thèse semblent indiquer qu'il existe un lien négatif entre production fongique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et production de toxines en particulier chez *F. graminearum* et *F. culmorum* de chemotype NIV. L'importance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique extracellulaire pour la production de toxines a par ailleurs été mise en évidence avec la diminution des rendements en DON/ADON en présence de CAT exogène. Les trichothécènes étant présentés comme des facteurs probables d'agressivité, il serait alors possible que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soit également un facteur d'agressivité. Chez *Mycoplasma*, lorsque la production en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est limitée, une baisse



## *Discussion Générale et Perspectives*

---

de l'agressivité du pathogène est observée (Vilei & Frey, 2001). De nombreuses activités enzymatiques sont susceptibles d'être responsables de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces dernières ne sont pas encore élucidées dans nos conditions expérimentales.

L'ensemble de ces résultats indique que des stress oxydatifs ont des effets importants sur la production de DON/15ADON par *F. graminearum*. Cependant, le lien entre paramètres oxydants et accumulation de toxines n'a pas été clairement établi. Nous avons choisi de compléter nos données en testant les effets d'acides phénoliques, composés naturels des grains de céréales et de maïs aux propriétés anti-oxydantes largement décrites, sur la production de toxines.

Nos résultats sembleraient indiquer que la production de DON/ADON par *F. graminearum* est activée par les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique (acides férulique, *p*-coumarique et caféique) tandis qu'elle est inhibée par les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque (acides syringique et *p*-hydroxybenzoïque).

Ces résultats semblent apparemment en contradiction avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui indiquent que les acides férulique, *p*-coumarique et caféique inhibent la biosynthèse de FB<sub>1</sub> par *F. verticillioides*, celle d'aflatoxines par *Aspergillus spp.*, et celle de 15ADON par *F. graminearum* (Chipley & Uraih, 1980, Beekrum, *et al.*, 2003, Bily, 2003). Cependant, la divergence des données n'est pas surprenante. Il est en effet établi que les effets des acides phénoliques sur le métabolisme des champignons dépend très largement des conditions de culture considérées (Maggon, *et al.*, 1977).

Dans nos conditions, les niveaux de production de DON/ADON par *F. graminearum* semblent fortement corrélés au potentiel anti-oxydant de l'acide phénolique ajouté dans le milieu ce qui est en accord avec les résultats de Miller et Blackwell (1986) qui ont indiqué que la biosynthèse de DON par *Fusarium* nécessite des conditions anti-oxydantes faibles.

Il serait faux de limiter les propriétés des acides phénoliques à leurs capacités anti-oxydantes. Ces acides sont notamment des inhibiteurs d'activités enzymatiques diverses de type oxydases (phénols oxydases, peroxydases, lipoxygénases, *etc.*) et hydrolases (estérases, chitinases *etc.*). Ces activités enzymatiques peuvent être



## Discussion Générale et Perspectives

---

modulées par les acides phénoliques via des effets sur leurs sécrétions ou une régulation de l'expression des gènes correspondants (Marin, *et al.*, 1998, Keshri & Magan, 2000, Reynoso, *et al.*, 2002, Paul, *et al.*, 2003). Par exemple, l'acide *p*-hydroxybenzoïque induit, chez *Aspergillus*, l'expression du gène *FaeB* qui code une feruloyl esterase, enzyme hydrolitique fongique qui catalyse la dégradation de pectine et de xylane. *In planta*, sous l'effet de FAEB, divers composés phénoliques estérifiés, dont l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique, sont libérés et sont susceptibles d'intervenir dans les interactions plante/pathogène (De Vries & Visser, 2001, De Vries, *et al.*, 2002, Bily, 2003).

Les capacités des acides phénoliques à moduler les activités enzymatiques peuvent être une piste de recherche quant aux mécanismes impliqués derrière les modulations de la biosynthèse de toxines. La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre, à terme, la sélection de variétés de plantes dont les compositions en acides phénoliques permettraient de limiter la production de toxines.

Dans le cadre des interactions plante/pathogène, nous nous sommes intéressés aux effets des hydroperoxydes de l'acide linoléique sur la production de toxines.

Malgré les limites expérimentales de nos travaux, le 13(S)-HPODE est apparu comme un activateur de la production de toxines tandis que le 9(S)-HPODE posséderait des effets inhibiteurs. Ces résultats sont à l'opposé des résultats de Burow *et al.* (1997) obtenus en étudiant les effets de 13(S)-HPODE et de 9(S)-HPODE sur la production d'aflatoxines par *Aspergillus*, ce qui n'est pas surprenant si l'on considère que la voie de biosynthèse des aflatoxines est extrêmement différente de la voie de biosynthèse des trichothécènes.

Chez le maïs, les LOX des feuilles sont majoritairement des 13-LOX tandis que celles des graines sont plutôt des 9-LOX (Veldink, *et al.*, 1972, Hamberg, 1991, Jensen, *et al.*, 1997). Les 9-LOX et l'acide 9(S)-HPODE seraient particulièrement importants dans les interactions plante/pathogène. Dans le pathosystème maïs/*Aspergillus*, la présence d'activité 9-LOX dans la plante serait associée à la sensibilité au pathogène





## *Discussion Générale et Perspectives*

---

(Wilson, *et al.*, 2001). Aucune donnée n'est disponible, à notre connaissance, en ce qui concerne le pathosystème maïs/*F. graminearum*.

Kim, *et al.*, (2003) ont mis en évidence chez le maïs, et de façon plus générale chez les plantes monocotylédones, une LOX dont la particularité est d'être bi-fonctionnelle. Son activité 13-LOX serait précoce et transitoire et permettrait d'initier le « burst » d'acide jasmonique intervenant dans les mécanismes de défense de la plante (figure 11). Son activité 9-LOX serait ensuite favorisée et permettrait un auto-entretien du système. Nos résultats pourraient suggérer que privilégier *in planta* une activité 9-LOX serait susceptible de limiter la production de toxines. Cependant, il conviendrait de considérer les effets des différents acteurs de l'ensemble du système comme par exemple les effets de l'acide jasmonique, de l'acide linoléique *etc.*

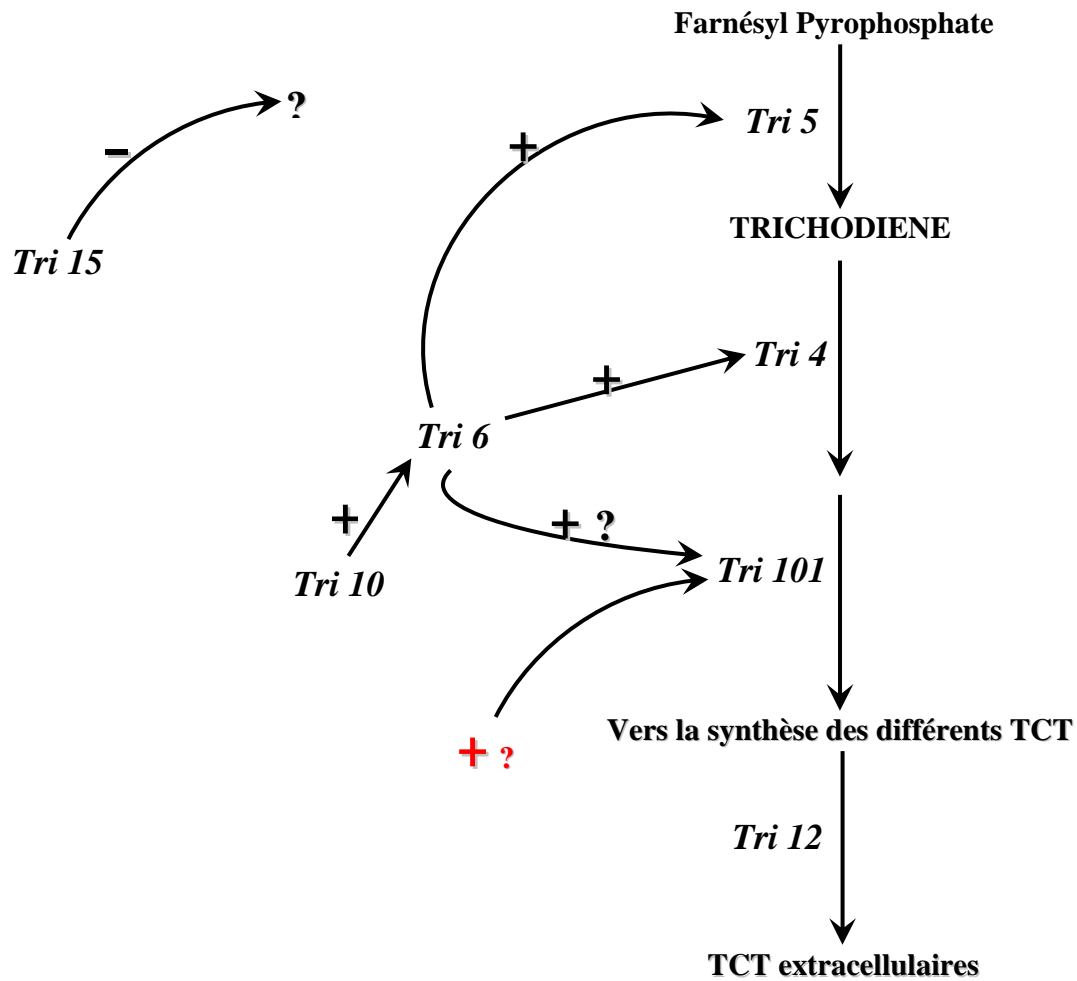
Au cours de nos différentes discussions, nous avons plusieurs fois soulevé l'hypothèse d'un mode de régulation transcriptionnel dans la modulation de la production de toxines, dans nos diverses conditions. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation de l'expression des gènes impliqués, directement ou indirectement, dans la voie de biosynthèse de trichothécènes.

### **III. Régulation transcriptionnelle et stress oxydatif**

La première approche, utilisant une technique de RT-PCR en temps réel, nous a permis de faire plusieurs observations marquantes.

La première est l'allure inattendue du profil d'expression de  $\beta$ -*tub*, qui code la  $\beta$ -tubuline.  $\beta$ -*tub* est un gène considéré comme constitutif, et pourtant il semble qu'il soit fortement exprimé au 2<sup>e</sup> jour de culture, expression qui chute de façon très importante dès le jour suivant, alors que le champignon est en pleine croissance.

Il conviendrait tout d'abord de vérifier que ce profil d'expression si surprenant n'est pas dû à la présence dans les extraits d'ARN totaux d'inhibiteur(s) de transcription inverse et/ou de PCR qui serai(en)t produits plus massivement après le 2<sup>e</sup> jour de culture



**Figure 46 : Représentation schématique simplifiée des facteurs de transcriptions impliqués dans les régulations des gènes *Tri*.**

## *Discussion Générale et Perspectives*

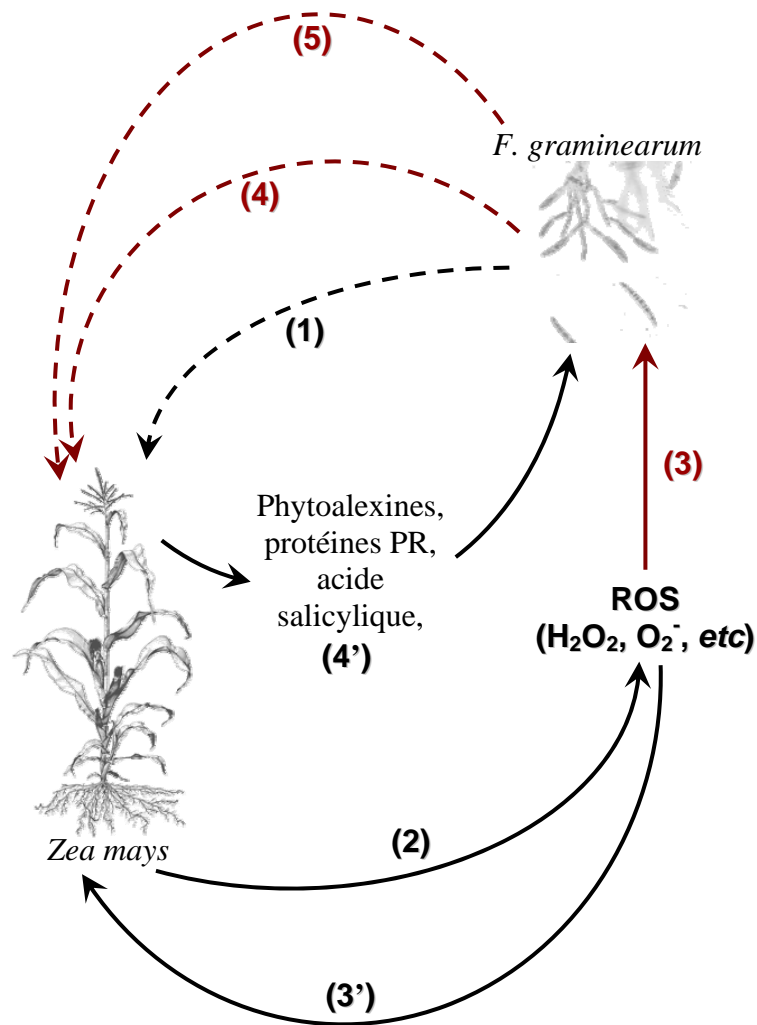
---

pour influencer les réactions. L'analyse des profils d'expression, dans nos conditions, d'autres gènes constitutifs, tels le gène codant l'actine ou le facteur de traduction EF1 $\alpha$ , pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. De la même façon, l'utilisation d'un ARNm externe en tant que contrôle interne de RT-PCR permettrait d'obtenir une réponse définitive quant à l'occurrence d'un artefact expérimental. Dans le cas où nos résultats ne seraient pas la conséquence d'une inhibition de la réaction de RT-PCR, il serait alors possible qu'il existe un autre gène codant une  $\beta$ -tubuline et qui s'exprimerait selon des schémas temporels différents. L'annotation du génome de *F. graminearum* récemment séquencé a permis de désigner un autre gène susceptible de coder la  $\beta$ -tubuline. L'étude de la séquence de ce gène semble indiquer que les amorces de PCR utilisées ne permettent pas d'allumer ce gène dans nos conditions. L'analyse du profil d'expression de ce gène pourrait alors permettre de vérifier ou d'infirmer notre hypothèse.

Nous nous sommes également intéressés aux profils d'expression des gènes *Tri101*, *Tri4*, *Tri5*, *Tri12*, *Tri6* et *Tri10*. La figure 46 représente de façon très simplifiée la voie de biosynthèse des TCT ainsi que les facteurs de transcriptions connus qui régulent cette voie.

Il semblerait que les gènes particulièrement activés en condition de stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont *Tri4*, *Tri5*, *Tri12* et *Tri6*, ce qui suggérerait une activation globale de la voie de biosynthèse des TCT. L'activation de *Tri6* sans que l'expression de *Tri10* soit modulée pourrait impliquer l'existence d'un autre mode de régulation de l'expression de *Tri6*. L'hypothèse d'une induction de *Tri10* qui passerait par une augmentation du nombre de molécules TRI10 actives est également envisageable. Par exemple, l'état de phosphorylation de TRI10 pourrait conditionner son activation. Ce mode de régulation est couramment observé pour des facteurs de transcription d'organismes fongiques (Wei, *et al.*, 2003, Hashikawa & Sakurai, 2004, Polish, *et al.*, 2005, Schafmeier, *et al.*, 2005).

En revanche, lorsque la production de toxines est diminuée par l'ajout de catalase exogène, l'expression du gène *Tri12* n'est pas modifiée mais celle de *Tri101* est réprimée. Les gènes *Tri4* et *Tri5* sont également réprimés (pas de donnée disponible en ce qui concerne *Tri6*). La diminution des niveaux d'expression des gènes *Tri4* et *Tri5*



**Figure 47 : Interactions plante-*Fusarium* lors de la mise en place de la réponse hypersensible.**

L'attaque par *Fusarium* (1) est spécifiquement reconnue par la plante. En réponse à cette attaque, un « burst oxydatif » est déclenché (2) avec notamment le relargage massif de  $H_2O_2$ . Cet  $H_2O_2$  peut être toxique pour le pathogène (3) mais aussi jouer le rôle de molécule signal pour la plante (3'). La réponse de la plante au signal  $H_2O_2$  est alors la mise en place de la réponse hypersensible (4') avec la production d'autres molécules dont les hydroperoxydes de l'acide linoléique.

Les flèches en rouges représentent les résultats apportés par nos travaux.

*Fusarium* perçoit le signal  $H_2O_2$  et les hydroperoxydes produits par la plante (mise en jeu d'activité enzymatiques, par exemple de type CAT) (3), et il y a alors réponse par *Fusarium* pouvant se traduire par la production de toxines qui pourraient alors être un facteur d'agressivité (4). Dans le même temps, une réponse induite chez *Fusarium* pourrait alors être la production de  $H_2O_2$  fongique pouvant accentuer la réponse de défense de la plante (5).

## Discussion Générale et Perspectives

---

mais pas *Tri12* semblerait indiquer l'existence d'un mécanisme de régulation différent pour *Tri12* bien que celui-ci soit situé dans le cluster. Nos résultats semblent suggérer que *Tri12* pourrait être activé (ou dé-réprimé) lorsque le substrat de TRI12 (les TCT) s'accumule à l'intérieur des cellules. Le gène *Tri15* a été décrit comme codant un facteur de transcription négatif régulant d'autres gènes *Tri* (Alexander, *et al.*, 2004). Il serait alors possible que ce gène soit impliqué dans une éventuelle répression de *Tri12* et que cette répression soit levée par l'accumulation intracellulaire des trichothécènes.

Une autre observation intéressante concerne l'expression de *Tri101*. En conditions standard, nous avons évoqué sa cinétique d'expression quasi constitutive très différente des cinétiques d'expression des autres gènes *Tri*, situés dans le cluster *Tri*. De plus, la présence d'homologues fonctionnels de *Tri101* a été déterminée chez des *Fusarium spp.* incapables de produire des trichothécènes. Une hypothèse possible pourrait être que les gènes *Tri* situés hors cluster ne sont pas spécifiques de la voie de biosynthèse des trichothécènes mais interviennent dans d'autres voies métaboliques de la cellule. Des approches transcriptomiques et/ou métabolomiques d'études de mutants  $\Delta$ Tri101 pourraient permettre de mettre en évidence l'implication de ce gène dans d'autres fonctions cellulaires. L'utilisation de biopuces pourrait alors être un outil performant pour de telles études.

Cette approche a été adoptée dans le cadre des régulations qui interviennent lors de stress induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou par l'ajout de catalase exogène. De ces expériences, nous espérons en retirer d'une part une vue globale des conséquences de ces stress, et d'autre part de nouvelles pistes de recherches vers la compréhension des effets des composés produits par la plante lorsque *Fusarium* la colonise. La réalisation de ces expériences est en cours et les résultats pourraient être accessibles dans un délai de 2 à 3 mois.

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de compléter la figure 22 qui devient la figure 47. Nos résultats ont montré que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> module spécifiquement la production de TCTB. L'équipement en enzymes anti-oxydantes de *Fusarium*, en particulier les activités CAT, semble alors déterminant dans la réponse au stress oxydatif. Des interactions importantes entre la production de toxines par *Fusarium* et les composés de la plante qui interviennent dans les mécanismes de défense ont été mises



## *Discussion Générale et Perspectives*

---

en évidence. Les composés phénoliques susceptibles d'être libérés de la paroi végétale par des enzymes hydrolytiques lors de l'invasion par *Fusarium* modulent la production de toxines avec des effets très liés à leurs potentiels anti-oxydants : la production de toxines est d'autant plus élevée que la capacité oxydante de l'acide phénolique considéré est importante. Les hydroperoxydes de l'acide linoléique modulent également la production de TCTB : le 13(S)-HPODE, précurseur de l'acide jasmonique impliqué dans la mise en place de la réaction de défense de la plante, semble activer la production de toxines tandis que le 9(S)-HPODE aurait des effets opposés. Ces observations ouvrent des perspectives de recherche nouvelles eut égard à la composition du système lipoxygénasique de la plante considérée. Des recherches complémentaires sont nécessaires. Il serait essentiel de préciser les effets des hydroperoxydes de l'acide linoléique sur un grand nombre de souche avec des chemotypes différents afin d'écarter des éventuels effets souches, espèce et/ou chemotype dépendants. *In planta*, il conviendrait de caractériser les systèmes lipoxygénasiques de différentes variétés exhibant divers degrés de sensibilité à la production de toxines.

Ces éléments pourraient conduire à l'identification, parmi les composés impliqués dans les interactions hôte/pahogène, de ceux qui seraient susceptibles de conférer à la plante une résistance à la production de toxines. La sélection et l'utilisation de variétés de plantes répondant à ces critères permettraient de garantir un risque mycotoxique limité.





## *Références Bibliographiques*



## Références Bibliographiques

---

- [1] Abid-Essefi, S, Baudrimont, I, Hassen, W, Ouanes, Z, Mobio, TA, Anane, R, Creppy, EE & Bacha, H (2003) DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology* 192: 237-248.
- [2] Abid-Essefi, S, Ouanes, Z, Hassen, W, Baudrimont, I, Creppy, E & Bacha, H (2004) Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology in Vitro* 18: 467-474.
- [3] Aebi, H (1947) *Methods in Enzymology*, Vol. 105 eds.), pp. 121-125. Academic Press, New York.
- [4] Alexander, NJ, Hohn, TM & McCormick, SP (1998) The TRI11 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 221-225.
- [5] Alexander, NJ, McCormick, SP & Hohn, TM (1999) TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular Genetics and Genomics* 261: 977-984.
- [6] Alexander, NJ, McCormick, SP & Ziegenhorn, SL (1999) Phytotoxicity of selected trichothecenes using *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system. *Natural Toxins* 7: 265-269.
- [7] Alexander, NJ, McCormick, SP, Larson, TM & Jurgenson, JE (2004) Expression of *Tri15* in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics* 45: 157-162.
- [8] Angelova, MB, Pashova, SB, Spasova, BK, Vassilev, SV & Slokoska, LS (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research* 109: 150-158.
- [9] Ansari, K, Egan, D & Doohan, F (2004) Genotype-dependant accumulation of *Triticum aestivum* transcripts in response to deoxynivalenol. *Proceedings of 2nd Symposium on Fusarium Head Blight*, Vol. 1, pp. 11. Orlando, (FL) USA.
- [10] Antolovich, M, Bedgood, DR, Bishop, AG, Jardine, D, Prenzler, PD & Robards, K (2004) LC-MS investigation of oxidation products of phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 962-971.
- [11] Asiegbu, FO (2000) Effects of carbohydrates, ethanol and selected cell wall phenolics on *in vitro* growth of necrotrophic fungi - *Heterobasidion annosum* and *Fusarium avenaceum*. *Journal of Basic Microbiology* 40: 139-148.
- [12] Atroshi, F, Rizzo, A, Biese, I, Vejjalainen, P, Saloniemi, H, Sankari, S & Andersson, K (1999) Fumonisin B-1-induced DNA damage in rat liver and spleen: Effects of pretreatment with coenzyme Q(10), L-carnitine, alpha-tocopherol and selenium. *Pharmacological Research* 40: 459-467.
- [13] Ayar-Kayali, H, Ozer, N & Tarhan, L (2002) Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 400: 265-272.
- [14] Bacon, CW, Yates, IE, Hinton, DM & Meredith, F (2001) Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives* 109: 325-332.



## Références Bibliographiques

---

- [15] Bakan, B (1998) Approche physiologique de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium*. Essais de validation de méthodes moléculaires permettant le suivi de souches de *Fusarium*. Thesis, Paris.
- [16] Bakan, B, Giraud-Delville, C, Pinson, L, Richard-Molard, D, Fournier, E & Brygoo, Y (2002) Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. Applied and Environmental Microbiology 68: 5472-5479.
- [17] Bakan, B, Bily, AC, Melcion, D, Cahagnier, B, Regnault-Roger, C, Philogene, BJ & 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.
- [18] Barbosa-Tessmann, IP, da Silva, DA, Peralta, RM & Kimmelmeier, C (2001) A new species of *Fusarium* producer of galactose oxidase. Journal of Basic Microbiology 41: 143-148.
- [19] Beauchamps, C & Fridovitch, I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.
- [20] Beekrum, S, Govinden, R, Padayachee, T & S.Odhav, B (2003) Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B1 Food Additives and Contaminants 20 490-493.
- [21] Bennet, GA & Richard, JL (1996) Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. Food Technology 235-238.
- [22] Berger, U, Oehme, M & Kuhn, F (1999) Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 4240-4245.
- [23] Bernarde, C (2005) Etude de la Régulation de la Biosynthèse des Trichothécènes de type B chez *Fusarium graminearum* : effet du pH. pp. 18. Université Victor Ségalen Bordeaux 2, Bordeaux.
- [24] Bernardo, AN, Guenzi, AC, Ayoubi, P & Bai, GH (2004) Expression of defense-related wheat genes during early wheat-*F. graminearum* interactions. Proceedings of 2nd Symposium on *Fusarium* Head Blight, Vol. 1, pp. 15. Orlando, (FL) USA.
- [25] Beyer, M, Verreet, JA & Ragab, WS (2005) Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. International Journal of Food Microbiology 98: 233-240.
- [26] Bily, A (2003) Rôle et importance des déhydrodimères d'acide férulique et autres phénylpropanoïdes dans les mécanismes de résistance de *Zea mays* L. à *Fusarium graminearum* Schwabe. Thesis, Pau.
- [27] Bily, AC, Reid, LM, Savard, ME, Reddy, R, Blackwell, BA, Campbell, CM, Krantis, A, Durst, T, Philogene, BJR, Arnason, JT & Regnault-Roger, C (2004) Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. Mycopathologia 157: 117-126.
- [28] Blackwell, B, Miller, J & Greenhalgh, R (1985) <sup>13</sup>C NMR study of the biosynthesis of toxins by *Fusarium graminearum*. Journal of Biological Chemistry 260: 4243-4247.



## Références Bibliographiques

---

- [29] Bolarinwa, A & Linseisen, J (2005) Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 823: 143-151.
- [30] Bradford, M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- [31] Branham, BE & Plattner, RD (1993) Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 124: 99-104.
- [32] Brown, DW, McCormick, SP, Alexander, NJ, Proctor, RH & Desjardins, AE (2001) A Genetic and Biochemical Approach to Study Trichothecene Diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 32: 133.
- [33] Brown, DW, McCormick, SP, Alexander, NJ, Proctor, RH & Desjardins, AE (2002) Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology* 36: 233.
- [34] Brown, DW, Proctor, RH, Dyer, RB & Plattner, RD (2003) Characterization of a *Fusarium* 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7936-7944.
- [35] Brown, DW, Dyer, RB, McCormick, SP, Kendra, DF & Plattner, RD (2004) Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genetics and Biology* 41: 454-462.
- [36] Bullerman, LB, Ryu, D & Jackson, LS (2002) Stability of fumonisins in food processing, Vol. 504, pp. 195-204. KLUWER ACADEMIC/PLENUM PUBL, New York.
- [37] Burow, GB, Nesbitt, TC, Dunlap, J & Keller, NP (1997) Seed lipoxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 380-387.
- [38] Burow, GB, Gardner, HW & Keller, NP (2000) A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization. *Plant Molecular Biology* 42: 689-701.
- [39] Butkeraitis, P, Oliveira, CAF, Ledoux, DR, Ogido, R, Albuquerque, R, Rosmaninho, JF & Rottinghaus, GE (2004) Effect of dietary fumonisin B1 on laying Japanese quail. *British Poultry Science* 45: 798-801.
- [40] Calvert, TW, Aidoo, KE, Candlish, AGG & Fuat, ARM (2005) Comparison of *in vitro* cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines. *Mycopathologia* 159: 413-419.
- [41] Calvo, AM, Hinze, LL, Gardner, HW & Keller, NP (1999) Sporogenic Effect of Polyunsaturated Fatty Acids on Development of *Aspergillus spp.* *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3668-3673.
- [42] Carratù, MR, Cassano, T, Coluccia, A, Borracci, P & Cuomo, V (2003) Antinutritional effects of fumonisin B<sub>1</sub> and pathophysiological consequences. *Toxicology Letters* 140-141: 459-463.





## Références Bibliographiques

---

- [43] CE (2005) Règlement (CE) N 856/2005 de la Commission du 6 juin 2005 modifiant le règlement (CE) n 466/2001 en ce qui concerne les toxines du *Fusarium*. Journal Officiel de l'Union Européenne Vol. L 143: 3-8.
- [44] Cetin, Y & Bullerman, LB (2005) Evaluation of reduced toxicity of zearalenone by extrusion processing as measured by the MTT cell proliferation assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 6558-6563.
- [45] Cetin, Y & Bullerman, LB (2005) Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. Food and Chemical Toxicology 43: 755-764.
- [46] Champeil, A, Doré, T & Fourbet, J (2004) *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. Plant Science 166: 1389-1415.
- [47] Chen, JH & Ho, CT (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 2374-2378.
- [48] Chipley, JR & Uraih, N (1980) Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. Applied and Environmental Microbiology 40: 352-357.
- [49] Chitarra, GS, Abee, T, Rombouts, FM, Posthumus, MA & Dijksterhuis, J (2004) Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. Applied and Environmental Microbiology 70: 2823-2829.
- [50] Chu, FS & Li, GY (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. Applied and Environmental Microbiology 60: 847-852.
- [51] Clare, DA, Duong, MN, Darr, D, Archibald, F & Fridovich, I (1984) Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. Analytical Biochemistry 140: 532-537.
- [52] Cossette, F & Miller, JD (1995) Phytotoxic effect of deoxynivalenol and *Gibberella* ear rot resistance of corn. Journal of Natural Toxins 3: 383-388.
- [53] Cotten, TK & Munkvold, GP (1998) Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. Phytopathology 88: 550-555.
- [54] Cromey, MG, Parkes, RA & Fraser, PM (2001) *Fusarium* levels in grain harvested from New Zealand wheat and barley crops in 2000. New Zealand Plant Protection 54: 193-197
- [55] D'Mello, JPF & MacDonald, AMC (1997) Mycotoxins. Animal Feed Science Technology 69: 155-166.
- [56] D'Mello, JPF, Placinta, CM & MacDonald, AMC (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. Animal Feed Science and Technology 80: 183-205.



## Références Bibliographiques

---

- [57] Dalcero, A, Torres, A, Etcheverry, M, Chulze, S & Varsavsky, E (1997) Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. Food Additives and Contaminants 14: 11-14.
- [58] Dall'Asta, C, Sforza, S, Galaverna, G, Dossena, A & Marchelli, R (2004) Simultaneous detection of type A and type B trichothecenes in cereals by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using NaCl as cationization agent. Journal of Chromatography A 1054: 389-395.
- [59] Dantigny, P, Guilmart, A & Bensoussan, M (2003) Predictive mycology: some definitions. Cryptogamie Mycologie 24: 377-383.
- [60] De Vries, RP & Visser, J (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Review 65: 497-522.
- [61] De Vries, RP, Van Kuyk, PA, Kester, HCM & Visser, J (2002) The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. Biochemical Journal 363: 377-386.
- [62] Desjardins, AE, Hohn, TM & McCormick, SP (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. Microbiological Review 57: 595-604.
- [63] Desjardins, AE, Brown, DW, Yun, SH, Plattner, RD, Lee, T & Turgeon, BG (2001) Using a *Gibberella zeae* Mat locus knockout to test the importance of ascospores in a wheat FHB field epidemics. Proceedings of 2nd Canadian Workshop on *Fusarium* head blight, pp. 93. Eastern Cereal and Oilseed Research Center, Ottawa (ON) CANADA.
- [64] Desjardins, AE, Jarosz, AM, Plattner, RD, Alexander, NJ, Brown, DW & Jurgenson, JE (2004) Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of *Fusarium graminearum* from smallholder farms in Nepal. Journal of Agricultural Food Chemistry 52: 6341-6346.
- [65] Diamond, M, Rocha, O, Doohan, F & McCabe, PF (2004) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol inhibits programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of 2nd Symposium on *Fusarium* Head Blight, Vol. 1, pp. 52. Orlando, (FL) USA.
- [66] Doohan, FM, Weston, G, Rezanoor, HN, Parry, DW & Nicholson, P (1999) Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species *in vitro* and *in planta*. Applied and Environmental Microbiology 65: 3850-3854.
- [67] Drochner, W & Lauber, U (2001) Occurrence of the three important *Fusarium*-toxins deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in grains in central Europe and effects in farm animals. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 10: 163-168.
- [68] Elad, Y (1992) The use of antioxydants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. Plant pathology 41: 417 - 426.
- [69] Eudes, F, Comeau, A, Rioux, S & Collin, J (2000) Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with *Fusarium* in wheat head blight. Canadian Journal of Plant Pathology 22: 286-292.
- [70] Feussner, I & Wasternack, C (2002) The lipoxygenase pathway. Annual Review of Plant Biology 53: 275-297.



## Références Bibliographiques

---

- [71] Flaherty, J, Pirttila, A, Bluhm, B & Woloshuk, C (2003) PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. Applied and Environmental Microbiology 69: 5222-5227.
- [72] Forster, A, Simon, K, Schmidt, R & Kaltner, D (2001) What is it about antioxidative characteristics of hops? Proceedings of the 28. EBC-Congress, Joh. Barth & Sohn, Budapest.
- [73] Friend, J (1977) Phenolic substances and plant disease., (Press, P.), pp. 557-588. New York, NY.
- [74] Gamanya, R & Sibanda, L (2001) Survey of *Fusarium moniliforme* (*F. verticillioides*) and production of fumonisin B<sub>1</sub> in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. International Journal of Food Microbiology 71: 145-149.
- [75] Gelderblom, WCA, Marasas, WFO, Vleggaar, R, Thiel, PG & Cawood, ME (1992) Fumonisin - Isolation, Chemical Characterization and Biological Effects. Mycopathologia 117: 11-16.
- [76] Gelderblom, WCA, Semple, E, Marasas, WFO & Farber, E (1992) The Cancer-Initiating Potential of the Fumonisin-B Mycotoxins. Carcinogenesis 13: 433-437.
- [77] Gelderblom, WCA, Abel, S, Smuts, CM, Marnewick, J, Marasas, WFO, Lemmer, ER & Ramljak, D (2001) Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: Mechanisms related to cancer initiation and promotion. Environmental Health Perspectives 109: 291-300.
- [78] Gelderblom, WCA, Galendo, D, Abel, S, Swanevelder, S, Marasas, WFO & Wild, CP (2001) Cancer initiation by fumonisin B-1 in rat liver - role of cell proliferation. Cancer Letters 169: 127-137.
- [79] Gil-Ad, NL & Mayer, AM (1999) Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Letters 176: 455-461.
- [80] Gobel, C, Feussner, I & Rosahl, S (2003) Lipid Peroxidation during the Hypersensitive Response in Potato in the Absence of 9-Lipoxygenases. Journal of Biological Chemistry 278: 52834-52840.
- [81] Gomez-Vasquez, R, Day, R, Buschmann, H, Randles, S, Beeching, JR & Cooper, RM (2004) Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and Peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. Annals of Botany 94: 87-97.
- [82] Gonzalez, P, Barroso, G & Labarere, J (1999) Molecular gene organisation and secondary structure of the mitochondrial large subunit ribosomal RNA from the cultivated Basidiomycota *Agrocybe aegerita*: a 13 kb gene possessing six unusual nucleotide extension and eight introns. Nucleic Acids Research 27: 1754 - 1761.
- [83] Govrin, EM & Levine, A (2002) Infection of *Arabidopsis* with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). Plant Molecular Biology 48: 267-276.
- [84] Goyarts, T, Danicke, S, Rothkotter, HJ, Spilke, J, Tiemann, U & Schollenberger, M (2005) On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for *ad libitum* consumption or fed restrictively. Journal of Veterinary Medicine. Series A 52: 305-314.



## Références Bibliographiques

---

- [85] Greenhalgh, R, Neish, GA & Miller, JD (1983) Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 625-629.
- [86] Guiraud, P, Steiman, R, Seiglemurandi, F & Benoitguyod, JL (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.
- [87] Hacking, A (1983) Oestrogenic metabolites of Fusaria. *Veterinary Research Communications* 7: 161-164.
- [88] Hamberg, M (1991) Transformations of alpha-linolenic acid in leaves of corn (*Zea mays L.*). *Advances in Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Research* 21A: 117-124.
- [89] Hard, GC, Howard, PC, Kovatch, RM & Bucci, TJ (2001) Rat kidney pathology induced by chronic exposure to fumonisin B<sub>1</sub> includes rare variants of renal tubule tumor. *Toxicologic Pathology* 29: 379-386.
- [90] Harris, LJ, Desjardins, AE, Plattner, RD, Nicholson, P, Butler, G, Young, JC, Weston, G, Proctor, RH & Hohn, TM (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* 83: 954-960.
- [91] Hashikawa, N & Sakurai, H (2004) Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element. *Molecular and Cellular Biology* 24: 3648-3659.
- [92] Hastings, DJ & Stenroos, LE (1995) Determination of Deoxynivalenol in Barley, Malt and Beer by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 53: 78-81.
- [93] Hazel, CM & Patel, S (2004) Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* 153: 51-59.
- [94] Henry, MH & Wyatt, RD (2001) The toxicity of fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub>, individually and in combination, in chicken embryos. *Poultry Science* 80: 401-407.
- [95] Higa, A, Kimura, M, Mimori, K, *et al.* (2003) Expression in cereal plants of genes that inactivate *Fusarium* mycotoxins. *Biosciences Biotechnology Biochemistry* 67: 914-918.
- [96] Hohn, TM, Desjardins, AE & McCormick, SP (1993) Analysis of *Tox5* Gene-Expression in *Gibberella pulicaris* Strains with Different Trichothecene Production Phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2359-2363.
- [97] Hohn, TM, McCormick, SP & Desjardins, AE (1993) Evidence for a Gene-Cluster Involving Trichothecene-Pathway Biosynthetic Genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics* 24: 291-295.
- [98] Hohn, TM, Desjardins, AE & McCormick, SP (1995) The *Tri4* Gene of *Fusarium sporotrichioides* Encodes a Cytochrome-P450 Monooxygenase Involved in Trichothecene Biosynthesis. *Molecular & General Genetics* 248: 95-102.





## Références Bibliographiques

---

- [99] Hohn, TM, Krishna, R & Proctor, RH (1999) Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology* 26: 224-235.
- [100] Hu, X, Bidney, DL, Yalpani, N, Duvick, JP, Crasta, O, Folkerts, O & Lu, GH (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* 133: 170-181.
- [101] Hua, SST, Grosjean, OK & Baker, JL (1999) Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology* 29: 289-291.
- [102] Hwang, CS, Rhie, GE, Oh, JH, Huh, WK, Yim, HS & Kang, SO (2002) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* 148: 3705-3713.
- [103] Ioos, R, Belhadj, A & Menez, M (2004) Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia* 158: 351-362.
- [104] Itoh, A, Schillmiller, AL, McCaig, BC & Howe, GA (2002) Identification of a Jasmonate-regulated Allene Oxide Synthase That Metabolizes 9-Hydroperoxides of Linoleic and Linolenic Acids. *Journal of Biological Chemistry* 277: 46051-46058.
- [105] Jacks, TJ & Davidonis, GH (1979) Superoxide, hydrogen peroxide, and the respiratory burst of fungally infected plant cells. *Molecular and Cellular Biochemistry (Historical Archive)* 158: 77-79.
- [106] Jandera, P, Skerikova, V, Rehova, L, Hajek, T, Baldrianova, L, Skopova, G, Kellner, V & Horna, A (2005) RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector. *Journal of Separation Science* 28: 1005-1022.
- [107] Jensen, AB, Poca, E, Rigaud, M, Freyssinet, G & Pages, M (1997) Molecular characterization of L2 lipoxygenase from maize embryos. *Plant Molecular Biology* 33: 605-614.
- [108] Joffe, AZ (1978) *Fusarium* toxicosis in poultry, eds. Marcel Dekker., New York USA.
- [109] Joffe, AZ (1983) Environmental conditions conducive to *Fusarium* toxin formation causing serious outbreaks in animals and man. *Veterinary Research Communications* 7: 187-193.
- [110] Josephs, R, Schuhmacher, R & Krska, R (2001) International interlaboratory study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities. *Food Additives and Contaminants* 18: 417-430.
- [111] Josephs, RD, Krska, R, Grasserbauer, M & Broekaert, JA (1998) Determination of trichothecene mycotoxins in wheat by use of supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection or gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography A* 795: 297-304.
- [112] Kachroo, A, He, Z, Patkar, R, Zhu, Q, Zhong, J, Li, D, Ronald, P, Lamb, C & Chattoo, BB (2003) Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Transgenic Rice Leads to Cell Death and Enhanced Resistance to Both Bacterial and Fungal Pathogens. *Transgenic Research* 12: 577-586.



## Références Bibliographiques

---

- [113] Katz, E, De Lacey, AL & Fernandez, VM (1993) Covalent binding of viologen to electrode surfaces coated with poly(acrylic acid) formed by electropolymerization of acrylate ions. 2. Effect of the ionization state of the polymeric coating on the formal potential of viologen. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 358: 261-272.
- [114] Kawasaki, L, Wysong, D, Diamond, R & Aguirre, J (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *Journal of Bacteriology* 179: 3284-3292.
- [115] Keshri, G & Magan, N (2000) Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium spp.* using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* 89: 825-833.
- [116] Kim, DO & Lee, CY (2004) Comprehensive study an vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 253-273.
- [117] Kim, ES, Choi, E, Kim, YC, Cho, K, Lee, A, Shim, JH, Rakwal, R, Agrawal, GK & Han, O (2003) Dual positional specificity and expression of non-traditional lipoxygenase induced by wounding and methyl jasmonate in maize seedlings. *Plant Molecular Biology* 52: 1203-1213.
- [118] Kim, HS, Lee, T, Dawlatana, M, Yun, SH & Lee, YW (2003) Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol- and nivalenol-producing *Fusarium graminearum* isolates. *Mycological Research* 107: 190-197.
- [119] Kimura, M, Kaneko, I, Komiyama, M, Takatsuki, A, Koshino, H, Yoneyama, K & Yamaguchi, I (1998) Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins - Cloning and characterization of *Tri101*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 1654-1661.
- [120] Kimura, M, Shingu, Y, Yoneyama, K & Yamaguchi, I (1998) Features of *Tri101*, the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene, related to the self-defense mechanism in *Fusarium graminearum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62: 1033-1036.
- [121] Kimura, M, Tokai, T, O'Donnell, K, Ward, TJ, Fujimura, M, Hamamoto, H, Shibata, T & Yamaguchi, I (2003) The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters* 539: 105-110.
- [122] Klötzel, M, Schmidt, S & Lauber, U (2005) Comparison of different clean-up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal-based food and validation of a reliable HPLC method. *Chromatographia* 62: 41-48.
- [123] Kolomiets, MV, Chen, H, Gladon, RJ, Braun, EJ & Hannapel, DJ (2000) A Leaf Lipoxygenase of Potato Induced Specifically by Pathogen Infection. *Plant Physiology* 124: 1121-1130.
- [124] Kono, Y, Yamamoto, H, Takeuchi, M & Komada, H (1995) Alterations in superoxide dismutase and catalase in *Fusarium oxysporum* during starvation-induced differentiation. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1268: 35-40.



## *Références Bibliographiques*

---

- [125] Kristensen, R, Torp, M, Kosiak, B & Holst-Jensen, A (2005) Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research* 109: 173-186.
- [126] Kuhlman, EG (1982) Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section Liseola. *Mycologia* 74: 759-768.
- [127] Kwon, SI & Anderson, AJ (2001) Differential production of superoxide dismutase and catalase isozymes during infection of wheat by a *Fusarium proliferatum*-like fungal isolate. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 73-81.
- [128] Lauren, DR & Smith, WA (2001) Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Additives and Contaminants* 18: 1011-1016.
- [129] Le Bail, M, Verger, P, Dore, T, Fourbet, JF, Champeil, A, Ioos, R & Leblanc, JC (2005) Simulation of consumer exposure to deoxynivalenol according to wheat crop management and grain segregation: Case studies and methodological considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 42: 253-259.
- [130] Lee, JS, Hah, YC & Roe, JH (1993) The Induction of Oxidative Enzymes in *Streptomyces coelicolor* Upon Hydrogen Peroxide Treatment. *Journal of General Microbiology* 139: 1013-1018.
- [131] Leffers, H, Naesby, M, Vendelbo, B, Skakkebaek, NE & Jorgensen, M (2001) Oestrogenic potencies of Zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Human Reproduction* 16: 1037-1045.
- [132] Lemmens, M, Scholz, U, Berthiller, F, Koutnik, A, Dall'Asta, C, Schuhmacher, R, Adam, G, Mesterházy, A, Krska, R, Buerstmayr, H & Ruckebauer, P (2004) The role of resistance to deoxynivalenol in the complex *Fusarium* head blight resistance complex in wheat. *Proceedings of 2nd Symposium on Fusarium Head Blight*, Vol. 1, pp. 88. Orlando, (FL) USA.
- [133] Leoncini, G & Maresca, M (1983) The effect of diamide and glutathione on the uptake of glucose by human erythrocytes. *Italian Journal of Biochemistry* 32: 102-110.
- [134] Leslie, JF (1991) Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section Liseola). *Phytopathology* 81: 1058-1060.
- [135] Leslie, JF (1995) *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany* 73: 282-291.
- [136] Levine, A, Tenhaken, R, Dixon, R & Lamb, C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- [137] Li, HP, Wu, AB, Zhao, CS, Scholten, O, Loffler, H & Liao, YC (2005) Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters* 243: 505-511.
- [138] Llorens, A, Mateo, R, Hinojo, MJ, Logrieco, A & Jimenez, M (2004) Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium spp.* *Systematic and Applied Microbiology* 27: 253-260.



## Références Bibliographiques

---

- [139] Llorens, A, Mateo, R, Hinojo, MJ, Valle-Algarra, FM & Jimenez, M (2004) Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium spp.* from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology* 94: 43-54.
- [140] Lori, GA, Sisterna, MN, Haidukowski, M & Rizzo, I (2003) *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research* 158: 29-35.
- [141] Maggon, KK, Gupta, SK & Venkitasubramanian, TA (1977) Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriological Reviews* 41: 822-855.
- [142] Marasas, WFO (2001) Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. *Environmental Health Perspectives* 109: 239-243.
- [143] Marasas, WFO, Riley, RT, Hendricks, KA, *et al.* (2004) Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *Journal of Nutrition* 134: 711-716.
- [144] Marin, S, Sanchis, V, Rull, F, Ramos, AJ & Magan, N (1998) Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *Journal of Food Protection* 61: 1489-1496.
- [145] Markell, SG & Francl, LJ (2003) *Fusarium* Head Blight Inoculum: Species Prevalence and *Gibberella zeae* Spore Type. *Plant Disease* 87: 814-820.
- [146] Martins, LM & Martins, MH (2002) Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry* 79: 318.
- [147] Mastri, C, Sloop, TC & Lucier, GW (1986) Nuclear interactions of zearalanol-oestrogen receptor complexes in rat liver: a comparison with oestradiol-17 beta. *Journal of Steroid Biochemistry* 24: 519-523.
- [148] Mateo, JJ, Llorens, A, Mateo, R & Jimenez, M (2001) Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *Journal of Chromatography A* 918: 99-112.
- [149] Mateo, JJ, Mateo, R, Hinojo, MJ, Llorens, A & Jimenez, M (2002) Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. *Journal of Chromatography A* 955: 245-256.
- [150] Matossian, MK (1981) Mold poisoning: an unrecognized English health problem, 1550-1800. *Medicine History* 25: 73-84.
- [151] Mayer, AM, Staples, RC & Gil-ad, NL (2001) Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58: 33-41.
- [152] McCormick, SP, Hohn, TM & Desjardins, AE (1996) Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 353-359.





## Références Bibliographiques

---

- [153] McCormick, SP, Alexander, NJ, Trapp, SE & Hohn, TM (1999) Disruption of *Tri101*, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5252-5256.
- [154] McCormick, SP & Alexander, NJ (2002) *Fusarium Tri8* encodes a trichothecene C-3 esterase. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2959-2964.
- [155] McCormick, SP, Harris, LJ, Alexander, NJ, Ouellet, T, Sapano, A, Allard, S & Desjardins, AE (2004) *Tri1* in *Fusarium graminearum* encodes a P450 oxygenase. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2044-2051.
- [156] Medentsev, AG, Arinbasarova, AY & Akimenko, VK (2001) Adaptation of the phytopathogenic fungus *Fusarium decemcellulare* to oxidative stress. *Microbiology* 70: 26-30.
- [157] Meek, IB, Peplow, AW, Ake, CJ, Phillips, TD & Beremand, MN (2003) *Tri1* encodes the cytochrome P450 monooxygenase for C-8 hydroxylation during trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides* and resides upstream of another new *Tri* gene. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1607-1613.
- [158] Megalla, SE, Bennett, GA, Ellis, JJ & Shotwell, OI (1986) Production of deoxynivalenol and zearalenone by isolates of *Fusarium graminearum* Schw. *Journal of Basic Microbiology* 26: 415-419.
- [159] Mehdy, MC (1994) Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiology* 105: 467-472.
- [160] Merrill, AH, Liotta, DC & Riley, RT (1996) Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Cell Biology* 6: 218 - 223.
- [161] Mesterhazy, A (2002) Role of Deoxynivalenol in Aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in Resistance to *Fusarium* Head Blight. *European Journal of Plant Pathology* 108: 675-684.
- [162] Michan, S, Lledias, F, Baldwin, JD, Natvig, DO & Hansberg, W (2002) Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 521-532.
- [163] Mika, A, Minibayeva, F, Beckett, R & Lühje, S (2004) Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews* 3: 173-193.
- [164] Miller, JD, Young, JC & Trenholm, HL (1983) *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botany* 61: 3080-3087.
- [165] Miller, JD & Greenhalgh, R (1985) Nutrients effects on biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia* 77: 130-136.
- [166] Miller, JD & Young, JC (1985) Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7: 132-134.



## Références Bibliographiques

---

- [167] Miller, JD & Blackwell, BA (1986) Biosynthesis of 3-acetyldeoxynivalenol and other metabolites by *Fusarium culmorum* HLX 1503 in a stirred jar fermentor. *Canadian Journal of Botany* 64: 1-5.
- [168] Miller, JD (1991) Significance of grain mycotoxins for health and nutrition, *Fungi and mycotoxins in stored products*. (Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) eds.), pp. 126-135.
- [169] Miller, JD (1995) *Fungi and Mycotoxins in Grain - Implications for Stored-Product Research*. *Journal of Stored Products Research* 31: 1-16.
- [170] Miller, SS, Chabot, DMP, Ouellet, T, Harris, LJ & Fedak, G (2004) Use of a *Fusarium graminearum* strain transformed with green fluorescent protein to study infection in wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 453-463.
- [171] Minervini, F, Fornelli, F & Flynn, KM (2004) Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B<sub>1</sub> in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro* 18: 21-28.
- [172] Mittler, R & Lam, E (1996) Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends in Microbiology* 4: 15.
- [173] Moore, S, De Vries, OMH & Tudzynski, P (2002) The major Cu,Zn SOD of the phytopathogen *Claviceps purpurea* is not essential for pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 3: 9-22.
- [174] Moye-Rowley, WS (2003) Regulation of the Transcriptional Response to Oxidative Stress in Fungi: Similarities and Differences. *Eucaryotic Cell* 2: 381-389.
- [175] Muhitch, MJ, McCormick, SP, Alexander, NJ & Hohn, TM (2000) Transgenic expression of the TRI101 or PDR5 gene increases resistance of tobacco to the phytotoxic effects of the trichothecene 4,15-diacetoxyscirpenol. *Plant Science* 157: 201-207.
- [176] Mulé, G, Logrieco, A, Stea, G & Bottalico, A (1997) Clustering of Trichothecene-Producing *Fusarium* Strains Determined from 28S Ribosomal DNA Sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1843-1846.
- [177] Munaut, F & Van Hove, F (2004) Diversity in pathogenicity and mycotoxin production of the *Gibberella fujikuroi* group in the tropics. *Bulletin des Seances, Academie Royale des Sciences d'Outre-Mer* 50: 127-139.
- [178] Munkvold, GP, Hellmich, RL & Showers, WB (1997) Reduced *Fusarium* Ear Rot and Symptomless Infection in Kernels of Maize Genetically Engineered for European Corn Borer Resistance. *Phytopathology* 87: 1071-1077.
- [179] Munkvold, GP (2003) Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705-713.
- [180] Nathues, E, Joshi, S, Tenberge, KB, von den Driesch, M, Oeser, B, Baumer, N, Mihlan, M & Tudzynski, P (2004) CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 383-393.



## Références Bibliographiques

---

- [181] Nelson, PE, Toussoun, TA & Marasas, WFO (1983) *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania University Press, London.
- [182] Nicholson, P, Gosman, N, Draeger, R, Thomsett, M, Covarelli, C, Chandler, E & Steed, A (2004) Host-pathogen and pathogen-pathogen interactions in FHB. Proceedings of 2nd Symposium on *Fusarium* Head Blight, Vol. 1, pp. 5. Orlando, (FL) USA.
- [183] Nielsen, KF & Smedsgaard, J (2003) Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A* 1002: 111-136.
- [184] Niessen, ML & Vogel, RF (1998) Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples. *Systemic and Applied Microbiology* 21: 618-631.
- [185] O'Donnell, K, Cigelnik, E & Nirenberg, HI (1998) Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.
- [186] O'Neill, K, Damoglou, AP & Patterson, MF (1993) Toxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344 and *Fusarium graminearum* NRRL 5883 on grain substrates. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 625-628.
- [187] Ogido, R, Oliveira, CAF, Ledoux, DR, Rottinghaus, GE, Correa, B, Butkeraitis, P, Reis, TA, Goncales, E & Albuquerque, R (2004) Effects of prolonged administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in laying Japanese quail. *Poultry Science* 83: 1953-1958.
- [188] Okubara, PA, Blechl, AE, McCormick, SP, Alexander, NJ, Dill-Macky, R & Hohn, TM (2002) Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 74-83.
- [189] Osuchowski, MF, Edwards, GL & Sharma, RP (2005) Fumonisin B-1-induced neurodegeneration in mice after intracerebroventricular infusion is concurrent with disruption of sphingolipid metabolism and activation of proinflammatory signaling. *Neurotoxicology* 26: 211-221.
- [190] Osuchowski, MF, He, QR & Sharma, RP (2005) Endotoxin exposure alters brain and liver effects of fumonisin B-1 in BALB/c mice: Implication of blood brain barrier. *Food and Chemical Toxicology* 43: 1389-1397.
- [191] Paul, SS, Kamra, DN, Sastry, VRB, Sahu, NP & 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.
- [192] Peplow, AW, Tag, AG, Garifullina, GF & Beremand, MN (2003) Identification of new genes positively regulated by Tri10 and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2731-2736.
- [193] Pettersson, H (1998) Intercomparison of trichothecene analysis and feasibility to produce certified calibrants and reference material. BCR information reference materials EUR 18214 EN. European Commission, Brussels.



## Références Bibliographiques

---

- [194] Pfaffl, M (2001) A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- [195] Pfaffl, M, Horgan, G & Dempfle, L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 1-10.
- [196] Pieterse, CMJ, Van Wees, SCM, Van Pelt, JA, Knoester, M, Laan, R, Gerrits, H, Weisbeek, PJ & Van Loon, LC (1998) A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1571-1580.
- [197] Pirgozliev, SR, Edwards, SG, Hare, MC & Jenkinson, P (2003) Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 731-742.
- [198] Polish, JA, Kim, JH & Johnston, M (2005) How the *Rgt1* transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is repleted by glucose. *Genetics* 169: 583-594.
- [199] Ponts, N (2002) Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de trichothécènes et de fumonisines par *Fusarium* en cultures liquides. pp. 25. ISTAB - Université Bordeaux 1, Bordeaux.
- [200] Ponts, N, Pinson-Gadais, L & Richard-Forget, F (2003) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on Trichothecenes B (DON, ADON) production by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *Aspects of Applied Biology* No.68: 223-228.
- [201] Ponts, N, Pinson-Gadais, L, Verdal-Bonnin, MN, Barreau, C & Richard-Forget, F (2005) Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated under oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum* FEMS Microbiology Letters (Submitted).
- [202] Poppenberger, B, Berhiller, F, Lucyshyn, D, Mitterbauer, R, Schweiger, W, Schuhmacher, R, Krska, R & Adam, G (2004) Glucosyltransferases from *Arabidopsis thaliana* inactivating the *Fusarium* toxins deoxynivalenol and zearalenone. *Proceedings of 2nd Symposium on Fusarium Head Blight*, Vol. 1, pp. 251. Orlando, (FL) USA.
- [203] Preda, N (1981) Toxic alimentary aleukia. Trichothecenes with toxic action. *Revista de Igiene Bacteriologie Virusologie Parazitologie Epidemiologie Pneumoftiziologie, Igiene* 30: 11-16.
- [204] Proctor, RH, Hohn, TM & McCormick, SP (1995) Reduced Virulence of *Gibberella zeae* Caused by Disruption of a Trichothecene Toxin Biosynthetic Gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 593-601.
- [205] Proctor, RH, Hohn, TM, McCormick, SP & Desjardins, AE (1995) *Tri6* Encodes an Unusual Zinc-Finger Protein Involved in Regulation of Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1923-1930.
- [206] Quarta, A, Mita, G, Haidukowski, M, Santino, A, Mulé, G & Visconti, A (2005) Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food Additives and Contaminants* 22: 309-315.
- [207] Ramirez, ML, Chulze, S & Magan, N (2004) Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* 23: 117-125.





## Références Bibliographiques

---

- [208] Razzazi-Fazeli, E, Bohm , J & Luf , W (1999) Determination of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using liquid chromatography-mass spectrometry with negative ion atmospheric pressure chemical ionisation. *Journal of Chromatography A* 854: 45-55.
- [209] Razzazi-Fazeli, E, Bohm, J, Jarukamjorn, K & Zentek, J (2003) Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 796: 21-33.
- [210] Reid, LM, Mather, DE, Arnason, JT, Hamilton, RI & Bolton, AT (1992) Changes in Phenolic Constituents of Maize Silk Infected with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Botany* 70: 1697-1702.
- [211] Repka, V (1999) Improved Histochemical Test for *In Situ* Detection of Hydrogen Peroxide in Cells Undergoing Oxidative Burst or Lignification. *Biologia Plantarum* 42: 599-607.
- [212] Repka, V (2002) Hydrogen Peroxide Generated *Via* the Octadecanoid Pathway is Neither Necessary nor Sufficient for Methyl Jasmonate-Induced Hypersensitive Cell Death in Woody Plants. *Biologia Plantarum* 45: 105-115.
- [213] Reynoso, MM, Torres, AM & Ramirez, ML (2002) Efficacy of antioxidant mixtures on growth, fumonisin production and hydrolytic enzyme production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* *in vitro* on maize-based media. *Mycological Research* 106: 1093-1099.
- [214] Rice-Evans, CA, Miller, NJ & Paganga, G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933-956.
- [215] Richard-Forget, FC & Gaillard, FA (1997) Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: A possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2472-2476.
- [216] Rizzo, A & Saari, L (1986) Derivatization of trichothecenes and water treatment of their trimethylsilyl ethers in an anhydrous apolar solvent. *Journal of Chromatography* 368: 381 - 386.
- [217] Rocha, O, Ansari, K & Doohan, FM (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Additives and Contaminants* 22: 369-378.
- [218] Rolke, Y, Liu, SJ, Quidde, T, Williamson, B, Schouten, A, Weltring, KM, Siewers, V, Tenberge, KB, Tudzynski, B & Tudzynski, P (2004) Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* 5: 17-27.
- [219] Rotter, BA, Prelusky, DB & Petska, JJ (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Toxicology and Environmental Health* 48: 1-34.
- [220] Rumora, L, Kovacic, S, Rozgaj, R, Cepelak, I, Pepeljnjak, S & Grubisic, TZ (2002) Cytotoxic and genotoxic effects of fumonisin B<sub>1</sub> on rabbit kidney RK13 cell line. *Archives of Toxicology* 76: 55-61.
- [221] Ryu, D, Jackson, LS & Bullerman, LB (2002) Effects of processing on zearalenone, Vol. 504, pp. 205-216. KLUWER ACADEMIC/PLENUM PUBL, New York.



## Références Bibliographiques

---

- [222] Samuels, GJ, Nirenberg, HI & Seifert, KA (2001) Perithecial species of *Fusarium*, (Summerell, BA, Leslie, JF, Backhouse, D, Bryden, WL et Burgess, LW, eds.), pp. 1-14. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul USA.
- [223] SCF, SCoF (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. CEE.
- [224] Schaafsma, AW, Tamburic-Ilinic, L, Miller, JD & Hooker, DC (2001) Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. Canadian Journal of Plant Pathology 23: 279-285.
- [225] Schafmeier, T, Haase, A, Kaldi, K, Scholz, J, Fuchs, M & Brunner, M (2005) Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. Cell 122: 235-246.
- [226] Schmale, DG, Shah, DA & Bergstrom, GC (2005) Spatial patterns of viable spore deposition of *Gibberella zeae* in wheat fields. Phytopathology 95: 472-479.
- [227] Schmale, DG, Shah, DA & Bergstrom, GC (2005) Spatial patterns of viable spore deposition of the corn ear rot pathogen, *Gibberella zeae*, in first-year corn fields. Canadian Journal of Plant Pathology 27: 225-233.
- [228] Schmelz, EM, Dombrink-Kurtzman, MA, Roberts, PC, Kozutsumi, Y, Kawasaki, T & Merrill, AH (1998) Induction of Apoptosis by Fumonisin B<sub>1</sub> in HT29 Cells Is Mediated by the Accumulation of Endogenous Free Sphingoid Bases. Toxicology and Applied Pharmacology 148: 252-260.
- [229] Seifert, KA (2001) *Fusarium* and anamorph generic concepts, (Summerell, BA, Leslie, JF, Backhouse, D, Bryden, WL et Burgess, LW, eds.), pp. 15-28. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul USA.
- [230] Selosse, MA & Durrieu, G (2004) A francophone phylogenetic classification of fungi. Acta Botanica Gallica 151: 73-102.
- [231] Shephard, GS, Van der Westhuizen, L, Thiel, PG, Gelderblom, WCA, Marasas, WFO & Van Schalkwyk, DJ (1996) Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. Toxicon 34: 527-534.
- [232] Shimada, T & Otani, M (1990) Effects of *Fusarium* mycotoxins on the growth of shoots and roots at germination in some Japanese wheat cultivars. Cereal Research Communications 18: 229-232.
- [233] Snijders, CH (2004) Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. Toxicology Letters 153: 37-46.
- [234] Somleva, MN & Blechl, AE (2004) Characterization of organ specific promoters in transgenic wheat. Proceedings of 2nd Symposium on *Fusarium* Head Blight, vol.1, pp. 263-267. Orlando (FL) USA.
- [235] Steyn, PS (1995) Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicology Letters 82-83: 843-851.
- [236] Steyn, PS & Stander, MA (1999) Mycotoxins as causal factors of diseases in humans. Journal of Toxicology, Toxin Reviews 18: 229-243.



## Références Bibliographiques

---

- [237] Sutton , JC (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of plant pathology 195: 195 - 209.
- [238] Sweeney, MJ & Dobson, ADW (1999) Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. FEMS Microbiology Letters 175: 149-163.
- [239] Sydenham, EW, Thiel, PG, Marasas, WFO, Shephard, GS, Van Schalkwyk, DJ & Koch, KR (1990) Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 1900-1903.
- [240] Tag, AG, Garifullina, GF, Peplow, AW, Ake, C, Phillips, TD, Hohn, TM & Beremand, MN (2001) A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. Applied and Environmental Microbiology 67: 5294-5302.
- [241] Thaler, JS, Owen, B & Higgins, VJ (2004) The Role of the Jasmonate Response in Plant Susceptibility to Diverse Pathogens with a Range of Lifestyles. Plant Physiology 135: 530-538.
- [242] Thiel, PG, Marasas, WFO, Sydenham, EW, Shephard, GS & Gelderblom, WCA (1992) The Implications of Naturally-Occurring Levels of Fumonisin in Corn for Human and Animal Health. Mycopathologia 117: 3-9.
- [243] Thomma, BPH, Eggermont, K, Penninckx, IAMA, Mauch-Mani, B, Vogelsang, R, Cammue, BPA & Broekaert, WF (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95: 15107-15111.
- [244] Tokai, T, Fujimura, M, Inoue, H, Aoki, T, Ohta, K, Shibata, T, Yamaguchi, I & Kimura, M (2005) Concordant evolution of trichothecene 3-O-acetyltransferase and an rDNA species phylogeny of trichothecene-producing and non-producing fusaria and other ascomycetous fungi. Microbiology 151: 509-519.
- [245] Tolleson, WH, Melchior, WB, Morris, SM, McGarrity, LJ, Domon, OE, Muskhelishvili, L, James, SJ & Howard, PC (1996) Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B<sub>1</sub> in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. Carcinogenesis 17: 239-249.
- [246] Tran, ST, Auvergne, A, Benard, G, Bailly, JD, Tardieu, D, Babile, R & Guerre, P (2005) Chronic effects of fumonisin B1 on ducks. Poultry Science 84: 22-28.
- [247] Ueno, Y (1973) Akakabi toxins (*Fusarium* toxins). (Part 2). Journal of the Food and Hygiene Society of Japan 14: 501-510.
- [248] Urban, M, Mott, E, Farley, T & Hammond-Kosack, K (2003) The *Fusarium graminearum* MAP1 gene is essential for pathogenicity and development of perithecia. Molecular Plant Pathology 4: 347-359.
- [249] Van der Westhuizen, L, Shephard, GS, Scussel, VM, Costa, LLF, Vismer, HF, Rheeder, JP & Marasas, WFO (2003) Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 5574-5578.
- [250] Van Maanen, A & Xu, XM (2003) Modelling plant disease epidemics. European Journal of Plant Pathology 109: 669-682.



## Références Bibliographiques

---

- [251] Veldink, GA, Garssen, GJ, Vliegthart, JF & Boldingh, J (1972) Positional specificity of corn germ lipoxygenase as a function of pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 47: 22-26.
- [252] Vidhyasekaran, P, Borromeo, ES & Mew, TW (1986) Host-specific toxin production by *Helminthosporium oryzae*. *Phytopathology* 76: 261-265.
- [253] Vigier, B, Reid, LM, Dwyer, LM, Stewart, DW, Sinha, RC, Arnason, JT & Butler, G (2001) Maize resistance to *Gibberella* ear rot: symptoms, deoxynivalenol, and yield. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 99-105.
- [254] Vilei, EM & Frey, J (2001) Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC: its impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and virulence. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8: 85-92.
- [255] Voyksner, RD, Hagler, WMJ & Swanson, SP (1987) Analysis of some metabolites of T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol by thermospray high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 394: 183-199.
- [256] Wallace, G & Fry, SC (1994) Phenolic components of the cell plant wall. *International Review of Cytology* 151: 229-267.
- [257] Wang, E, Norred, WP, Bacon, CW, Riley, RT & Merrill, AH (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry* 266: 14486-14490.
- [258] Wang, YP, Liu, YQ, Shi, L, Pan, NS & Chen, ZL (1993) SOD activity of wheat varieties with different resistance to scab. *Acta Phytophysiologica Sinica* 19: 353-358.
- [259] Wax, R, Rosenberg, E, Kosower, NS & Kosower, EM (1970) Effect of the thiol-oxidizing agent diamide on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 101: 1092-1093.
- [260] Wei, HJ, Requena, N & Fischer, R (2003) The MAPKK kinase SteC regulates conidiophore morphology and is essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 47: 1577-1588.
- [261] Wilbert, FM & Kemmelmeier, C (2003) Identification of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone in galactose oxidase-producing isolates of *Fusarium graminearum*. *Journal of Basic Microbiology* 43: 148-157.
- [262] Wilson, RA, Gardner, HW & Keller, NP (2001) Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 980-987.
- [263] Wineland, GO (1924) An ascigereous stage and synonymy for *Fusarium moniliforme*. *Journal of Agricultural Research* 28: 909-922.
- [264] Wing, N, Burgess, LW & Bryden, WL (1995) Cultural Degeneration in 2 *Fusarium* Species and Its Effects on Toxigenicity and Cultural Morphology. *Mycological Research* 99: 615-620.
- [265] Wood, M (2002) Gene jockey fight *Fusarium* head blight. *Agricultural Research* 50: 12-13.





## *Références Bibliographiques*

---

- [266] Wuchiyama, J, Kimura, M & Yamaguchi, I (2000) A trichothecene efflux pump encoded by *Tri102* in the biosynthetic gene cluster of *Fusarium graminearum*. *Journal of Antibiotics* 53: 196-200.
- [267] Xu, XM & Berrie, AM (2005) Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with *Fusarium* ear blight and apple blue mould: A review. *Food Additives and Contaminants* 22: 290-301.
- [268] Yates, IE, Widstrom, NW, Bacon, CW, Glenn, A, Hinton, DM, Sparks, D & Jaworski, AJ (2005) Field performance of maize grown from *Fusarium verticillioides*-inoculated seed. *Mycopathologia* 159: 65-73.
- [269] Yoshizawa, T (2003) Human and animal intoxication episodes caused by trichothecene mycotoxins. *Mycotoxins* 53: 113-118.
- [270] Zamir, LO, Devor, KA & Sauriol, F (1991) Biosynthesis of the trichothecene 3-acetyldeoxynivalenol. Identification of the oxygenation steps after isotrichodermin. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 14992-15000.
- [271] Zamir, LO & Farah, CA (2000) Is *Fusarium culmorum* isotrichodermin-15-hydroxylase different from other fungal species? *Canadian Journal of Microbiology* 46: 143-149.
- [272] Zhou, W, Kolb, FL & Riechers, DE (2005) Identification of proteins induced or upregulated by *Fusarium* head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* 48: 770-780.
- [273] Zhou, WC, Kolb, FL & Riechers, DE (2004) Identification of proteins induced by *Fusarium* head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Proceedings of 2nd Symposium on Fusarium Head Blight*, vol.1, pp. 233. Orlando, (FL) USA.



## *Annexes*



# ANNEXE 1 :

## Notice d'utilisation du kit iQ SYBR<sup>TM</sup> Green Supermix

### Reaction Set Up

Component	Volume per reaction	Final concentration
iQ SYBR Green Supermix	25 µl	1X
Primer 1	x µl	100 nM-500 nM
Primer 2	x µl	100 nM-500 nM
Sterile water	x µl	
DNA template	x µl	

Total Volume 50 µl

### Reagents and Materials Not Supplied

- Screw cap microcentrifuge tubes
- Pipette tips, preferably aerosol barrier tips
- Vortexer
- Microcentrifuge
- Optical plates/tubes
- Sterile water
- Reaction primers
- Real-time PCR detection system

### Recommendations for Optimal Results

Due to the sensitivity of quantitative PCR, results can be easily affected by pipetting errors.

- Always prepare a master mix of iQ SYBR Green Supermix containing the primers and probe.
- Add the template DNA sample to aliquots of the master mix for optimal reproducibility of replicate samples.
- This allows you to pipet once into the sample well or tube.

Individual pipetting of replicate samples is not recommended.

To see data generated using iQ SYBR Green Supermix, visit our website:

[www.bio-rad.com/cycler](http://www.bio-rad.com/cycler)  
 Choose 'Real-Time PCR' and look at 'What's New'

Practices of the patented polymerase chain reaction (PCR) process requires a license. The iCycler IQ system includes a licensed thermal cycler and may be used with PCR licenses available from Applied Biosystems. Its use with authorized reagents also provides a limited PCR license in accordance with the label rights accompanying such reagents. Some applications may require licenses from other parties.

SYBR Green is a trademark of Molecular Probes, Inc.

Bio-Rad Laboratories  
 2000 Alton Road, Hercules, CA 94547  
 916-741-5000

4105211 Rev A



iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix 170-8882

500 x 50 µl reactions  
 For Research purposes only  
 Store at -20°C

### Storage and Stability

Store the iQ SYBR Green Supermix at -20°C in a constant temperature freezer. Avoid repeated freeze/thaw cycles. When stored under these conditions the supermix is stable for one year after ship date. You may aliquot the supermix and store a portion at 4°C for ready use. At 4°C the supermix is stable for six months.

### Kit Contents

iQ SYBR Green Supermix is a 2X mix for real-time PCR applications. The iQ SYBR Green Supermix contains enough PCR reagents for up to 500 x 50 µl reactions using the hot-start enzyme, iTaq<sup>TM</sup> DNA polymerase. This enzyme is activated after an initial three minute denaturation step at 95°C.

Reagent	Volume	Description
2X SYBR Green Supermix (Orange Cap)	1.25 ml x 10	100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.4, 0.4 mM of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), iTaq DNA polymerase, 50 units/ml, 6 mM MgCl <sub>2</sub> , SYBR Green I, 20 nM fluorescein, and stabilizers.

iQ SYBR Green Supermix comes optimized for real-time PCR applications. It contains fluorescein for dynamic well factor collection on the iCycler IQ system. The addition of fluorescein will not affect the reaction efficiency or sensitivity of detection.

If you would like to have extra MgCl<sub>2</sub>, a 50 mM MgCl<sub>2</sub> solution is available free of charge upon request. Please request catalog number 170-8872 for 1.25 ml of this solution.

### Quality Control

The iQ SYBR Green Supermix is free of contaminating DNase and RNase. Functionally, the iQ SYBR Green Supermix is tested to demonstrate resolution over six orders of dynamic range of plasmid DNA and three orders of human genomic DNA to detect a single copy gene, IL-1β.



## ANNEXE 2 :

### Communications Scientifiques

*Aspects of Applied Biology 68, 2003  
Mycotoxins in Food Production Systems*

#### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on Trichothecenes B (DON, ADON) production by *Fusarium graminearum* in liquid culture**

**By N PONTS, L PINSON-GADAIS and F RICHARD-FORGET**

*Unité de Biologie et Technologie Après Récolte, INRA, BP 81, F-33883 Villenave  
d'Ornon*

#### **Summary**

Growth and production of Trichothecenes B<sup>1</sup> (TCTB) by the *F. graminearum* strain CBS 18532 were compared in GYEP medium supplemented or not with different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations. For higher than 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, mycelia growth was totally inhibited. For lower than 1 mM concentration and 5-days-old cultures, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to a strong decrease in TCTB accumulation without affecting the mycelia growth, suggesting a specific H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effect on fungal secondary metabolism. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assays in not supplemented media have shown an endogenous fungal production, the kinetic of which seems parallel to TCTB accumulation. Moreover, the initial amounts of introduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were consumed to attain values ranged between 20 and 150 µM in 4 days-old cultures. First RT-PCR analysis of tri5, tri6 and tri10 expression suggested that the inhibition of TCTB production by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> should be partially ascribed to a transcriptional control. Besides, it was shown that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> did not inhibit TCTB secretion.

**Key words :** *Fusarium graminearum*, Trichothecenes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inhibition

#### **Introduction**

*Fusarium graminearum* is a fungal pathogen that infects a wide variety of plant cereals. Several strains produce some mycotoxins TCTB including deoxynivalenol<sup>1</sup> (DON) and its acetylated derivatives 3 and 15 acetyldeoxynivalenol<sup>1</sup> (3-ADON and 15-ADON), that are the most commonly found in Europe, America and Asia. TCTB are toxic to animal and possibly human health; because they are resistant to food processing and do not readily degrade at high temperature, they enter the animal and human food supply. Significant losses of cereal grains occur worldwide due to lower yield and to lower value linked to TCTB contamination. A better understanding of toxin biosynthesis regulation may lead to new strategies to limit their production by fungi in cereals and therefore their impact on humans and animals health.

Few data concerning the nutritional and environmental factors that influence TCTB biosynthesis are available. The most studied factors are aw, pH and temperature values (Miller *et al.*, 1983). Some works have also focused on the effects of carbon and nitrogen source (Miller and Greenhalgh, 1985), of cereal grain nature (O'Neill *et al.*,

---

<sup>1</sup> Abbreviations used : TrichothecenesB : TCTB, DON : deoxynivalenol, A-DON : acetyldeoxynivalenol





1993), illustrating the significant influence of substrate composition on TCTB production. This substrate composition may be considerably modified by the plant defence mechanism developed in an attempt to restrict or prevent fungal growth. Among the broad range of defence responses, the generation of reactive oxygen species, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide radical (<sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydroxyl radical (<sup>•</sup>OH), is one of the earliest events. In some fungally infected cells, Jacks and Davidonis (1996) have described a rapid and transient production of high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaching intracellular concentrations of up to 1 M. Considering the oxidation steps involved in the biosynthesis TCTB pathway, we could reasonably suppose that TCTB accumulation will be modified by oxidative stress conditions. Therefore, the present study was conducted in view to determine the effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on TCTB, DON and its acetylated derivatives, production and to investigate the involved mechanism.

## **Materials and Methods**

### ***Strain, media, and culture conditions***

The *F. graminearum* CBS 185.32 used in this study was from Baarn collection. Stock culture was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) slants at 4°C. Liquid-culture experiments were done with Glucose Yeast Extract Peptone (GYEP) medium (Miller *et al.*, 1983) supplemented or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in the range 0-5 mM), in triplicate baffled 500-ml Erlenmeyer flasks at 100-ml volume. Spore suspensions were prepared by adding 6 ml of sterile diluting solution (tryptone 1 % w/v, NaCl 8,5 % w/v, tween 80 0,3 %) to the PDA slants with gentle shaking. Spore suspensions were added to each 100 ml culture medium to achieve a final concentration of 10<sup>4</sup> spores ml<sup>-1</sup>. Cultures were incubated for 15 days at 25 °C and 150 rpm in a rotary shaker incubator (INFORS). After 24, 48, 72, 96, 120 and 360 hours of fermentation, broth were filtered under vacuum through Whatman paper n°1, rinsed twice with sterile water and immediately stored at – 80°C. The three filtrates were analysed for TCTB production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption. The mycelia of two flasks were lyophilised to determine mycelium dry weight and analyse the non-secreted TCTB amounts. Mycelium from the third flask was devoted to RNA extractions.

### ***Trichothecenes analysis***

TCTB were analysed by CG-ECD. Fifteen ml of filtered medium were extracted by 30 ml of ethyl acetate or 300 mg of lyophilised ground mycelium by 12 ml of a mixture H<sub>2</sub>O/acétonitrile (16/84 v/v). Ten ml of the organic phase (3 ml for mycelium extraction) were evaporated to dryness, dissolved in 3 x 2 ml of acetonitrile, transferred in a new vial and evaporated under nitrogen flux. Three extractions were performed per sample. Derivatization and quantification were achieved as described by Bakan *et al.* (2001).

### ***H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assay***

The procedure was adapted from Richard-Forget and Gaillard (1997). Five hundred µl of 50 mM guaiacol (dissolved in McIlvaine buffer, pH 5.5) and 0.6 mg of HRP were added to 1 ml of filtered medium. The absorbance was immediately followed at 470 nm. Quantification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was done with known H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions (GYEP supplemented with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the range 0-75 µM). To check the lack of peroxidase activity in the culture media, 1 ml of filtrate without addition of HRP was similarly reacted with guaiacol.

### ***RNA extraction, primers and RT-PCR assay***

Frozen mycelia were ground in liquid N<sub>2</sub> before RNA extraction. The SV total RNA Isolation System kit (Promega) was used. Extracted RNA was quantified by



determining the optical density at 257 nm. Primers for tri 5 (tox5-1 and tox 5-2) were those described by Niessen and Vogel (1998). Primers for tri 6 (tri6-1 and tri6-2) and  $\beta$  tubuline ( $\beta_1$  and  $\beta_2$ ) were a gift from B. Bakan (INRA Nantes, France). Primers for tri10 (tri10<sub>934</sub> [5'-GAC GAG CTA CAA AGG CTA CC-3'] and tri10<sub>1332</sub> [5'-CC TATG GTG ATC CGT CAA GT-3']) were derived from conserved regions of tri10 in *Gibberella Zeae*, *Gibberella pulicaris* and *F. sporotrichioides* (Genbank accession n° AF365969, AF 386074 and AF 359360).

Reaction mixtures for RT contained 10  $\mu$ g of total RNA, 200 U of superscript reverse transcriptase (GibcoBRL), 40 U RNase inhibitor (Promega), 0.625  $\mu$ g of oligo(dT) (Promega), 25 nmoles dDNTTP (Promega) and 0.5  $\mu$ moles DTT. RT was performed with the following conditions: template denaturation for 5 min at 65°C, primer annealing for 60 min at 37°C and primer extension for 5 min at 95°C. Aliquots (1  $\mu$ l) of RT products were coamplified by pCR with 25 pmol of each primer couple (tox5-1 and tox5-2, tri6-1 and tri6-2, tri10<sub>934</sub> and tri10<sub>1332</sub>). For each reaction, 25 pmol of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  were used. Coamplification of tri5, tri6 and tri10/ $\beta$ tubuline included 28 cycles consisting of 95°C template denaturation for 90 s, 57°C primer annealing for 1 min and 72°C primer extension for 2 min (5 min for the last cycle).

## Results

The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on toxin yield and mycelium growth was analysed after 5 days of culture (Table 1). In our experimental conditions, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supplementation did not modify pH value of the culture media (data not shown). Mycelium growth was unaffected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for lower than 1 mM concentrations. The weight of the obtained mycelium close to 0.45 g attested for the high nutrient efficiency of our experimental conditions. For higher than 1 mM concentrations, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totally inhibited the mycelium growth. Similar results were obtained for analysis performed on 15 days old cultures (data not shown).

15-ADON was the major TCTB produced by the CBS 18532 *F. graminearum* strain, in accordance with previous characterisation studies (Miller *et al.*, 1983). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cultures exhibited a 2-10 fold decrease in TCTB accumulation, yield inhibition increasing with initial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amount. Thus, supplementation of GYEP with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> led to a 90% inhibition of toxin production after 5 days of culture.

Table 1. *Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on growth and trichothecenes yield by F. graminearum CBS 18532 in submerged cultures.*

[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mM)	DON (ng ml <sup>-1</sup> )	ADON (ng ml <sup>-1</sup> )	Mycelium weight (g)
0	10.1 ± 0.81	1655 ± 57.1	0.439 ± 0.025
0.25	2.4 ± 0.85	814 ± 16.2	0.389 ± 0.018
0.5	1.15 ± 0.82	377 ± 15.7	0.407 ± 0.014
1	2.2 ± 0.41	164 ± 11.2	0.387 ± 0.026
5	Nd	Nd	Nd

Analyses performed on 5-days old cultures. Values represent average of 9 replicates ± standard deviation. Nd: not detected

For each considered culture medium, toxin production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amount were followed over time, up to 15 days. Whatever the initial amount of introduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the incubation time, pH values of the media were similar, close to 4.5 (data not shown).



Typical curves obtained for not supplemented and 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-supplemented GYEP are reported on figure 1. For both culture media, toxin production began between 2 and 3 days to thereafter sharply increased between 4 and 5 days, in accordance with the TCTB yield time course described by Miller *et al.* (1983). The 4-5 day increase was however strongly reduced in presence of 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In 15-days old cultures, inhibition effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was less significant, due to the slight decrease in TCTB accumulation arising between 5 and 15 days in standard GYEP medium.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assays in not supplemented cultures have demonstrated the occurrence of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fungal production, which time course appeared parallel to toxin accumulation (perceptible after 2 days, increasing between 4 and 5 days). In GYEP media supplied with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, introduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was significantly consumed during the first days of culture, to attain less than 200 μM in 4-days old broth. This level was two-fold increased between 4 and 5 day. A similar tendency was observed with 0.25 and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> media (data not shown), *i.e.* a first H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption step (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amounts determined for 4 days-old cultures were respectively close to 50 and 100 μM) followed by the occurrence of an accumulation phase between 4 and 5 days.

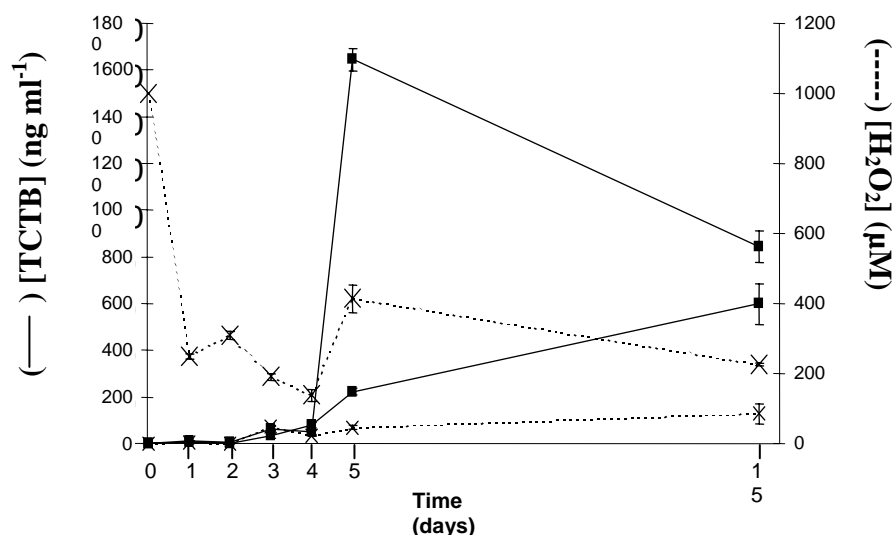


Figure 1: Time course of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amount (---) and trichothecenes (DON + ADON) yield (—) by *Fusarium graminearum* CBS 18532 in GYEP medium (v) and GYEP medium supplemented with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (x). Each point represents the average and the standard deviation in three culture flasks.

Further experiments were performed to investigate the mechanism involved in toxin production inhibition by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We first compared the amounts of non secreted TCTB, contained in the 5-days old mycelia. We therefore demonstrated that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appeared to activate the TCTB secretion mechanism. For instance, 16 500 μg g<sup>-1</sup> of ADON were found in mycelia harvested from 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medium against 500 μg g<sup>-1</sup> for mycelia grown in standard GYEP medium. SDS electrophoretic patterns of fungal proteins (extracted from mycelia and filtrates of the different 5 days-old culture media, supplemented or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were also compared: no significant differences were pointed out.



To investigate a possible transcriptional control, in accordance with the published data on TCTB biosynthetic pathway, we decided to follow tri5, tri6 and tri10 expression during the first 5 days of culture. Tri5 encodes trichodiene synthase, which catalyses the first step of TCTB biosynthesis pathway (Hohn and Desjardins, 1992). Tri6 and tri10 encode for two proteins involved in the transcriptional regulation of tri genes including tri5 (Tag *et al.*, 2001). In each case,  $\beta$ tubuline expression, which has been shown as constant over time (Doohan *et al.*, 1999) was used as a measure of fungal primary metabolism. The ratio tri to  $\beta$ tubuline PCR products was used to estimate the relative expression of tri genes. First results obtained for 3 days-old cultures in medium supplemented or not with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, are reported on figure 2. Whatever the considered gene, RT-PCR experiments yielded to a single band of amplified cDNA, close to 250 bp for  $\beta$ tubuline, 600 bp for tri5, 300 bp for tri6 (data not shown) and 400 bp for tri10. If tri6 expression appeared to be not affected by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supplementation (data not shown), tri5 and tri10 expression were modified. Thus, tri5 expression seemed to be enhanced, tri10 expression to be inhibited. These first results require however to be checked on older broth and for the other considered H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amounts.

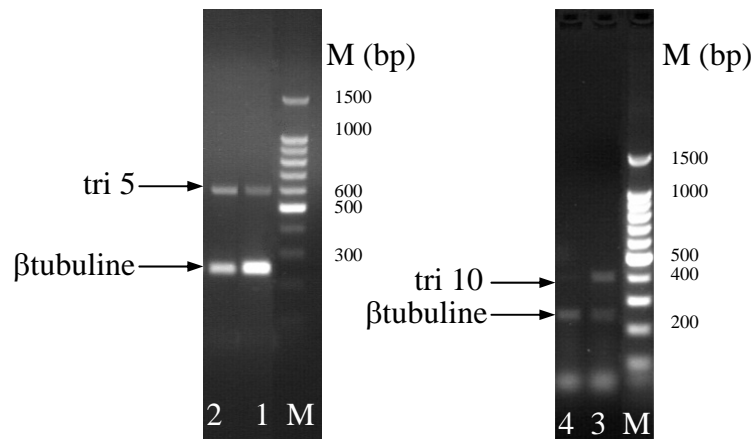


Figure 2 : Agarose gel electrophoresis of tri5, tri10 and  $\beta$ tubuline RT-PCR products from *F. Graminearum* grown in GYEP medium for 72h. Lanes: 1 and 3, standard GYEP medium, 2 and 4, GYEP supplied with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M, sizemarker.

## Discussion

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been shown to be one of the prevalent reactive oxygen species produced by cereals to restrict or prevent fungal growth (Jacks and Davidonis, 1996). Our results demonstrate that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (even in low amounts, weaker than 1 mM) has an important regulatory effect on TCTB biosynthesis and could therefore modulate the amount of mycotoxins in cereal crops. In *F. graminearum* submerged cultures, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supplementation led to a great decrease (close to 90% with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in DON and its acetylated derivatives accumulation. To our knowledge, it is the first time that pro-oxidant species have been reported as TCTB yield inhibitors. These data are however in accordance with the previous studies of Greenhalgh *et al.* (1983) who demonstrated that DON accumulation was enhanced by reducing O<sub>2</sub> amounts. They can also be compared with the conclusions of Wilson *et al.* (2001) concerning the aflatoxin yield inhibition by





3-hydroperoxide. At the opposite, Schuster *et al.* (1987) reported higher TCTB production in shake cultures than in still ones.

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption occurring during the first 5 days of *F. graminearum* CBS 18532 in submerged cultures illustrated the adaptive response developed by *Fusarium* to protect cells from oxidative damage. This consumption can be ascribed to non-enzymatic or enzymatic components including lipoxygenase, catalase, glutathion peroxidase (Ayar-Kayali *et al.*, 2002). Moreover, our results have shown an extracellular fungal production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which time course seems parallel to TCTB accumulation. This production is in accordance with extracellular galactose oxidase activity described by Barbosa-Tessmann *et al.* (2001) in *F. graminearum* submerged cultures. Further experiments are being carried out to investigate the significance of this H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yield in relation to toxin biosynthesis.

If our work has allowed to progress in the understanding of the mechanism by which H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exerts its inhibitory effect, further experiments are required to precise the involved transcriptional control. According to the first results we obtained, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) supplementation seemed to enhance tri5 expression, to inhibit tri10 one while not affecting tri6 expression. These data are not consistent with the conclusions of Tag *et al.* (2001) who reported that tri10 exerted a positive control of tri5 and tri4 expression by regulating positively the transcription of tri6. Thus, our results suggested the occurrence of an additional mechanism by which tri5 expression could be activated, occurrence of such a mechanism was also supposed by Tag *et al.* (2001). Further experiments are required to confirm and complete these first results.

## References

- Ayar-Kayali H., Ozer N., Tarhan L., 2002. Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathion peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in defined medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **400** : 265-272.
- Barbosa-Tessmann I.P., Da Silva D.A., Peralta R.M., Kemmelmeier C., 2001. A new species of *Fusarium* producer of galactose oxidase. *Journal of Basic Microbiology* **41**: 143-148.
- Bakan B., Pinson L., Cahagnier B., Melcion D., Semon E., Richard-Molard 2001. Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from french wheat. *Food Additives and Contaminants* **18**: 998-1003.
- Doohan F.M., Weston G., Rezanoor H.N., Parry D.W., Nicholson P. 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of tri5 by *fusarium* species in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3850-3854.
- Greenhalgh R., Neish G.A., Miller J.D. 1983. Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol and zearalenone formation by canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Applied and Environmental Microbiology* **46**: 625-629.
- Hohn T.M., Desjardin A.E., 1992. Isolation and gene disruption of the tox 5 encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **5**:249-256.
- Jacks TJ, Davidonis G.H. 1996. Superoxide, hydrogen peroxide and the respiratory burst of fungally infected plant cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **158**: 77-79.
- Miller J.D., Taylor A., Greenhalgh R. 1983. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Microbiology* **29**: 1171-1178.



- Miller J.D., Greenhalgh R. 1985.** Nutrients effects on biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia* **77**: 130-136.
- Niessen M.L., Vogel R.F. 1998.** Group specific PCR-detection of potential trichothecens producing *Fusarium* species in pure cultures and cereals samples. *Systematic and Applied Microbiology* **21**: 613-617.
- O'Neill K., Damoglou A.P., Patterson M.F. 1993.** Toxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344 and *Fusarium graminearum* NRRL 5883 on grain substrates. *Journal of Applied Bacteriology* **74**:625-628.
- Richard-Forget F, Gaillard F 1997.** Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 2472-2476.
- Schuster M., Lepschy J., Biber A., engelhardt G., Wallnofer P.R. 1987.** Production of mycotoxins by *Fusarium* species isolated in germany. 2. Time course of deoxynivenol and 3-acetyldeoxynivalenol formation by *Fusarium graminearum* in different liquid media. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung* **185**: 477-480.
- Tag A.G., Garifullina F., Peplow A.W., Ake C., Phillips T.D., Hohn T.M., Beremand M.N. 2001.** A novel regulatory gene, tri 10, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5294-53002.
- Wilson R.A., Gardner H.W., Keller N.P. 2001.** Cultivar-dependent expression of maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi. *Molecular Plant Microbe Interaction* **14**: 980-987.



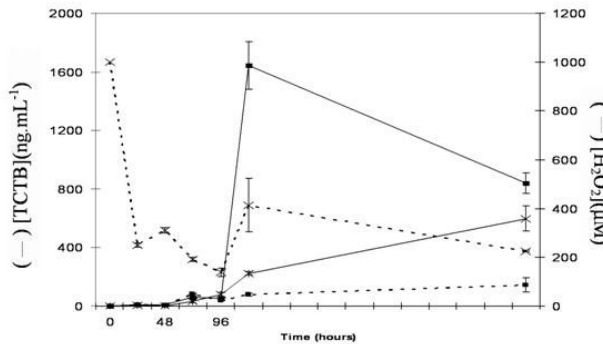
## Mycotoxins in Food Production Systems, University of Bath, 25-27 Jun 2003



### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effects on Trichothecenes B (DON,ADON) production by *Fusarium graminearum* in liquid culture

N. PONTS, L. PINSON-GADAIS and F. RICHARD-FORGET  
INRA-Unité de biologie et technologie après récolte BP 81 F 33883 Villenave d'Ornon France

*F. graminearum* is a fungal pathogen that infects a wide variety of cereals and can produce **trichothecenes B (TCTB)**. Fungal invasion triggers several **defence mechanisms** in the host plant that may greatly modify the substrate composition. Among the broad range of defence responses, the generation of **reactive oxygen species**, including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydroxyl radical (OH), is one of the earliest events. Considering the oxidation steps involved in the TCTB biosynthesis pathway, we can reasonably suppose that TCTB accumulation would be modulated by **oxidative stress conditions**.



Time course of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amount (---) and trichothecenes (DON + ADON) yield (—) by *F. graminearum* CBS 18532 in GYEP medium (■) and GYEP medium supplemented with 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (x). Each point represents the average between values obtained in three culture flasks and the standard deviation.

**Toxin production kinetics** in not supplemented and 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-supplemented GYEP culture media (mycelium growth unaffected):

- initiate between 2 and 3 days,
- increase between 4 and 5 days; however this increase is strongly reduced in presence of 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fungal metabolism** in not supplemented media:

- extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fungal production,
- appears to parallel toxin accumulation.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kinetics** in supplemented cultures:

- introduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is significantly consumed during the first day of growth,
- appears to parallel toxin accumulation too.

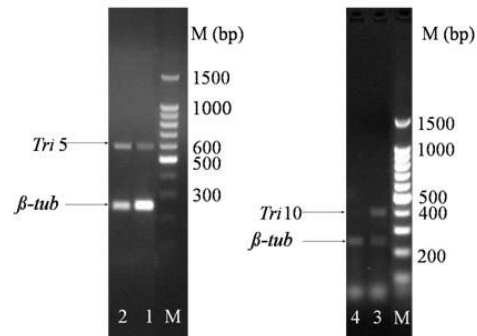
To investigate a possible **transcriptional control** we followed *Tri 5* and *Tri 10* expressions during the first 5 days of growth.

**β-tubuline (β-tub)** constitutive expression study allowed us to measure **fungal development**. The ratio of *Tri*/β-tub RT-PCR products is used to estimate the **relative expression** of *Tri* genes.

Both *Tri* genes expression are modified in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supplemented media:

- *Tri 5* expression seemed to be **enhanced**,
- *Tri 10* expression seemed to be **inhibited**.

However, these first results need to be checked with older broth and other H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amounts, and on other *Tri* genes.



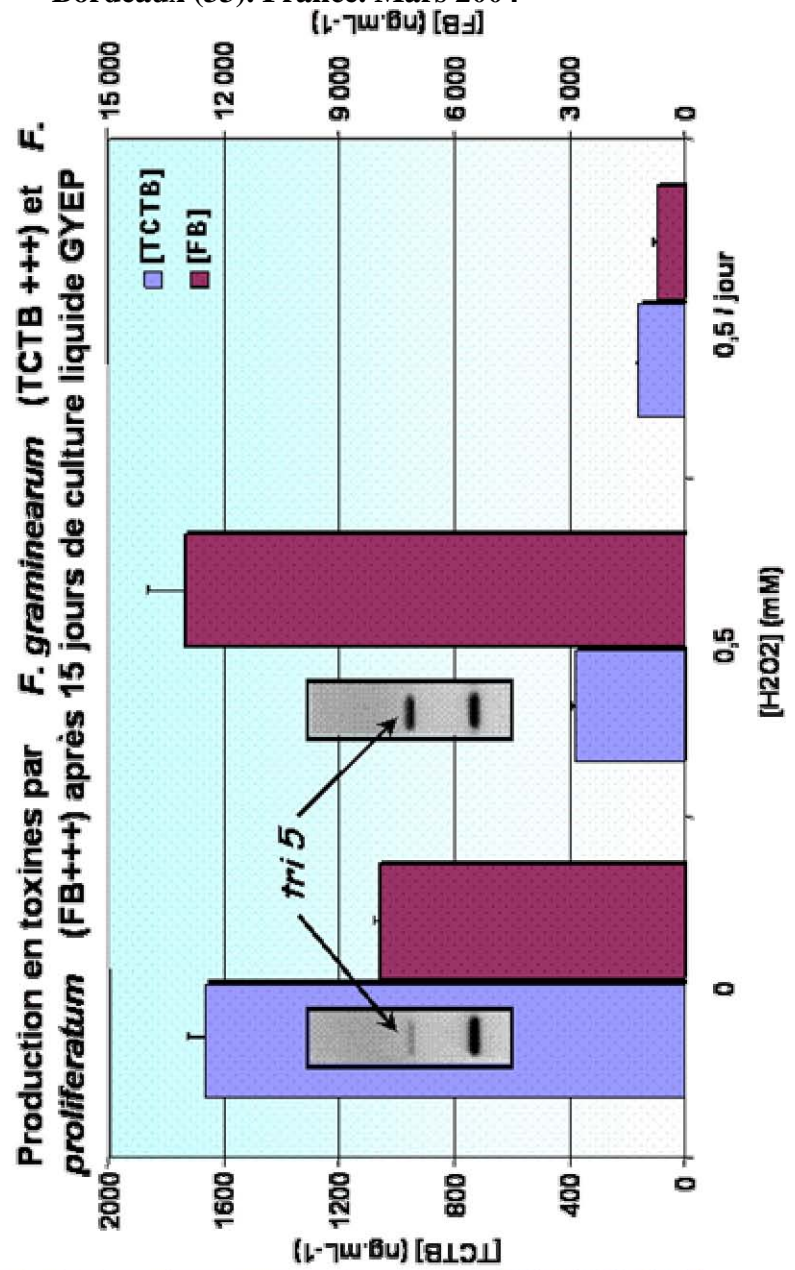
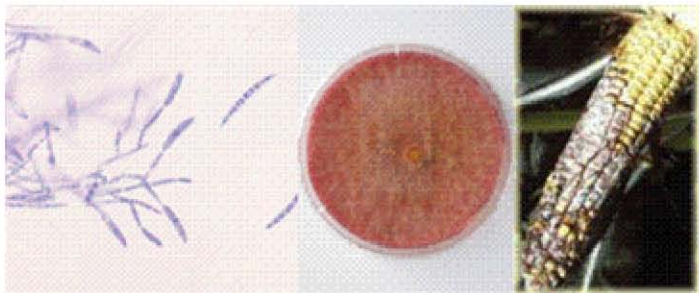
Agarose gel electrophoresis of *Tri 5*, *Tri 10* and β-tub duplex RT-PCR products from *F. graminearum* grown in GYEP medium for 72h. Lanes 1 and 3: standard GYEP medium; 2 and 4: GYEP supplied with 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; M: molecular size marker.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been shown to be one of the prevalent **reactive oxygen species** produced by cereals to **restrict or prevent fungal growth**. Our results demonstrate that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has an important **regulatory effect** on TCTB biosynthesis and could therefore modulate the amount of mycotoxins in cereal crops. To our knowledge, this is the first time that **pro-oxidant species** have been reported as **reducing TCTB yield**.

The **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption** occurring during the first 5 days of *F. graminearum* CBS 18532 in submerged cultures illustrated the **adaptive response** developed by *Fusarium* to protect cells from oxidative damage. Moreover, our results show an **extracellular fungal production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, with a time course which appears to **parallel TCTB accumulation**. Further experiments are being carried out to investigate the **significance** of this H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yield in relation to toxin biosynthesis.



**N. PONTS**  **Influence de stress oxydatifs sur la biosynthèse de mycotoxines (trichothécènes B ou fumonisines) par les espèces fongiques du genre *Fusarium* majoritaires sur l'épi de Maïs**







**Communication orale. Journées Jean Chevaugon-Ve rencontres de phytopathologie/mycologie. Aussois, Savoie, France. 18-22 janvier 2004**

**Effets de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de trichothécènes B (DON, ADON) par *Fusarium graminearum* en culture liquide**

N PONTS, L PINSON-GADAIS and F RICHARD-FORGET

INRA Centre de Bordeaux, UBTAR, BP 81; 71, avenue Edouard Bourleaux 33883 Villenave d'Ornon  
Cedex France

*Fusarium graminearum*, majoritaire sur épi de maïs, est producteur de trichothécènes de type B (TCTB), mycotoxines dont la toxicité est démontrée pour les animaux et pressentie chez l'homme. Dans le cadre d'études des effets de la modification des paramètres oxydatifs du milieu sur la biosynthèse de TCTB, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le milieu. La production de trichothécènes de type B (TCTB) par la souche *F.graminearum* CBS185.32 a été suivie en milieu GYEP supplémenté ou non avec différentes concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'affectant pas la croissance de *Fusarium* (inférieures ou égales à 1 mM). Après 5 jours de culture, une très forte diminution de la production de TCTB a pu être observée suggérant des effets spécifiques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur le métabolisme secondaire du champignon. Une production endogène de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fongique dont la cinétique semble suivre la production de TCTB a été mise en évidence. Les premières études de suivi de l'expression des gènes *tri5*, *tri6* et *tri10* semblent suggérer que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exerce partiellement son pouvoir inhibiteur via un mode de régulation transcriptionnel.

**Mot-clefs:** *Fusarium graminearum*, trichothécènes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Communication orale. Journées Jean Chevaugnon-Vie rencontres de  
phytopathologie/mycologie. Aussois, Savoie, France. 15-19 janvier 2006

**Production *in vitro* de DON et de 15-ADON par *Fusarium  
graminearum* : cinétiques d'expression de gènes *Tri* en conditions de  
stress oxydatif**

Nadia Ponts(1), Christian Barreau(1), Linda Harris(2), Thérèse Ouellet(2),  
Laetitia PinsonGadais(1), Audrey Saparno(2) et Florence RichardForget(1)

(1)INRA Centre de Bordeaux, UR1264 MycSA, 71 avenue Edouard Bourleaux, BP81, 33883 Villenave  
d'Ornon Cedex, France

(2)Agriculture and Agri-Food Canada, 960 avenue Carling, Ottawa (Ontario) K1A 0C6, CANADA

Les céréales et le maïs sont fréquemment contaminés par des trichothécènes B (TCTB), toxines fongiques produites par le microorganisme du genre *Fusarium*. La résistance de ces toxines à tous procédés de décontamination impose actuellement la prévention de leur biosynthèse au champ afin de limiter leur occurrence dans les denrées céréalieres.

Dans le cadre d'études des effets de la modification des paramètres oxydatifs du milieu sur la biosynthèse de TCTB, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de catalase dans le milieu : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> active la production de DON et de 15-ADON par la souche *F.graminearum* CBS185.32 tandis que l'ajout de catalase a pour effet de réduire cette production. Des cinétiques d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Tri101* – les gènes *Tri* sont les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes – en présence ou absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été réalisées par RT-PCR en temps réel. Les niveaux d'expression de ces six gènes *Tri* ont également été étudiés en présence de catalase. Il apparaît que l'activation de la production de toxines en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est associée à une augmentation de l'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6* et *Tri12* tandis que l'inhibition de la production de toxines en présence de catalase est quant à elle associée à une inhibition de l'expression des gènes *Tri4*, *Tri5* et *Tri101*. La signification biologique des modulations observées est discutée.

**Mots-clefs:** *Fusarium graminearum*, DON, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, stress oxydatif, gènes *Tri*









## Ponts N. 2005. Influence de Stress Oxydatifs sur la Biosynthèse de Mycotoxines par *Fusarium spp.* Contaminantes de l'Epi de Maïs

---

**Résumé :** *Fusarium* est un champignon responsable de la fusariose, maladie nécrosante observée chez de nombreuses céréales et le maïs. Certaines espèces fusariennes sont également productrices de mycotoxines, métabolites secondaires extrêmement stables dont les toxicités pour l'homme et les animaux sont largement décrites. Ces biosynthèses interviennent avant la récolte et entraînent la contamination des grains de céréales. A l'heure actuelle, il n'existe pas de procédé permettant d'éliminer les mycotoxines ni même de réduire leurs toxicités. Ainsi, limiter l'occurrence des mycotoxines sur les grains de céréales implique de limiter leurs productions au champ.

Parmi les facteurs susceptibles de moduler les productions de toxines par *Fusarium*, la nature du substrat, dans notre cas les composés du grain de maïs, pourrait être déterminante. De façon plus précise, les molécules pro ou anti-oxydantes impliquées dans les mécanismes de défense de la plante en réponse à l'attaque par un pathogène sont-elles susceptibles d'influencer la biosynthèse de mycotoxines ?

Le rôle central et ubiquitaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lors de la mise en place des mécanismes de défense de la plante nous a conduit à détailler les effets potentiels *in vitro* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la production de toxines de la famille des trichothécènes de type B (TCTB) par *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*. Les effets d'autres composés pro- ou anti-oxydants impliqués ou non dans les mécanismes de défense de la plante ont également été testés. Après une phase de mise au point méthodologique, l'ensemble de nos résultats a permis de mettre en évidence l'existence d'un lien important entre la biosynthèse de TCTB et le métabolisme oxydatif fongique. De plus, il semblerait que la nature de ce lien dépende du type de TCTB considéré. Une approche transcriptomique locale sur des gènes *Tri* a permis de conclure à l'implication de régulations transcriptionnelles dans les modulations de la production de TCTB en conditions de stress oxydatifs. Une approche transcriptomique globale devrait, à terme, permettre d'identifier des voies métaboliques liées à celle de la production de toxines.

**Mots-clefs :** *Fusarium graminearum* ; stress oxydatifs ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; trichothécènes ; deoxynivalenol ; mécanismes de défense

---

## Ponts N. 2005. Influence of Oxidative Stress on Mycotoxins Biosynthesis by *Fusarium spp.* Contaminants of the Corn Ear

---

**Abstract:** *Fusarium* is a fungus that causes tissue necrosis on many cereals and corn. Several species can also produce mycotoxins, very stable secondary metabolites which toxicities for human beings and animals are widely illustrated. These biosynthesis take place before harvest and lead to kernel contamination. Nowadays, no process exists that could allow neither to remove the toxins nor to reduce their toxicities. Therefore, limiting toxins occurrences in kernels implies limiting their production in the field, before harvest.

Among the factors liable to modulate toxins productions by *Fusarium*, the substrate composition, in our case corn kernel composition, could be decisive. More precisely, are pro- or anti-oxidant molecules involved in plant defence mechanisms against a pathogen attack likely to influence the biosynthesis of mycotoxins?

The central and ubiquitous role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when plant defence mechanisms are triggered led us to look in detail at possible effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the production of toxins that belong to the type B trichothecenes family (TCTB) by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. Effects of other pro- or anti-oxidant compounds, involved or not in plant defence mechanisms, were tested as well. After a period of methods adjustments, our results allowed us to observe a link between TCTB biosynthesis and the oxidative metabolism of the fungus. Furthermore, this link seems to be different depending on the type of TCTB that is considered. A local transcriptomic approach on *Tri* genes allowed us to conclude to transcriptional regulations occurring when situations of oxidative stress occur. Forward, a total transcriptomic approach should let us identify other metabolic pathways linked to toxins biosynthesis.

**Keywords:** *Fusarium graminearum*; oxidative stress; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; trichothecenes; deoxynivalenol; defence mechanisms