

N° d'ordre : 3478

## **THESE**

présentée à

### **L'UNIVERSITE BORDEAUX 1**

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

par

**Anne-Laure BOUTIGNY**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

DISCIPLINE : **BIOLOGIE, SPECIALITE ALIMENTATION & NUTRITION**

---

---

**Etude de l'effet de composés du grain de blé dur sur la régulation  
de la voie de biosynthèse des trichothécènes B : purification de  
composés inhibiteurs, analyse des mécanismes impliqués**

---

---

Soutenue le : 29 Novembre 2007

Après avis de :

- Mr LANGIN Thierry	Directeur de recherche Université Paris Sud	Rapporteur
- Mr TATOUT Christophe	Chef de projet Biogemma, Clermond Ferrand	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

- Mme CASSAND Pierrette	Professeur Bordeaux 1	Présidente
- Mr BARREAU Christian	Chargé de recherche CNRS	Directeur de thèse
- Mr NOEL Thierry	Professeur Bordeaux 2	Examineur
- Mme VERON-DELOR Guislaine	DRD ARVALIS Institut du Végétal	Examineur

*Le travail présenté ici a été réalisé au sein de l'Equipe des Mycotoxines de Fusarium, de l'Unité MycSA (Mycologie et Sécurité Alimentaire), à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Bordeaux. Ce travail a été effectué dans le cadre d'une convention CIFRE dont les partenaires étaient l'Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales (IRTAC) et l'Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT). Cette thèse fait partie du projet RARE Fusariotoxines 2003-2007.*

*Je remercie vivement Monsieur Jean-Marc Olivier, Directeur de l'Unité MycSA, Madame Florence Richard-Forget, Directrice Adjointe de l'Equipe des Mycotoxines de Fusarium et Monsieur Christian Barreau, Directeur de thèse, de m'avoir accueilli au sein de l'INRA. Je remercie également Madame Guislaine Veron-Delor, Directrice Générale de l'IRTAC.*

*Je remercie les membres du jury pour leur intérêt porté à ce travail, et tout particulièrement Monsieur Christophe Tatout, Chargé de projet à Biogemma et Monsieur Thierry Langin, Directeur de recherche à l'Université de Paris Sud, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Madame Pierrette Cassand, Professeur à l'Université de Bordeaux 1, pour avoir présidé le jury ainsi que les examinateurs de ce travail : Monsieur Thierry Noel, Professeur de l'Université de Bordeaux 2, Monsieur Christian Barreau, Directeur de thèse et Madame Guislaine Veron-Delor, DRD à Arvalis Institut du végétal.*

*Je remercie Madame Florence Richard-Forget et Monsieur Christian Barreau pour leurs enseignements divers, leurs conseils précieux, leurs encouragements, et leur sympathie tout au long de ces trois années.*

*Je remercie très sincèrement ma chère Vessela Atanassova-Pénichon pour sa sympathie et son aide précieuse, pour m'avoir fait découvrir les monomères, les dimères, les fragmentations MS<sup>2</sup> .... Je remercie chaleureusement Laëtitia Pinson-Gadais pour ses conseils en BM, sa maîtrise de power point et de photoshop ....*

*Je remercie bien sûr Gisèle Marchegay (notre Gisou), Christine Ducos, Françoise Turtaut et Marie-Noëlle Verdal-Bonnin. Je remercie les thésards que j'ai connus et tous les stagiaires qui m'ont aidé ou contribué à la bonne humeur dans les labos.*

*Enfin, je remercie toutes les personnes ayant contribué au bon déroulement de ce travail. La vie au sein de Qualis était bien agréable !*

## *Publications et Communications Scientifiques*

---

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

Boutigny A.L., Richard-Forget F. & Barreau C. **Natural mechanisms for cereal resistance to accumulation of *Fusarium* trichothecenes.** European Journal of Plant Pathology (Revue acceptée).

Boutigny A.L., Barreau C., Atanassova-Pénichon V., Verdal-Bonnin M.N., Pinson-Gadais L. & Richard-Forget F. **Ferulic acid, an efficient inhibitor of trichothecenes B biosynthesis and *Tri* genes expression in *Fusarium* liquid cultures.** International Journal of Food Microbiology (Article soumis pour publication).

Boutigny A.L., Atanassova-Pénichon V., Barreau C. & Richard-Forget F. **Phenolic acids naturally occurring in wheat bran are strong inhibitors of type B trichothecenes biosynthesis and *Tri* genes expression in *Fusarium* liquid cultures.** Applied and Environmental Microbiology (Article soumis pour publication).

### **Communications à des Congrès**

Boutigny A.-L., Deconzanet N., Ponts N., Pinson-Gadais L., Barreau C. & Richard-Forget F. **Communication orale** : Modulation of trichothecene B biosynthesis by *Fusarium spp* : Involvement of phenolic acids? Euro-Maghrebin Symposium, 7-9 Septembre 2005, Fez, Maroc.

Boutigny A.L., Atanassova-Pénichon V., Gros J., Barreau C. & Richard-Forget F. **Communication orale** : Analyse de facteurs biochimiques et des interactions moléculaires dans le processus de biosynthèse des TCT B. Recherche de facteurs de modulation des TCT B et analyse des mécanismes impliqués. Colloque Progrès et perspectives de la recherche sur les mycotoxines de *Fusarium* dans les cereals, 11-13 Septembre 2007, Arcachon, France.

## *Abréviations*

---

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADON	Acétyldéoxynivalenol
ACN	Acétonitrile
ARN	Acide ribonucléique
$a_w$	Activité thermodynamique de l'eau
DAD	Diode Array Detector
DiFA	Déhydrodimère d'acide férulique
DON	Déoxynivalenol
EC	European Commission
ECD	Electron Capture Detector
ESI	Electrospray ionisation
FPP	Farnésyl pyrophosphate
FX	Fusarenone X
GFP	Green Fluorescent Protein
GYEP	Glucose Yeast Extract Peptone
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
NIV	Nivalenol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
ppb	Parties par billion
ppm	Parties par million
QTL	Quantitative Trait Locus
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Rotation par minute
RT	Reverse Transcription
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCT	Trichothécène
TCT B	Trichothécène de type B

# Table des matières

---

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Contexte bibliographique</b>	<b>4</b>
<b>I. Contamination du blé dur par <i>Fusarium</i></b>	<b>5</b>
I. 1. Le blé	5
I. 2. La Fusariose	9
I. 3. Les trichothécènes	12
I. 4. Facteurs influençant les niveaux de mycotoxines produits	17
<b>II. Résistance des céréales à l'accumulation des mycotoxines de <i>Fusarium</i></b>	<b>23</b>
<b>III. Les acides phénoliques des parois et leurs rôles dans les mécanismes de résistance du blé</b>	<b>47</b>
<b>IV Présentation des objectifs et démarche expérimentale</b>	<b>54</b>
<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>57</b>
<b>I. Blé</b>	<b>58</b>
I. 1. Blé dur	58
I. 2. Blé tendre	58
<b>II. Fractionnement des sons de blé dur</b>	<b>58</b>
II. 1. Extraction des composés polaires des sons	58
II. 2. Fractionnement des composés de l'extrait polaire des sons	59
II. 2. 1. Chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel	59
II. 2. 2. Chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P2	60
II. 2. 3. Rassemblement des fractions	60
II. 2. 4. Calibration des gels	60
II. 2. 5. Test à la ninhydrine	60
<b>III. Culture <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i></b>	<b>61</b>
III. 1. Souches de <i>Fusarium</i>	61
III. 2. Préparation de l'inoculum	61

III. 3. Conditions de cultures <i>in vitro</i> .....	62
III. 3. 1. Milieux de culture .....	62
III. 3. 1. 1. Milieu GYEP .....	62
III. 3. 1. 2. Milieu synthétique pour mycotoxines .....	62
III. 3. 1. 3. Milieu MS tamponné .....	62
III. 3. 2. Systèmes de culture .....	62
III. 3. 2. 1. Cultures standard .....	62
III. 3. 2. 2. Mini cultures statiques .....	63
<b>IV. Méthodes analytiques</b> .....	<b>63</b>
IV. 1 Instrumentations et principes .....	63
IV. 2. Extraction et dosage des acides phénoliques .....	64
IV. 2. 1. Extraction des acides phénoliques solubles libres .....	64
IV. 2. 2. Extraction des acides phénoliques insolubles liés aux parois .....	64
IV. 2. 3. Analyse des acides phénoliques par HPLC-DAD .....	64
IV. 2. 4. Analyse par HPLC-MS/MS .....	65
IV. 3. Extraction et dosage de l'ergostérol .....	65
IV. 4. Extraction et dosage des TCT B .....	66
IV. 5. Extraction et dosage des caroténoïdes .....	67
IV. 6. Analyse des fractions des sons .....	68
IV. 6. 1. Analyse par HPLC-DAD .....	68
IV. 6. 2. Séparation et purification des composés par HPLC semi préparative .....	68
IV. 6. 3. Analyse des molécules candidates par HPLC-MS/MS .....	68
<b>V Supplémentation des cultures de <i>Fusarium</i></b> .....	<b>69</b>
V. 1. Supplémentation des cultures par les acides phénoliques .....	69
V. 1. 1. Acides phénoliques individuels .....	69
V. 1. 2. Acides phénoliques combinés .....	69
V. 1. 2. 1. Extraits naturels d'acides phénoliques .....	69
V. 1. 2. 2. Mélanges reconstitués d'acides phénoliques .....	70
V. 2. Supplémentation des cultures par les caroténoïdes .....	70
V. 2. 1. $\beta$ -carotène .....	70
V. 2. 2. Extraits naturels de caroténoïdes .....	70
V. 3. Supplémentation des cultures par le tryptophane .....	70
V. 4. Supplémentation des milieux avec les fractions des sons .....	71
<b>VI. Expression des résultats et analyses statistiques</b> .....	<b>71</b>
<b>VII. Analyse de l'expression des gènes</b> .....	<b>71</b>
VI. 1. Extraction des ARN totaux .....	71
VI. 2. Transcription inverse des ARN en ADNc .....	72

VI. 3. Analyse par PCR classique .....	72
VI. 4. Analyse par PCR quantitative .....	72
VI. 5. Analyse des résultats après PCR quantitative .....	73
<b>Résultats et Discussion</b> .....	<b>74</b>
<b>CHAPITRE I :</b> .....	<b>75</b>
<b>Recherche de conditions expérimentales adaptées pour l'étude <i>in vitro</i> de la régulation de la mycotoxinogénèse de <i>Fusarium</i></b>	
<b>I. 1. Préambule : non reproductibilité et non répétabilité des niveaux de productions de toxines en culture liquide sur milieu GYEP</b> .....	<b>77</b>
I. 1. 1. Fluctuations inter expérimentations du potentiel toxigène de <i>Fusarium</i> en cultures standard .....	77
I. 1. 2. Fluctuations intra expérimentations du potentiel toxigène de <i>Fusarium</i> en cultures standard .....	78
I. 1. 3. Nombre d'essai limité .....	81
I. 1. 4. Objectif et solutions proposées .....	82
<b>I. 2. Choix d'un dispositif de culture : mini cultures statiques</b> .....	<b>82</b>
<b>I. 3. Choix d'un milieu de culture : milieu synthétique pour mycotoxines</b> .....	<b>83</b>
I. 3. 1. Comparaison du potentiel toxigène de la souche INRA 349 en mini cultures liquides sur milieu MS et sur milieu GYEP .....	84
I. 3. 2. Comparaison du potentiel toxigène de 26 souches de <i>Fusarium</i> en mini cultures liquides sur milieu MS et sur milieu GYEP .....	85
I. 3. 3. Relation entre potentiel toxigène défini sur grains et potentiel toxigène défini en cultures liquides .....	87
I. 3. 4. Comparaison en milieu MS et en milieu GYEP des fluctuations du potentiel toxigène en mini culture liquides .....	88
I. 3. 4. 1. Souche INRA 349 : fluctuations sur neuf expérimentations .....	88
I. 3. 4. 2. Fluctuations sur deux ou trois expérimentations du potentiel toxigène de 17 souches de <i>Fusarium</i> .....	88
I. 3. 5. Conclusion sur le choix d'un milieu de culture .....	89

<b>I. 4. Expression de gènes clés impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes B dans nos conditions de culture</b>	<b>90</b>
I. 4. 1. Choix d'un gène de référence	90
I. 4. 2. Expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B au cours de la cinétique de production de TCT B par la <i>F. culmorum</i>	92
<b>I. 5. Effet du pH du milieu MS sur la biosynthèse de TCT B</b>	<b>93</b>
I. 5. 1. Principe de l'expérience	94
I. 5. 2. Effet du changement de pH sur la production de TCT B et sur l'expression du gène <i>Tri5</i>	94
<b>I. 6. Optimisation des conditions expérimentales : Conclusions</b>	<b>95</b>
 <b>CHAPITRE II :</b>	 <b>97</b>
<b>Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices <i>in vitro</i> de la biosynthèse des trichothécènes B par <i>Fusarium</i></b>	
 <b>II. 1. Effet des acides phénoliques individuels sur la mycotoxinogénèse</b>	 <b>99</b>
II. 1. 1. Effet de l'acide férulique	99
II. 1. 2. Effet d'autres acides phénoliques présents dans les sons	116
<b>II. 2. Cinétique de remplissage des grains de blé en acides phénoliques</b>	<b>121</b>
II. 2. 1. Contenu en TCT B et en ergostérol des grains matures des variétés Charger et Bizel contaminés à la floraison par <i>F. graminearum</i>	121
II. 2. 2. Contenu en acides phénoliques solubles libres au cours de la cinétique de remplissage des grains des variétés Charger et Bizel	122
II. 2. 3. Contenu en acides phénoliques insolubles liés aux parois au cours de la cinétique de remplissage des grains des variétés Charger et Bizel	123
II. 2. 4. Conclusion	124
<b>II. 3. Etude préliminaire de l'effet du <math>\beta</math>-carotène sur la mycotoxinogénèse</b>	<b>127</b>
II. 3. 1. Effet d'une gamme de concentration en $\beta$ -carotène sur la biosynthèse de toxines	127
II. 3. 2. Effet du $\beta$ -carotène sur la biosynthèse de toxines par plusieurs souches de <i>Fusarium</i>	128
<b>II. 4. Conclusions sur l'étude de molécules candidates</b>	<b>129</b>



**CHAPITRE III : \_\_\_\_\_ 132**

**Etude *in vitro* de l'effet d'extraits naturels d'acides phénoliques, issus des sons de blé dur, sur la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium***

**III. 1. Composition des sons de blé dur en acides phénoliques \_\_\_\_\_ 133**

III. 1. 1. Contenu en acides phénoliques libres solubles des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer ..... 133

III. 1. 2. Contenu en acides phénoliques insolubles liés des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer ..... 134

**III. 2. Effet d'extraits naturels d'acides phénoliques des sons de blé dur sur la mycotoxinogénèse \_\_\_\_\_ 135**

**III. 3. Extraits naturels de caroténoïdes : effet sur la mycotoxinogénèse ? \_\_\_\_\_ 154**

**III. 4. Extraits naturels d'acides phénoliques : Conclusions \_\_\_\_\_ 155**

**CHAPITRE IV : \_\_\_\_\_ 157**

**Purification et caractérisation de composés présents dans les sons de blé dur modulant la biosynthèse des TCT B**

**IV. 1. Purification à partir des sons de blé dur d'entités modulatrices de la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum* \_\_\_\_\_ 158**

IV. 1. 1. Séparation des composés solubles polaires et apolaires des sons de blé dur ..... 158

IV. 1. 2. Fractionnement de l'extrait polaire issu des sons de blé dur ..... 159

IV. 1. 2. 1. Démarche expérimentale ..... 159

IV. 1. 2. 2. Chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel :  
100 < domaine de fractionnement < 10 000 Da ..... 160

a. Profil chromatographique ..... 160

b. Effet des fractions F<sub>1</sub> à F<sub>11</sub> sur la mycotoxinogénèse ..... 161

c. Analyse des fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub> par HPLC-DAD ..... 162

IV. 1. 2. 3. Chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P-2 :  
100 < domaine de fractionnement < 1 800 Da ..... 162

a. Profil chromatographiques ..... 163

b. Effet des sous fractions F<sub>5-1</sub> à F<sub>5-5</sub> sur la mycotoxinogénèse ..... 163

c. Analyse des sous fractions par HPLC-DAD ..... 164

IV. 1. 2. 4. HPLC semi-préparative ..... 164

<b>IV. 2. Caractérisation par HPLC-MS/MS des entités candidates isolées des sons de la variété Orjaune</b>	<b>165</b>
IV. 2. 1. Caractérisation du composé présent dans le pic 1	165
IV. 2. 2. Caractérisation du composé présent dans le pic 2	165
IV. 2. 3. Caractérisation du composé présent dans le pic 3	167
<b>IV. 3. Effet des entités candidates isolées des sons de la variété Orjaune sur la mycotoxinogénèse</b>	<b>168</b>
IV. 3. 1. Effet du tryptophane, "molécule candidate"	168
IV. 3. 2. Effet des molécules purifiées après HPLC semi-préparative	168
<b>IV. 4. Effet du dimère d'acides phénoliques sur l'expression de certains gènes <i>Tri</i> impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B</b>	<b>169</b>
<b>IV. 5. Purification et identification de composés inhibiteurs présents dans les sons de blé dur : Conclusions</b>	<b>170</b>
<b>Discussion générale et Perspectives</b>	<b>172</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>186</b>

## *Table des illustrations*

---

### *Figures*

<b>Figure 1 :</b> Diverses espèces de blé. _____	5
<b>Figure 2 :</b> Morphologie du plant, de l'épi, de l'épillet et de la fleur du blé. _____	7
<b>Figure 3:</b> Coupe d'un grain de blé. _____	7
<b>Figure 4 :</b> Types de fusariose. _____	9
<b>Figure 5 :</b> <i>Fusarium</i> Head Blight sur blé. _____	9
<b>Figure 6 :</b> Grains de blé sains et fusariés. _____	9
<b>Figure 7 :</b> Spores de <i>F.avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> et <i>F. poae</i> . _____	10
<b>Figure 8:</b> Représentation schématique des espèces fusariennes présentes sur blé en Europe ces dernières années. _____	10
<b>Figure 9 :</b> Les résidus de culture antérieure infectée constituent la principale source d'inoculum de la fusariose. _____	11
<b>Figure 10 :</b> Représentation schématique des espèces fusariennes présentes sur blé en Europe ces dernières années et leurs toxines associées. _____	11
<b>Figure 11 :</b> Structure chimique de cinq trichothécènes de type B. _____	12
<b>Figure 12 :</b> Teneurs maximales autorisées pour le déoxynivalénol dans les denrées alimentaires à destination humaine (règlementation n°856/2005 du 6 Juin 2005). _____	15
<b>Figure 13 :</b> Représentation schématique de la voie des isoprénoïdes conduisant à la biosynthèse de farnésyl pyrophosphate (FPP). _____	15
<b>Figure 14 :</b> Structure des régions génomiques contenant les gènes <i>Tri</i> connus. _____	16
<b>Figure 15 :</b> Voie de biosynthèse des trichothécènes et gènes <i>Tri</i> impliqués. _____	16
<b>Figure 16 :</b> Grille agronomique du risque DON en blés (Syngenta). _____	20
<b>Figure 17 :</b> Voie de biosynthèse des acides phénoliques chez <i>Arabidopsis thaliana</i> . _____	47
<b>Figure 18 :</b> Complexe entre l'acide férulique et les polysaccharides de la paroi des céréales _____	48
<b>Figure 19 :</b> Exemples de dimères d'acide férulique. _____	48
<b>Figure 20 :</b> Les acides phénoliques des parois cellulaires lient les chaînes de polysaccharides entre elles et avec les autres composés des parois, incluant la lignine. _____	49

<b>Figure 21 :</b> Niveaux de contamination des grains en TCT B de 15 variétés de blé dur inoculées artificiellement avec une souche de <i>F. culmorum</i> productrice de nivalenol. _____	54
<b>Figure 22 :</b> Démarche expérimentale suivie au cours de l'étude <i>in vitro</i> de l'effet de molécules candidates sur la biosynthèse des trichothécènes B par <i>Fusarium</i> . _____	55
<b>Figure 23 :</b> Démarche expérimentale suivie au cours du fractionnement des sons pour l'identification de molécules actives ayant un effet modulateur de la biosynthèse de toxines par <i>Fusarium</i> . _____	56
<b>Figure 24 :</b> Etapes de transcription inverse. _____	72
<b>Figure 25 :</b> Etapes des amplifications de PCR quantitative. _____	73
<b>Figure 26 :</b> Illustration des développements morphologiques différents du mycélium en fonction des fioles Erlenmeyer. _____	80
<b>Figure 27 :</b> Illustration du nombre d'essai limité en cultures standard. _____	81
<b>Figure 28 :</b> Mini culture de 14 jours de la souche de <i>F. graminearum</i> INRA 349. _____	82
<b>Figure 29 :</b> Comparaison des conditions agité et statique en mini cultures GYEP. _____	83
<b>Figure 30 :</b> Cinétique de croissance du mycélium (a) et de production de TCT B (b) par la souche INRA 349 cultivée sur milieu GYEP et sur milieu MS. _____	84
<b>Figure 31 :</b> Evolution du pH au cours des mini culture statique de la souche INRA 349 sur milieu GYEP et sur milieu MS. _____	84
<b>Figure 32 :</b> Croissance de 26 souches de <i>Fusarium</i> cultivées pendant 10 jours en mini culture statique sur milieu GYEP et sur milieu MS. _____	85
<b>Figure 33 :</b> Niveaux d'expression relatif des gènes <i>Ef2</i> , <i><math>\beta</math>tub</i> , <i>Gapdh</i> et <i>L15</i> à 3, 4 et 5 jours de culture de la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 et niveaux de biomasse sèche produite. _____	91
<b>Figure 34 :</b> Evaluation sur gel d'agarose des produits obtenus après PCR pour les gènes <i>Ef2</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri4</i> , <i>Tri11</i> , <i>Tri101</i> , <i>Tri6</i> , <i>Tri10</i> , <i>Tri12</i> et <i>Fpps</i> à 3, 4 et 5 jours de culture de la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117. _____	92
<b>Figure 35 :</b> Niveaux d'expression relatif des gènes <i>Tri5</i> , <i>Tri4</i> , <i>Tri11</i> , <i>Tri101</i> , <i>Tri6</i> , <i>Tri10</i> , <i>Tri12</i> et <i>Fpps</i> et niveaux de TCT B produits. _____	92
<b>Figure 36 :</b> Principe de l'expérience menée au cours de l'étude de l'effet du changement de pH sur la biosynthèse de TCT B. _____	93
<b>Figure 37 :</b> Effet du changement de pH sur la production de TCT B et sur l'expression des gènes $\beta$ -tub et <i>Tri5</i> . _____	94
<b>Figure 38 :</b> Démarche expérimentale suivie au cours de l'étude sur "la recherche de conditions expérimentales adaptées pour l'étude <i>in vitro</i> de la régulation de la mycotoxinogénèse de <i>Fusarium</i> ". _____	95

<b>Figure 39 :</b> Effet d'une gamme de concentration en acide férulique sur la production de biomasse sèche et sur les niveaux de TCT B produits par la souche INRA 319 cultivée sur milieu MS. _____	114
<b>Figure 40 :</b> Niveaux relatifs de TCT B produits par les souches de <i>F. culmorum</i> INRA 117 (a) et INRA 319 (b) sur milieu MS supplémenté ou non avec différents acides phénoliques. _____	116
<b>Figure 41 :</b> Structures chimiques des acides phénoliques de l'étude. _____	118
<b>Figure 42 :</b> Relation entre le potentiel antioxydant des acides phénoliques et leur effet sur la biosynthèse de toxines par la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 cultivée en milieu MS. __	119
<b>Figure 43 :</b> Relation entre la lipophilicité des acides phénoliques et leur effet sur la biosynthèse de toxines par la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 cultivée en milieu MS. __	119
<b>Figure 44 :</b> Effet des acides phénoliques "inhibiteurs" sur la biosynthèse de TCT B par les souches de <i>F. culmorum</i> INRA 233, INRA 124, INRA 130 et INRA 132. _____	120
<b>Figure 45 :</b> Effet des acides phénoliques "activateurs" sur la biosynthèse de TCT B par les souches de <i>F. culmorum</i> INRA 233, INRA 124, INRA 130 et INRA 132. _____	121
<b>Figure 46 :</b> Niveaux de TCT B et contenu en ergostérol des grains de blé matures des variétés Charger et Bizel contaminés à la floraison. _____	122
<b>Figure 47 :</b> Contenus en acides phénoliques solubles libres des grains des variétés Charger et Bizel au stade 10-12 jours, 20 jours et 30 jours après floraison. _____	122
<b>Figure 48 :</b> Contenus en acides phénoliques solubles libres dans les grains matures des variétés Charger et Bizel sain ou contaminé à la floraison. _____	123
<b>Figure 49 :</b> Contenus en acides phénoliques insolubles liés des grains des variétés Charger et Bizel au stade 10-12 jours, 20 jours et 30 jours après floraison. _____	123
<b>Figure 50 :</b> Contenus en acides phénoliques insolubles liés dans les grains matures des variétés Charger et Bizel sain ou contaminé à la floraison. _____	124
<b>Figure 51 :</b> Contenus en acides phénoliques insolubles liés des grains des variétés Charger, Shango, Renan et Bizel au stade 10-12 jours après floraison et sensibilité à la fusariose. __	125
<b>Figure 52 :</b> Contenus en acides phénoliques solubles libres des grains matures des variétés Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumaï 3 sain ou contaminé à la floraison. _____	125
<b>Figure 53 :</b> Contenu en acides phénoliques insolubles liés des grains matures des variétés Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumaï 3 sain ou contaminé à la floraison. _____	126
<b>Figure 54 :</b> Effet d'une gamme de concentration en $\beta$ -carotène sur la biosynthèse de TCT B par les souches de <i>F. culmorum</i> INRA 117 (a) et INRA 319 (b) cultivées sur milieu MS. __	127

<b>Figure 55 :</b> Effet du $\beta$ -carotène à 50 $\mu\text{g/mL}$ sur la biosynthèse de TCT B par différentes souches <i>Fusarium</i> cultivées sur milieu MS. _____	128
<b>Figure 56 :</b> Niveaux d'expression relatif des gènes <i><math>\beta\text{tub}</math></i> (a), <i>L15</i> (b), <i>Ef2</i> (c) et <i>Gapdh</i> (d) au 3 <sup>ème</sup> , 4 <sup>ème</sup> et 5 <sup>ème</sup> jour de croissance de la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 en cultures témoin et traitées avec l'extrait naturel d'acides phénoliques. _____	151
<b>Figure 57 :</b> Profils chromatographiques à 280 nm des extraits naturels Nefer et Orjaune obtenus par HPLC-DAD. _____	153
<b>Figure 58 :</b> Profil chromatographique à 450 nm du contenu en caroténoïdes des sons de blé dur de la variété Orjaune après analyse par HPLC-DAD. _____	154
<b>Figure 59 :</b> Effet des extraits naturels (EN) de caroténoïdes issus des sons de la variété Orjaune ainsi que de l'extrait dilué 5 fois vis-à-vis de la biosynthèse de toxines par les souches de <i>F. culmorum</i> . INRA 117 (a) et INRA 319 (b). _____	155
<b>Figure 60 :</b> Effet de l'extrait polaire ( $F_{\text{MeOH/eau}}$ ) issu des sons de blé dur de la variété Orjaune sur la biosynthèse des TCT B par la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 cultivée sur milieu MS. _____	159
<b>Figure 61 :</b> Représentation schématique de la démarche expérimentale menée au cours de la recherche d'entités inhibitrices de la mycotoxinogénèse à partir des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer. _____	159
<b>Figure 62 :</b> Profils chromatographiques obtenus après chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel de l'extrait polaire issu des sons de la variété Orjaune. _____	160
<b>Figure 63 :</b> Effet des fractions $F_1$ à $F_{11}$ sur la biosynthèse des TCT B par la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 cultivée sur milieu MS. _____	161
<b>Figure 64 :</b> Effet des fractions $F_5$ et $F_8$ , issues du fractionnement des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer, sur la biosynthèse des TCT B par la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 cultivée sur milieu MS. _____	162
<b>Figure 65 :</b> Profils chromatographiques obtenus après chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P2 de la fraction $F_5$ issu du fractionnement de l'extrait polaire des sons de la variété Orjaune. _____	162
<b>Figure 66 :</b> Effet des sous fractions $F_{5-1}$ à $F_{5-5}$ , issues des fractionnements des sons des variétés Orjaune (a) et Nefer (b), sur la biosynthèse des TCT B par la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 cultivée sur milieu MS. _____	164
<b>Figure 67 :</b> Profil chromatographique obtenu après analyse par HPLC-DAD de la sous fraction $F_{5-3}$ issue des sons de la variété Orjaune. _____	164

<b>Figure 68</b> : Spectre UV (a) et spectre de masse en mode d'ionisation positif (b) du composé correspondant au pic 1. _____	165
<b>Figure 69</b> : Spectre UV (a) et spectre de masse en mode d'ionisation négatif (b) du composé correspondant au pic 2. _____	165
<b>Figure 70</b> : Spectres de fragmentation MS <sup>2</sup> de la molécule de masse 414 en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b). _____	166
<b>Figure 71</b> : Dimères d'acide férulique du blé. _____	167
<b>Figure 72</b> : Dimères d'ester méthylique de l'acide férulique obtenus après synthèse chimique. _____	167
<b>Figure 73</b> : Spectre UV-VIS du composé correspondant au pic 3 (a) et spectre de fragmentation MS <sup>2</sup> de l'ion à <i>m/z</i> 385 en mode d'ionisation positif (b). _____	167
<b>Figure 74</b> : Production de biomasse sèche et biosynthèse de TCT B par la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 cultivée sur milieu MS supplémenté ou non par différentes concentrations en tryptophane. _____	168
<b>Figure 75</b> : Effet des composés correspondant aux pics 1, 2 et 3 sur la biosynthèse des TCT B par la souche de <i>F. culmorum</i> INRA 117 cultivée sur milieu MS. _____	169
<b>Figure 76</b> : Evaluation sur gel d'agarose des produits obtenus après PCR pour les gènes <i>Gapdh</i> , <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri6</i> , <i>Tri10</i> , <i>Tri12</i> et <i>Tri101</i> en condition témoin et en condition de cultures supplémentées par le dimère d'acides phénoliques. _____	169
<b>Figure 77</b> : Voie hypothétique de régulation des trichothécènes par le pH chez <i>F. graminearum</i> . _____	175

## ***Tableaux***

<b>Tableau 1</b> : Fonctions des gènes <i>Tri</i> impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes. _____	17
<b>Tableau 2</b> : Note de sensibilité à <i>Fusarium</i> , dates de floraison et dates de récolte des épis de blé tendre des variétés Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumai 3. _____	58
<b>Tableau 3</b> : Paramètres des chromatographies d'exclusion. _____	59
<b>Tableau 4</b> : Souches de <i>Fusarium</i> utilisées au cours de l'étude : code INRA, espèce, chémotype et potentiel toxigène défini sur grains. _____	61
<b>Tableau 5</b> : Composition des milieux MS tamponnés à pH 6,5 et à pH 3. _____	62

<b>Tableau 6 :</b> Paramètres des différentes méthodes chromatographiques utilisées au cours de l'étude. _____	63
<b>Tableau 7 :</b> Caractéristiques des composés phénoliques séparés par la méthode d'analyse HPLC mise au point au cours de l'étude. _____	65
<b>Tableau 8 :</b> Composition du tampon de charge à ARN. _____	71
<b>Tableau 9 :</b> Amorces utilisées pour amplifier les gènes <i>Ef2</i> , <i>βtub</i> , <i>Gapdh</i> , <i>L15</i> , <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri11</i> , <i>Tri12</i> , <i>Tri101</i> , <i>Tri6</i> , <i>Tri10</i> et <i>Fpps</i> par RT-PCR. _____	72
<b>Tableau 10 :</b> Illustration des fluctuations inter expérimentation du potentiel toxigène en cultures standard. _____	77
<b>Tableau 11 :</b> Illustration des fluctuations intra expérimentation du potentiel toxigène en cultures standard. _____	78
<b>Tableau 12 :</b> Surface des pics de DON, de 15-ADON et de l'extrapic X1 en fonction des fioles Erlenmeyer. _____	81
<b>Tableau 13 :</b> Potentiel toxigène en mini cultures liquides sur milieu MS et GYEP et potentiel toxigène sur grains de 26 souches de <i>Fusarium</i> . _____	86
<b>Tableau 14 :</b> Fluctuations inter expérimentations des niveaux de TCT B produits par la souche INRA 349 en mini cultures statiques sur milieu GYEP et MS. _____	88
<b>Tableau 15 :</b> Fluctuations inter expérimentations des niveaux de TCT B produits par 17souches de <i>Fusarium</i> en mini cultures statiques sur milieu GYEP et MS. _____	89
<b>Tableau 16 :</b> Potentiel antioxydant et lipophilicité des acides phénoliques de l'étude. _____	118
<b>Tableau 17 :</b> Bilan des effets observés sur la production de TCT B par les différentes souches de <i>F. culmorum</i> . _____	129
<b>Tableau 18 :</b> Contenu en acides phénoliques solubles libres des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer. _____	133
<b>Tableau 19 :</b> Contenu en acides phénoliques insolubles liés des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer. _____	134
<b>Tableau 20 :</b> Effets des extraits naturels et reconstitués et des extraits naturels dilué 5 fois de Nefer sur la biosynthèse des toxines par les souches de <i>F. culmorum</i> INRA 117 et INRA 319 cultivées sur milieu MS. _____	153
<b>Tableau 21 :</b> Surfaces des pics correspondant aux différents oligomères d'acide férulique dans les extraits Orjaune et Nefer. _____	154
<b>Tableau 22 :</b> Bilan du fractionnement par chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel de l'extrait polaire issu des sons de la variété Orjaune. _____	160



<b>Tableau 23 :</b> Quantités de chaque fraction, F <sub>1</sub> à F <sub>11</sub> , supplémentées aux milieux de culture pour l'étude de l'effet des fractions sur la mycotoxinogénèse. _____	161
<b>Tableau 24 :</b> Bilan du fractionnement par chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P2 des fractions F <sub>5</sub> issues du fractionnement des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer. _____	163
<b>Tableau 25 :</b> Quantités de chaque sous fraction, F <sub>5-1</sub> à F <sub>5-5</sub> , supplémentées aux milieux de culture pour l'étude de l'effet des sous fractions sur la mycotoxinogénèse. _____	163
<b>Tableau 26 :</b> Caractéristiques et fragments obtenus pour le composé du pic 1 en mode d'ionisation positif. _____	165
<b>Tableau 27 :</b> Caractéristiques et fragments obtenus pour le composé du pic 2 en mode d'ionisation positif. _____	166
<b>Tableau 28 :</b> Caractéristiques et fragments obtenus pour le composé du pic 3 en mode d'ionisation positif. _____	168

## Introduction générale



Le blé constitue une céréale d'importance primordiale à travers le monde, d'un point de vue économique et en tant que denrées alimentaires pour l'homme. Les champignons pathogènes du genre *Fusarium* sont responsables de contaminations majeures des blés induisant la fusariose. La fusariose entraîne des pertes dramatiques des productions céréalières ainsi qu'une détérioration de la qualité des grains. *Fusarium* est aussi connu pour la capacité qu'ont certaines espèces fusariennes à produire des mycotoxines, métabolites secondaires dont la toxicité pour l'homme, les animaux et les plantes est avérée. La contamination des grains en mycotoxines peut les rendre impropre à la consommation et soulève un réel problème de santé publique.

La réglementation européenne s'est précisée en 2005 en matière de fusariotoxines (mycotoxines de *Fusarium*) sur les céréales et leurs produits dérivés (règlement n°856/2005 du 6 Juin 2005, modification votée par le CPCASA le 20/07/07, en vigueur le 01/10/07) et des teneurs maximales autorisées ont été fixées. Par conséquent, afin de limiter la présence des fusariotoxines dans les céréales et leurs produits dérivés, les processus de décontamination et de transformation alimentaires n'étant pas efficace, leur biosynthèse doit impérativement être réduite au champ.

Au champ, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer les niveaux de contamination des grains en fusariotoxines, notamment les facteurs climatiques, les pratiques culturales, la présence d'inoculum et sa dispersion et le substrat (facteur variétal). L'utilisation de variétés résistantes à la fusariose pourrait constituer une stratégie de lutte contre l'accumulation de mycotoxines dans les grains. Cependant, chez le blé dur, il n'existe pas de variétés résistantes à la fusariose. De plus, la présence de symptômes de fusariose et les niveaux de contamination des grains en mycotoxines ne sont pas toujours corrélés. L'absence de symptômes de fusariose ne traduit pas forcément l'absence de mycotoxines dans les grains. Une autre stratégie consiste à rechercher des variétés résistantes à l'accumulation de mycotoxines.

L'existence de sensibilités différentes à l'accumulation de mycotoxines au sein des variétés de blé dur disponibles est connue. La résistance à l'accumulation de mycotoxines chez certaines variétés pourrait résulter de processus naturels qui permettraient de limiter l'accumulation des mycotoxines dans les grains. Ces processus naturels pourraient être d'une

part la transformation métabolique des mycotoxines aboutissant à leur "détoxification" ou d'autre part l'inhibition de la biosynthèse des mycotoxines par des composés endogènes des grains. La glycosylation, qui permet une détoxification des mycotoxines, est un processus qui existe naturellement chez certaines variétés de blé. Notre travail s'inscrit dans l'inhibition de la biosynthèse des mycotoxines par des composés naturels des grains en tant que processus naturel permettant de limiter l'accumulation de toxines dans les grains de certaines variétés de blé.

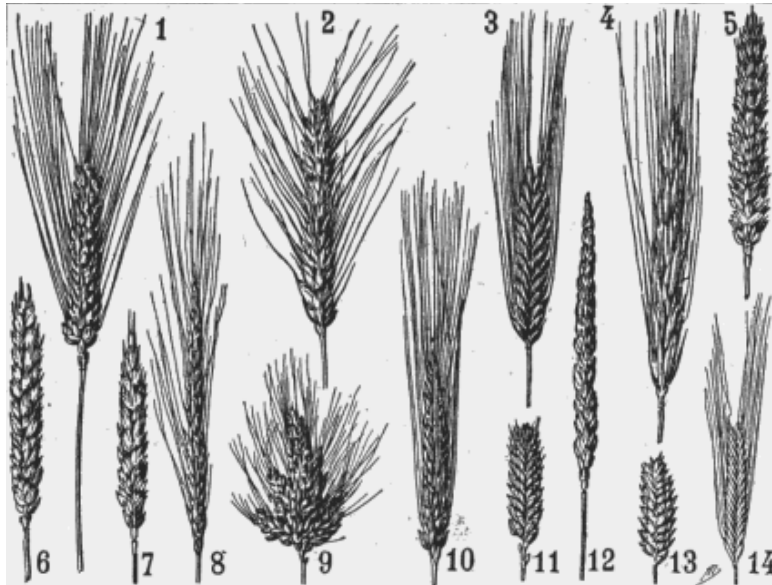
Dans ce contexte, le but de cette thèse est de rechercher des composés modulateurs de la biosynthèse de mycotoxines par *Fusarium* dans les grains de blé dur et d'analyser les mécanismes impliqués dans cette modulation. L'identification de tels composés pourrait permettre de sélectionner des variétés pour leur composition plus ou moins riches en composés modulateurs de la mycotoxinogénèse.

Afin d'identifier des composés modulateurs de la mycotoxinogénèse dans les grains de blé dur, deux stratégies ont été menées. La première stratégie a consisté en l'étude *in vitro* de molécules candidates, présentes dans les grains, pour leur pouvoir modulateur vis-à-vis de la biosynthèse des toxines par *Fusarium*. Et, la deuxième stratégie menée a consisté en un fractionnement des sons de blé dur jusqu'à caractérisation d'une ou plusieurs molécules actives modulant la mycotoxinogénèse.

Avant la présentation des résultats obtenus, le contexte bibliographique concernant la contamination du blé par *Fusarium* et ses mycotoxines, les mécanismes naturels des céréales limitant l'accumulation de mycotoxines dans les grains et le rôle des acides phénoliques dans les mécanismes de résistance sera décrit. Les objectifs de la thèse et la démarche expérimentale suivie seront ensuite présentés. Les chapitres suivants exposent les résultats obtenus. Une discussion générale et des perspectives concluent le manuscrit.

## **Contexte bibliographique**





- 1) Blé Nonette de Lausanne
- 2) Blé d'automne rouge
- 3) Amidonnier noir
- 4) Blé de pologne
- 5) Blé Victoria d'automne
- 6) Blé Blanc de Flandre
- 7) Blé Richelle de Naples
- 8) Épeautre blanc barbu
- 9) Blé Miracle
- 10) Blé Poulard blanc lisse
- 11) Blé Carré de Sicile
- 12) Épeautre blanc sans barbe
- 13) Blé du Chili
- 14) Engrain

**Figure 1 : Diverses espèces de blé.**

source : <http://fr.ekopedia.org/Bl%C3%A9>

## I. Contamination du blé dur par *Fusarium*

### I. 1. Le blé

#### I. 1. 1. Généralités

Le blé est, dans la civilisation occidentale et au Moyen-Orient, un composant central de l'alimentation humaine. Il a été domestiqué au Proche-Orient à partir d'une graminée sauvage il y a environ 10000 ans. Sa consommation remonte à la plus haute Antiquité. Les premières cultures apparaissent au VIII<sup>e</sup> siècle av. J.-C., en Mésopotamie et dans les vallées du Tigre et de l'Euphrate (aujourd'hui l'Irak), dans la région du "croissant fertile" (actuels Liban, Syrie, Sud de la Turquie) où subsistent à ce jour des blés sauvages.

Le blé est une plante annuelle herbacée, monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des graminées. Plusieurs espèces de blé existent (figure 1). Aujourd'hui, deux espèces dominent la production, il s'agit du blé tendre (*Triticum aestivum*) et du blé dur (*Triticum durum*). La production de blé est facile car il s'adapte à des sols et des climats variés. L'existence de variétés adaptées à différents milieux et résistantes à de nombreuses maladies permet de cultiver le blé dans de nombreux pays. Il existe des blés d'hiver et des blés de printemps, leurs périodes de plantation et de récoltes dans l'année sont différentes. Plus de vingt mille variétés de blé existent et des centaines de nouvelles sont créées chaque année (source : <http://www.unctad.org/infocomm/francais/ble/descript.htm>).

Le blé est principalement utilisé pour la fabrication de pain et de pâtes. Toutefois, le blé possède d'autres applications en industrie agro-alimentaire qui utilise les farines ou les semoules comme matières premières, par exemple la pâtisserie et la viennoiserie. Les dérivés céréaliers entrent aussi dans la composition de nombreux produits non alimentaires tels les médicaments, les papiers, les textiles, les colles, les lessives, les peintures, les plastiques, et maintenant les biocarburants (les "carburants verts").

La qualité technologique d'un blé dépend de sa dureté et de sa composition en protéines et en amidon. Les professionnels séparent en général deux grands types de blé selon leur degré de vitrosité. Le blé dur se différencie du blé tendre par son grain à albumen vitreux avec une amande dure et sa plus forte teneur en protéines. Le blé dur est tétraploïde avec un équipement chromosomique  $4n=28$  chromosomes alors que le blé tendre est hexaploïde, avec  $6n=42$  chromosomes (Feillet, 2000). Plus sensible au froid que le blé tendre, le blé dur est

cultivé dans des zones du monde relativement restreintes et caractérisées par une faible pluviométrie et des sols pauvres. Sa culture est développée autour du bassin méditerranéen et dans les pays de climat tempéré chaud, comme l'Australie et l'Argentine notamment. Cette plante n'est connue qu'à l'état cultivé. Le blé dur est un blé non panifiable. Il est généralement cultivé pour la production de semoule et la fabrication de pâtes alimentaires.

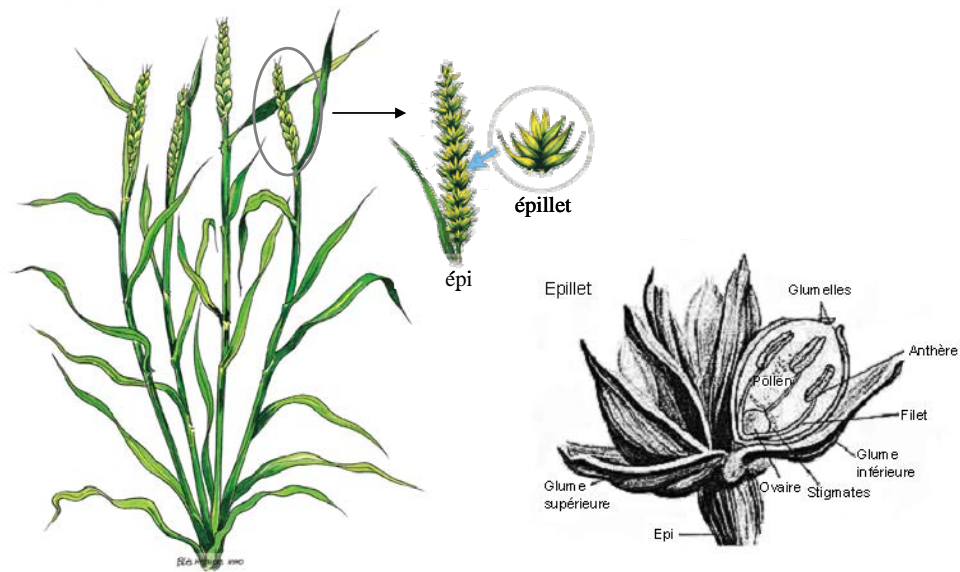
### **I. 1. 2. Importance économique**

Le blé fait partie des trois grandes "céréales" avec le maïs et le riz. C'est, avec environ 600 millions de tonnes annuelles, la troisième par l'importance de la récolte mondiale, et, avec le riz, la plus consommée par l'homme. La production mondiale de blé a presque triplé en l'espace de 44 ans, passant ainsi de 222 millions de tonnes en 1961 à plus de 626 millions de tonnes en 2005. Début juillet 2007, les prévisions de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) établissaient la production mondiale de blé en 2007 à 619 millions de tonnes (source : <http://www.fao.org/docrep/010/ah868f/ah868f04.htm>). Si l'on se réfère aux études et aux projections publiées par la FAO qui prennent en compte le développement démographique mondial, les besoins devraient encore s'accroître dans les années à venir, pour atteindre sans doute 1000 millions de tonnes de blé en 2020 (source : <http://www.unctad.org/infocomm/francais/ble/plan.htm>).

L'union européenne a enregistré une grande progression de son offre en terme de volume passant ainsi de 35 millions de tonnes en 1961 à environ 108 millions de tonnes en 2006. En Europe, cinq pays ont contribué pour plus des quatre cinquièmes de la production entre 1961 et 2005. Ce sont respectivement : la France (24,8 millions de tonnes soit 34,5% de l'offre européenne), l'Allemagne (13,4 millions de tonnes soit 18,6% de l'offre européenne), le Royaume-Uni (9,7 millions de tonnes soit 13% de l'offre européenne), l'Italie (8,6 millions de tonnes soit 11,9% de l'offre européenne) et l'Espagne (4,9 millions de tonnes soit 6,9% de l'offre européenne) (source : <http://www.unctad.org/infocomm/francais/ble/plan.htm>). La France est donc le premier producteur de blé européen et elle exporte 50% de sa récolte dans près d'une centaine de pays.

Le cours du blé a augmenté en 2007, la consommation dépassant la production. Une accumulation de facteurs, tels les facteurs climatiques, la diminution des stocks, les mauvaises productions, ..., sont à l'origine de cette "flambée" des prix du blé sur le marché mondial actuellement.



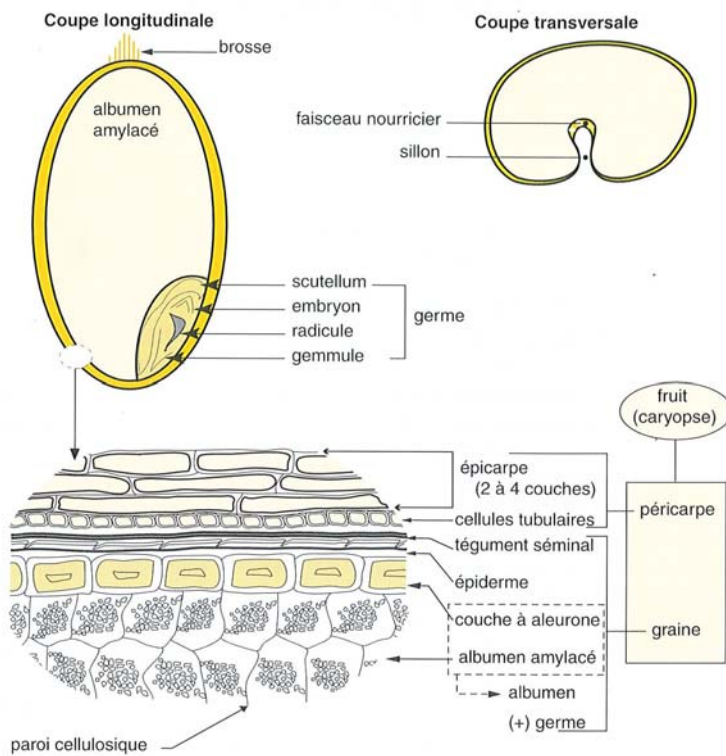


**Figure 2 : Morphologie du plant, de l'épi, de l'épillet et de la fleur du blé.**

source : [http://www.hyno.com/ble\\_hybride/cadre\\_navigation.asp?rub=infotheque](http://www.hyno.com/ble_hybride/cadre_navigation.asp?rub=infotheque),

<http://www.unctad.org/infocomm/francais/ble/culture.htm>,

<http://www.anthropologieenligne.com/pages/05/5.2.html>



**Figure 3 : Coupe d'un grain de blé (Feillet, 2000).**

### I. 1. 3. Morphologie et biologie

Les blés sont des plantes à feuilles alternes, formées d'une tige (chaume) portant un épi constitué de deux rangées d'épillets sessiles et aplatis (figure 2). A l'extrémité des chaumes, les épillets sont constitués de fleurs petites et peu visibles. Les fleurs sont dépourvues de pétales et entourées de deux glumelles. Chaque fleur contient trois étamines et un ovaire surmonté de deux styles plumeux. La fleur du blé est dite cléistogame, c'est-à-dire que, le plus souvent, le pollen est libéré avant que les étamines ne sortent de la fleur. Il s'attache alors aux stigmates, où peut se produire la fécondation. L'autofécondation constitue donc le mode de reproduction le plus fréquent chez les blés. Après fécondation, l'ovaire donnera le grain de blé. Dans le cas du blé, le grain est à la fois le fruit et la graine. Les enveloppes du fruit sont soudées à celles de la graine, on appelle ce type de fruit un caryopse.

Le grain de blé comporte trois parties distinctes (Feillet, 2000) : (figure 3)

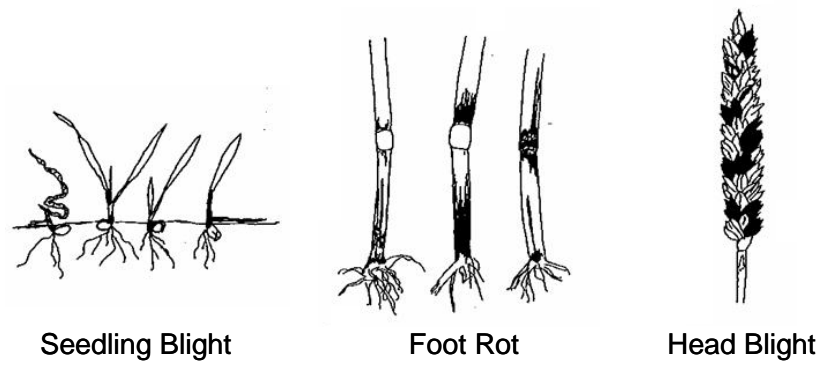
- **L'albumen** (80 à 85% du grain), constitué de l'albumen amylicé (au sein duquel subsistent des cellules remplies de granules d'amidon dispersés au milieu d'une matrice protéique) et de la couche à aleurone. C'est l'albumen qui donnera la farine.
- **Les enveloppes** de la graine et du fruit (13 à 17% du grain), constituées de six tissus différents : épiderme du nucelle, tégument séminal ou testa (enveloppe de la graine), cellules tubulaires, cellules croisées, mésocarpe et épicarpe. Les enveloppes sont éliminées pendant la mouture et deviennent les sons.
- **Le germe** (3% du grain), composé d'un embryon (lui-même formé du coléoptile, de la gemmule, de la radicule, du coléorhize et de la coiffe) et du scutellum. Il est éliminé à la mouture pour éviter le rancissement et augmenter la durée de conservation.

Le grain est principalement constitué d'amidon (environ 70%), de protéines (10 à 15%) et de pentosanes (8 à 10%) et contient aussi en faibles quantités des lipides, de la cellulose, des sucres libres, des minéraux et des vitamines (Feillet, 2000). Les sons de blé sont constitués principalement de polysaccharides, incluant des arabinoxylanes, des xyloglucanes et de la cellulose, mais contiennent aussi des quantités significatives d'acides phénoliques, de lignine et de protéines (Parker *et al.*, 2005).

#### I. 1. 4. Pathologies

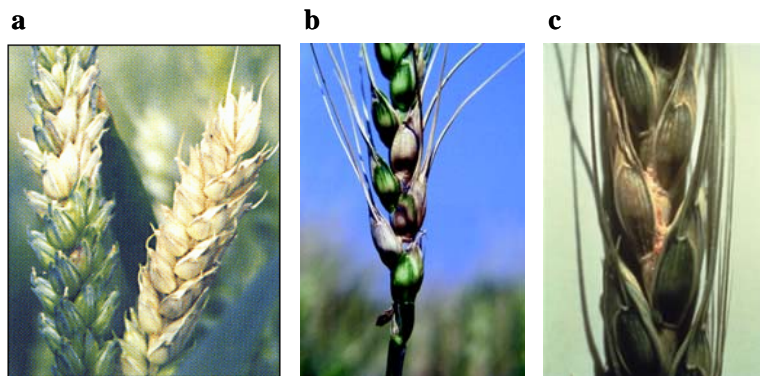
Un grand nombre de ravageurs du blé, incluant par exemple des limaces, des pucerons, des nématodes, des cécidomyies, des larves de tipules, peuvent avoir un impact plus ou moins important sur le rendement et la qualité des récoltes. Par exemple, la jaunisse nanisante de l'orge (J.N.O), qui peut également affecter le blé, est une maladie véhiculée par des pucerons, entraînant des anomalies des parties aériennes de la plante (au niveau de l'épi) ainsi que des malformations des grains. Les zabres sont des insectes dangereux à tous les stades de leur développement ; la larve remonte de la terre pendant la nuit et dévore les parties inférieures et tendres du pied de blé ; les adultes s'attaquent aux grains et peuvent causer de grandes pertes de production. Des ravageurs des récoltes stockées existent également, l'un des principaux exemples étant le charançon dont les larves rongent les grains. En plus des pertes de rendement, les insectes causent des blessures qui favorisent les infections fongiques (Sutton, 1982).

De nombreuses maladies fongiques peuvent attaquer les différents organes du blé, à différents stades de son développement. On peut citer par exemple le piétin verse et le piétin échaudage (agent causal : *Gaeumannomyces graminis*), les septorioses (agents causal : *Septoria tritici*, *Septoria nodorum*), la carie (agent causal : *Tilletia tritici*), l'oïdium (agents causal : *Erysiphe graminis*), le charbon nu (agent causal : *Ustilago tritici*), le charbon foliaire (agent causal : *Urocystis agropyri*), les rouilles brune, noire et jaune (agent causal : *Puccinia*), les fusarioses (agent causal : *Fusarium*). Ces attaques peuvent occasionner des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles et que les conditions de l'environnement sont favorables à l'expansion des maladies. Les maladies fongiques ont une influence sur le rendement puisqu'elles contaminent pour certaines une partie de la feuille voire la totalité (ex : la septoriose) ce qui inhibe le rendement photosynthétique. Certaines maladies affectent les épis et les grains (ex : la carie, le charbon, la fusariose). De plus, certaines espèces fongiques synthétisent des mycotoxines qui s'accumulent dans les grains, c'est le cas pour la plupart des espèces responsables de la fusariose.



**Figure 4 : Types de fusariose (Parry *et al.*, 1995).**

Seedling Blight : fusariose des semences, Foot Rot : fusariose du collet, Head Blight : fusariose de l'épi.



**Figure 5 : *Fusarium* Head Blight sur blé.**

source : a : [http://www.uni-giessen.de/fbr09/ipaz/abt\\_phytopath/ag-phytopath/GABI-Agrotec/GABI-Agrotec-en.htm](http://www.uni-giessen.de/fbr09/ipaz/abt_phytopath/ag-phytopath/GABI-Agrotec/GABI-Agrotec-en.htm)

b : <http://www.bspp.org.uk/publications/pathprofiles/pathprofile42.htm>

c : [http://www.cropdiseasescouncil.ca/find\\_a\\_disease.php?PHPSESSID=e3049de3ac54f4ee0993a2f13977fca7](http://www.cropdiseasescouncil.ca/find_a_disease.php?PHPSESSID=e3049de3ac54f4ee0993a2f13977fca7)



**Figure 6 : Grains de blé sains et fusariés.**

## I. 2. La Fusariose

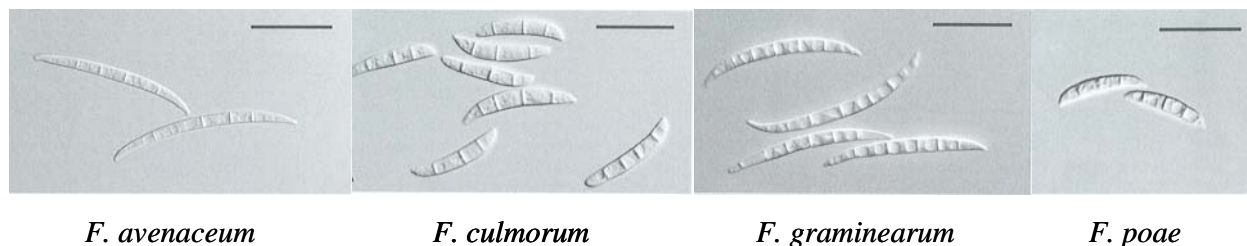
La fusariose est une maladie des céréales dites "à petits grains" qui sévit à travers le monde (pour revue, voir Sutton, 1982 ; Snijders, 1990 ; Parry *et al.*, 1995 ; Goswami et Kistler, 2004). Sous des conditions climatiques favorables, la fusariose peut attaquer à tous les stades de développement et tous les organes de la plante, depuis les racines jusqu'aux épis. Le terme "fusariose" des céréales regroupe trois types de symptômes (figure 4) (Parry *et al.*, 1995) :

- "Seedling Blight" : fusariose des semences, provoquent des manques à la levée et des fontes des semis
- "Foot Rot" : fusariose du collet, entraînant la nécrose de ces tissus
- "Head Blight" : fusariose de l'épi (figure 5)

Notre travail concerne plus particulièrement la fusariose de l'épi.

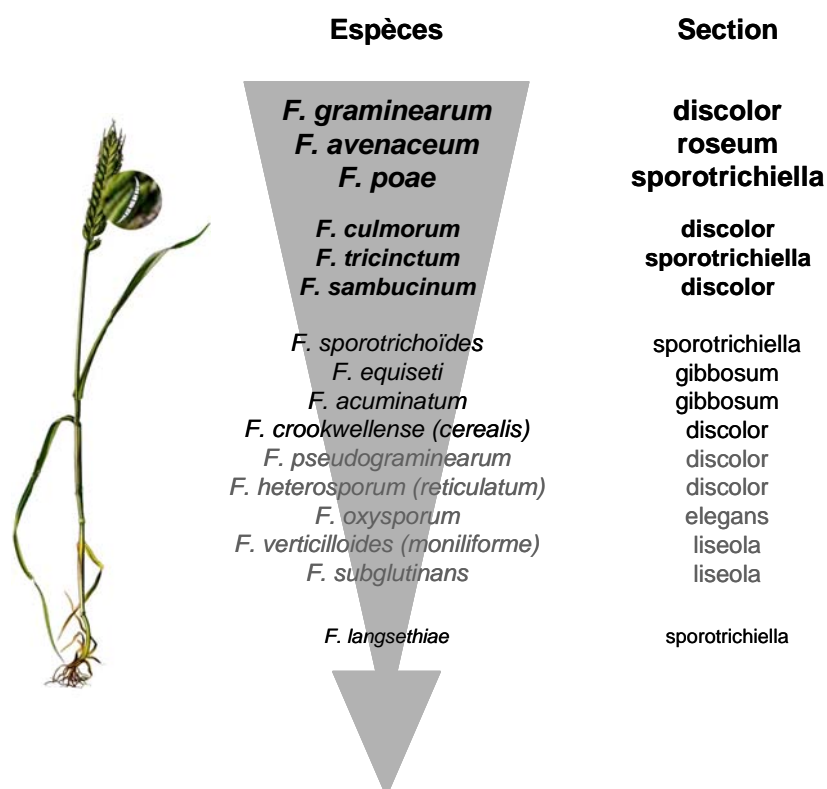
La fusariose a été décrite pour la première fois en 1884 en Angleterre. Depuis, la fusariose a progressé à travers le monde et de récentes épidémies ont été rapportées en Asie, au Canada, en Europe et en Amérique (Goswami et Kistler, 2004). C'est d'Amérique du Nord, et en particulier des Etats-Unis, que sont partis les premiers efforts concernant l'étude de la fusariose. La fusariose peut infester de nombreuses plantes ayant un fort intérêt économique, ce qui peut entraîner de lourdes conséquences financières. Le centre international pour l'amélioration du maïs et du blé ("International Maize and Wheat Improvement Center, CIMMYT") a identifié la fusariose comme un facteur majeur limitant la production de blé dans de nombreuses parties du monde (Goswami et Kistler, 2004). Les pertes causées par la fusariose sont difficiles à chiffrer à l'échelle du globe. De 1998 à 2000, ces pertes ont cependant pu être estimées à près de 2,7 milliards de dollars considérant seulement les états du centre et du nord des Etats-Unis (Wood, 2002).

L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables (avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains) et à l'altération de la qualité des grains (Pirgozliev *et al.*, 2003). Les grains de blé fusariés sont petits, légers, ridés et parfois couverts d'un duvet blanc ou rose (figure 6) (Champeil *et al.*, 2004). Après inoculation d'épis de blé par *F. culmorum*, Hāni (1981) a observé des pertes de rendement de 60%. Au cours d'études menées en champs avec du blé infecté artificiellement, Arseniuk *et al.* (1993) ont observé que le poids de 1000 grains, le nombre de grains par épi et



**Figure 7 : Spores de *F.avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. poae* (Leslie et Summerell, 2006).**

(échelle : — 25 µm)



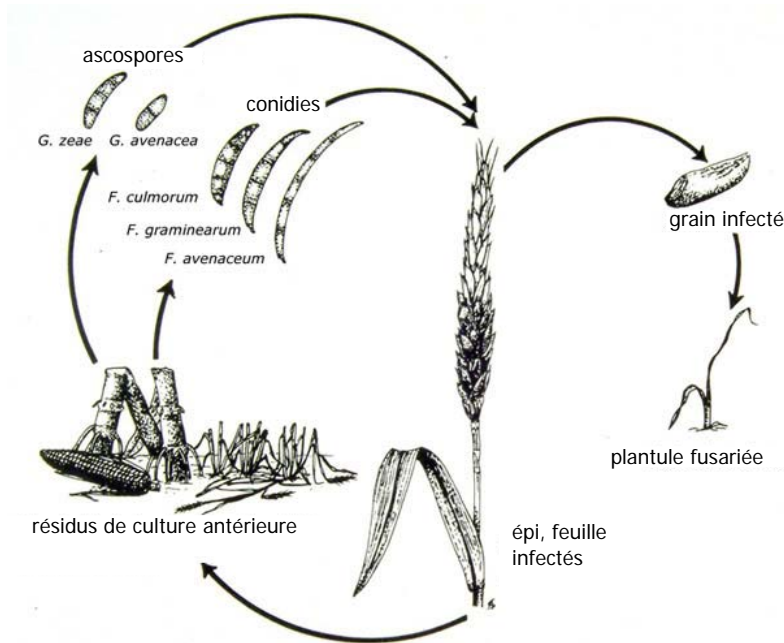
**Figure 8 : Représentation schématique des espèces fusariennes présentes sur blé en Europe ces dernières années (Pinson-Gadais L., communication personnelle).**

Les espèces fusariennes sont classées par ordre de prédominance.

le poids moyen des épis étaient réduits de 15%, 18% et 22% respectivement. La fusariose affecte également les qualités nutritives et technologiques des grains, ce qui a des conséquences néfastes lors des processus de transformations industrielles des grains. Il a été mis en évidence que l'invasion du grain de blé par *F. graminearum* entraînait la dégradation des grains d'amidon, des protéines de réserve et des parois cellulaires (Bechtel *et al.*, 1985). Dexter *et al.* (1997) ont observé que les farines issues d'échantillons de blé contenant des grains contaminés par *Fusarium* présentaient des qualités de panification (cuisson) non satisfaisantes. La fusariose peut également diminuer la qualité des futures semences. En effet, semer des graines de céréales infectées par *Fusarium* peut entraîner des symptômes de fontes de semis et des symptômes de fusariose de la tige chez les plantules, ainsi qu'une diminution du nombre d'épi et du poids des grains (Pirgozliev *et al.*, 2003).

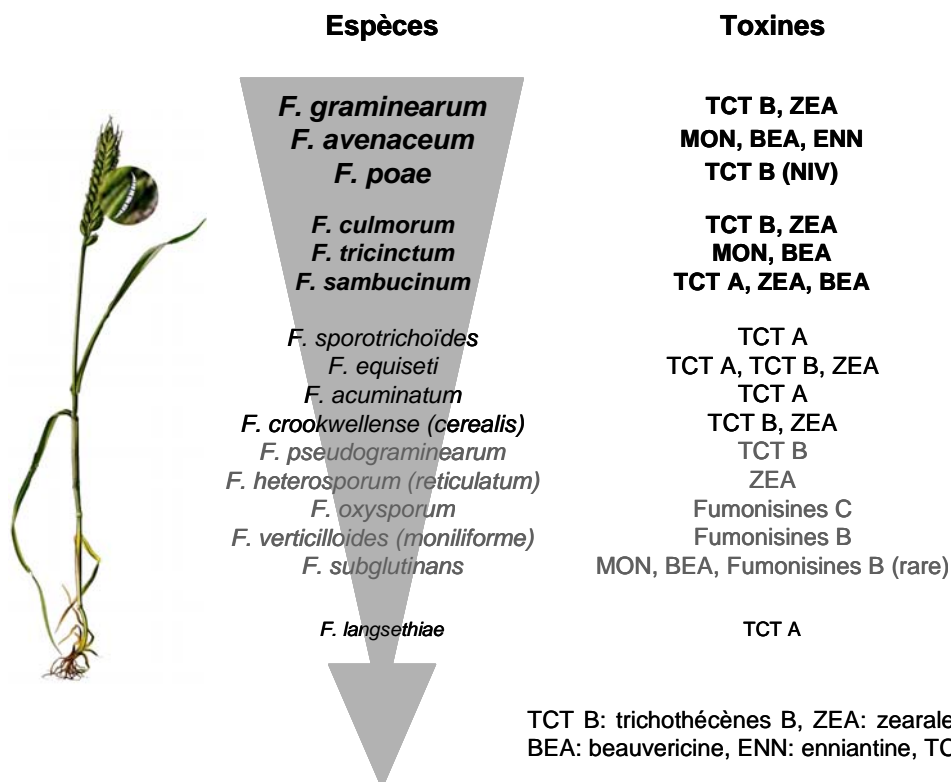
La fusariose de l'épi peut être causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* et une espèce du genre *Microdochium* (Arseniuk *et al.*, 1999). Parmi ces espèces, cinq sont principalement responsables de la fusariose, il s'agit de *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae* et *Microdochium nivale* (Parry *et al.*, 1995). Le nom donné à *Fusarium* est relié à l'allure fusiforme de ses spores (figure 7). La distribution et la prédominance de ces espèces pathogènes sont, pour une grande part, déterminées par l'espèce céréalière, la région et les conditions climatiques (Xu, 2003). Aux Etats-Unis, *F. graminearum* est l'espèce prédominante responsable de l'épidémie, de même qu'en Chine et en Nouvelle Zélande (Waalwijk *et al.*, 2003). L'analyse de la bibliographie de ces dernières années permet la représentation schématique de la flore fusarienne sur blé en Europe décrite sur la figure 8 (Bottalico et Perrone, 2002 ; Waalwijk *et al.*, 2003 ; Ioos *et al.*, 2004 ; Roháček et Hudec, 2005 ; Schollenberger *et al.*, 2007). Les espèces *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae* sont prédominantes. Puis, les espèces *F. culmorum*, *F. tricinctum* et *F. sambucinum* sont également importantes.

La principale source d'inoculum des fusarioses est constituée par les résidus de culture antérieure infectée (Sutton, 1982 ; Parry *et al.*, 1995). D'autres sources d'inoculum sont les nombreuses autres plantes hôtes, les semences contaminées et le sol (Champeil *et al.*, 2004). *Fusarium* est capable de survivre durant l'hiver dans le sol et sur les débris végétaux sous forme d'un mycélium saprophyte ou de chlamydospores, selon les espèces (Parry *et al.*, 1995). Au printemps, les conditions climatiques chaudes et humides seraient favorables au développement des conidies (spores asexuées) et des périthèces qui produisent des ascospores



**Figure 9 : Les résidus de culture antérieure infectée constituent la principale source d'inoculum de la fusariose.**

source : <http://www.rothamsted.ac.uk/ppi/staff/khk.html>



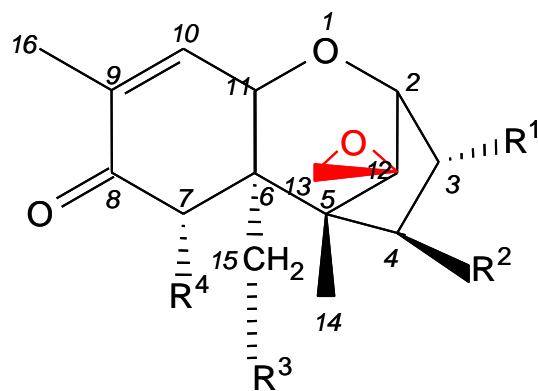
**Figure 10 : Représentation schématique des espèces fusariennes présentes sur blé en Europe ces dernières années et leurs toxines associées (Pinson-Gadais L., communication personnelle).**



(spores sexuées) au moment de la floraison des céréales (figure 9). Les ascospores seraient vraisemblablement la source d'inoculum de l'épidémie (Caron *et al.*, 2006). Les conditions climatiques ont une influence énorme sur l'incidence de la fusariose. Elles sélectionnent différentes espèces de *Fusarium*, qui possèdent des exigences de température et d'hydratation variables (Bakan, 1998). Elles conditionnent la libération, la dissémination et la germination des spores. La dissémination des spores se fait par le vent, la pluie mais aussi par les insectes (Goswami et Kistler, 2004). Le stade de développement de la plante influence également le degré de contamination, l'anthèse correspondant à une période de plus grande sensibilité du blé à la fusariose de l'épi (Sutton, 1982). Après leur dépôt sur les plantes, les spores germent et l'infection des tissus de l'épi a lieu. De nombreuses recherches ont essayé de mettre en évidence les voies par lesquelles les spores de *Fusarium* infectaient et colonisaient les épis. L'utilisation de souches de *F. graminearum* transformée pour exprimer de façon constitutive le gène codant la GFP (Green Fluorescent Protein) a facilité les études concernant les premiers événements de l'infection (Jansen *et al.*, 2005). Miller *et al.*, (2004) ont observé que *F. graminearum* se développe d'abord sur les anthères et le pollen, progressent vers les ovaires, puis colonise la lemma et la palea. Le pollen, riche en polysaccharides, favoriserait le développement du champignon (Sutton, 1982).

En plus des pertes de production, les différentes espèces de *Fusarium* présentes sur blé peuvent conduire à la contamination des grains par diverses mycotoxines. Ces métabolites secondaires produits par les champignons présentent une toxicité avérée vis-à-vis de nombreux organismes. Par conséquent, aux lourdes pertes économiques, s'ajoute alors un problème sanitaire. Compte tenu des quantités de céréales et de produits dérivés consommés chaque jour par l'homme, un réel problème de santé publique existe.

Certaines espèces de *Fusarium* qui infectent les céréales peuvent produire une ou plusieurs mycotoxines. La figure 10 présente les différentes mycotoxines associées aux espèces de *Fusarium* présentes sur blé en Europe ces dernières années (Bottalico et Perrone, 2002 ; Waalwijk *et al.*, 2003 ; Ioos *et al.*, 2004 ; Roháčik et Hudec, 2005 ; Schollenberger *et al.*, 2007). Parmi les fusariotoxines présentes sur blé en Europe, les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines sont les plus rencontrées. Notre étude concerne plus particulièrement les trichothécènes.



Trichothécènes B	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH
3-acetyl deoxynivalenol (3-ADON)	O-CO-CH <sub>3</sub>	H	OH	OH
15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON)	OH	H	O-CO-CH <sub>3</sub>	OH
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH
Fusarenone X (FX)	OH	O-CO-CH <sub>3</sub>	OH	OH

**Figure 11 : Structure chimique de cinq trichothécènes de type B.**

### **I. 3. Les trichothécènes**

#### **I. 3. 1. Généralités**

Les trichothécènes constituent une famille de métabolites secondaires qui sont produits principalement par des espèces de *Fusarium* et par certains autres genres de champignons tels *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Cylindrocarpon*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* et *Stachybotrys* (Betina, 1989). Les trichothécènes sont des sesquiterpènes caractérisés par une double liaison en position C-9,10, une fonction époxyde en position C-12,13 responsable de leur toxicité et diverses substitutions en positions C-3, C-4, C-15, C-7 ou C-8.

Ueno (1985) a classé les trichothécènes en quatre groupes, en fonction de leurs structures chimiques. Les TCT A ont un groupe fonctionnel autre qu'une fonction cétone en C-8 et sont représentés par la toxine T-2 et par le diacetoxy-scirpenol. Les TCT B ont une fonction cétone en C-8 et sont représentés par le déoxynivalenol et le nivalenol. Les TCT C sont caractérisés par un second cycle époxyde en position C-7,8 ou C-9,10. Les TCT D incluent des trichothécènes macrocycliques qui contiennent un cycle entre les positions C-4 et C-15. Sur substrats naturels, les trichothécènes les plus souvent isolés sont ceux des groupes A et B. Les mycotoxines de *Fusarium* les plus fréquemment rencontrées lors de la fusariose du blé en Europe sont les trichothécènes de type B (Bottalico et Perrone, 2002). Les TCT B comprennent, entre autres, le déoxynivalenol (DON) et ses formes 15- et 3-acétylées (15-ADON et 3-ADON), le nivalenol (NIV) et sa forme acétylée la fusarenone X (FX) (figure 11).

#### **I. 3. 2. Toxicité**

La toxicité aiguë des trichothécènes vis-à-vis des mammifères est bien documentée (pour revue, voir D'Mello *et al.*, 1999 ; Bennett et Klich, 2003 ; Eriksen, 2003). Historiquement, les trichothécènes ont été reconnus responsables d'intoxications humaines, et en particulier de l'aleucie toxique alimentaire, survenue en Russie dans les années 1942-1947 (Joffe, 1983). Cette maladie a été attribuée à la consommation de blés non récoltés pendant l'hiver et infectés par des mycotoxines de *Fusarium*. Par la suite, d'autres cas d'intoxications alimentaires humaines associés aux trichothécènes ont été rapportés en Chine, en Inde et au

Japon (Eriksen, 2003). La toxicité chronique et les effets à long terme des trichothécènes ingérés quotidiennement à faible dose sont actuellement inconnus.

Plus généralement, les trichothécènes sont toxiques envers toutes les espèces animales testées. Les symptômes varient selon les espèces, le temps d'exposition et les teneurs en mycotoxines ingérés. Les effets toxiques des trichothécènes incluent un retard de croissance, une réduction des fonctions ovariennes et des désordres au niveau de la reproduction, des troubles de l'immunité, une perte d'appétence et des troubles gastro-intestinaux (vomissements) (Rocha *et al.*, 2005).

Le caractère amphiphile des trichothécènes facilite leurs effets cytotoxiques sur les membranes cellulaires. Une fois traversé la barrière de la membrane plasmique, les trichothécènes entrent dans les cellules où ils interagissent avec leurs cibles, et en particulier les ribosomes et les mitochondries (Rocha *et al.*, 2005). Les trichothécènes se lient à la sous unité 60S des ribosomes, à la protéine L3, et inhibent l'activité de la peptidyl transférase des ribosomes, inhibant ainsi les étapes d'initiation, d'élongation ou de terminaison de la synthèse protéique (Rocha *et al.*, 2005). Les trichothécènes ont de multiples autres effets inhibiteurs sur les cellules animales et végétales, qui sont sans doute la conséquence de l'inhibition de la synthèse protéique, incluant l'inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN, l'inhibition des fonctions mitochondriales, des effets sur la division cellulaire, l'altération de la structure des membranes (Rocha *et al.*, 2005). Sur cellules animales, les trichothécènes provoquent également l'apoptose, une réponse de mort cellulaire programmée (Rocha *et al.*, 2005).

Les trichothécènes sont également phytotoxiques (Masuda *et al.*, 2007). A de très faibles concentrations, ils perturbent la germination des graines et entraînent le flétrissement, des chloroses, des nécroses et autres symptômes sur de nombreuses variétés de plantes (Rocha *et al.*, 2005). Ces effets phytotoxiques seraient la conséquence de l'inhibition de la synthèse protéique dans les cellules végétales. Des travaux réalisés sur des coléoptiles de blé ont montré que certaines variétés résistantes à la fusariose pouvaient tolérer des concentrations 10 à 1000 fois supérieures en trichothécènes que les variétés sensibles (Wang et Miller, 1988). Eudes *et al.* (2000) ont également distingué des différences de sensibilité aux trichothécènes parmi 11 cultivars de blé. Une hypothèse serait que des modifications de la peptidyl transférase des variétés de blé résistantes rendraient cette enzyme insensible au DON (Miller et Ewen, 1997). Une autre hypothèse expliquant ses différences de sensibilité aux trichothécènes serait que, comme l'ont constaté Miller *et al.* (1986a), les variétés résistantes pourraient dégrader plus rapidement le DON que les variétés sensibles ou seraient capables de le détoxifier.

### I. 3. 3. Stabilité et décontamination

Les processus de décontamination et de transformations alimentaires des céréales ne permettent pas une élimination totale des mycotoxines des grains (pour revue, voir Bennett et Richard, 1996 ; Hazel et Patel, 2004). Les mycotoxines sont chimiquement et thermiquement stables (Hazel et Patel, 2004). La fonction époxyde toxique en position C-12,13 est stable aux attaques nucléophiles (Eriksen, 2003). Les trichothécènes sont également stables à pH neutre et acide et par conséquent ne sont pas hydrolysés dans l'estomac après digestion (Eriksen, 2003).

Les grains infectés par *Fusarium* sont ridés et plus légers que les grains sains. Par conséquent, ils peuvent être séparés en utilisant des séparateurs par gravité. Cependant, de nombreux grains infectés par *Fusarium*, pouvant contenir des niveaux élevés de trichothécènes, ne peuvent pas toujours être physiquement distingués des grains sains. Il semble que cette méthode de routine de séparation par gravité permette au mieux de réduire jusqu'à 20% les niveaux de trichothécènes (Hazel et Patel, 2004).

Au cours du nettoyage des grains, avant leur utilisation dans les processus alimentaires, une réduction des niveaux de toxines peut avoir lieu. Par exemple, un simple nettoyage des grains par frottement ou à l'eau permettrait une diminution de la quantité de fusariotoxines mais est insuffisant pour l'élimination de toutes les toxines (Scott, 1998). Différentes techniques de décontamination des grains telles l'irradiation, la décontamination microbienne (dé-époxydation), le traitement à l'ozone, l'ammoniation, la chlorination ont été testées. L'utilisation de telles techniques doit s'assurer que les grains décontaminés gardent leur fonctionnalité et leurs qualités nutritives et que si la dégradation des trichothécènes est efficace, les produits de dégradation ne sont pas toxiques (Hazel et Patel, 2004).

Les effets des processus alimentaires, incluant la mouture, la cuisson, l'extrusion, le brassage, sur les niveaux de toxines semblent être processus dépendant. Il semble que les toxines résistent aux processus couramment utilisés en industries alimentaires (Hazel et Patel, 2004). Par exemple, au cours de la cuisson des pâtes, environ 50% du DON serait perdu dans l'eau de cuisson (Nowicki *et al.*, 1988). Des cuissons en conditions alcalines (cas des tortillas et des nouilles chinoises) permettraient de réduire jusqu'à 80% du DON (Abbas *et al.*, 1988). Cependant, les produits de dégradation des TCT B n'ont pas été identifiés et leur innocuité n'est pas garantie.

Lorsque les trichothécènes sont présents dans les grains, ils sont alors retrouvés dans les produits transformés (farine, pain). Dans une expertise récente de l'UK Food Standards

Denrées alimentaires à destination humaine		
Réglementation 856/2005 JOCE 6 Juin 2005		
<b>Trichothécènes</b>		µg/kg
Déoxynivalénol (DON)	céréales brutes	1250
	blé dur et avoine bruts	1750
	maïs brut	1750
	farines	750
	pâtes	750
	céréales petit déjeuner, pain, pâtisseries, etc.	500
	aliments pour bébé	200

Figure 12 : Teneurs maximales autorisées pour le déoxynivalénol dans les denrées alimentaires à destination humaine (règlementation n°856/2005 du 6 Juin 2005).

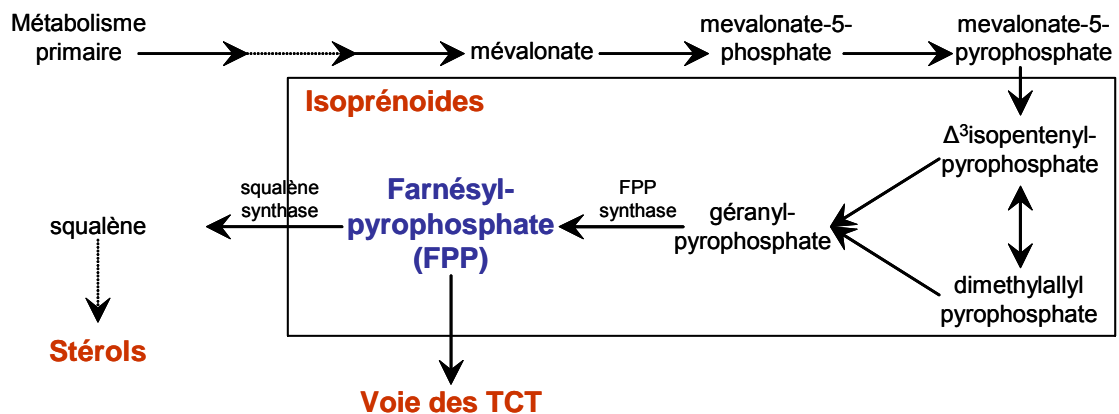


Figure 13 : Représentation schématique de la voie des isoprénoïdes conduisant à la biosynthèse de farnésyl pyrophosphate (FPP).

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

Agency" (FSA, 2003), sur 377 échantillons divers de céréales, 298 échantillons contenaient des niveaux de toxines détectables. Les niveaux les plus importants de toxines étaient déterminés dans les céréales du petit déjeuner et dans les snacks. Il semble que la transmission des trichothécènes dans les produits issus d'animaux nourris avec des grains contaminés (viande, lait, œufs) soit faible (Hazel et Patel, 2004 ; Sypecka *et al.*, 2004).

### **I. 3. 4. Législation**

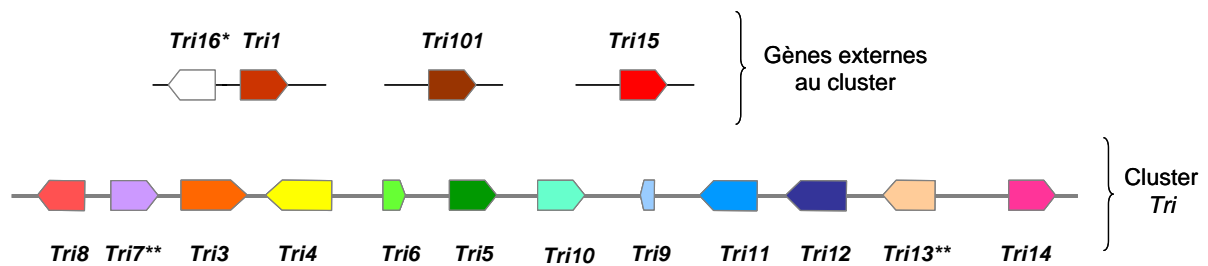
Les nouvelles réglementations de la Commission Européenne se sont précisées en 2005 en matière de fusariotoxines autorisées pour les céréales à paille et le maïs destinés à la consommation humaine. Le règlement n°856/2005 du 6 Juin 2005 publie des teneurs maximales autorisées pour plusieurs fusariotoxines, dont les trichothécènes B, et en particulier le déoxynivalenol (figure 12). Il n'existe pas une réglementation simple avec un taux unique pour chaque mycotoxine de *Fusarium*, mais différents taux correspondants à différents types d'utilisation possible des denrées destinées à l'alimentation humaine. Les taux fixés sont par exemple de 1750 µg/kg sur blé dur. Un taux de 750 µg/kg est fixé pour les produits de première transformation des céréales (farines, pâtes). Le règlement précise également que les lots de céréales rejetés ne doivent pas être mélangés avec des lots moins contaminés afin d'en réduire le niveau global de contamination. Une recommandation a aussi été publiée en ce qui concerne les produits à base de céréales et de maïs destinés à l'alimentation du bétail (CE 576/2006 du 17 Août 2006).

**Afin de limiter la présence des fusariotoxines dans les céréales et leurs produits dérivés, les processus de décontamination et de transformation alimentaires n'étant pas efficace, leur biosynthèse doit impérativement être réduite au champ.**

### **I. 3. 5. Biosynthèse**

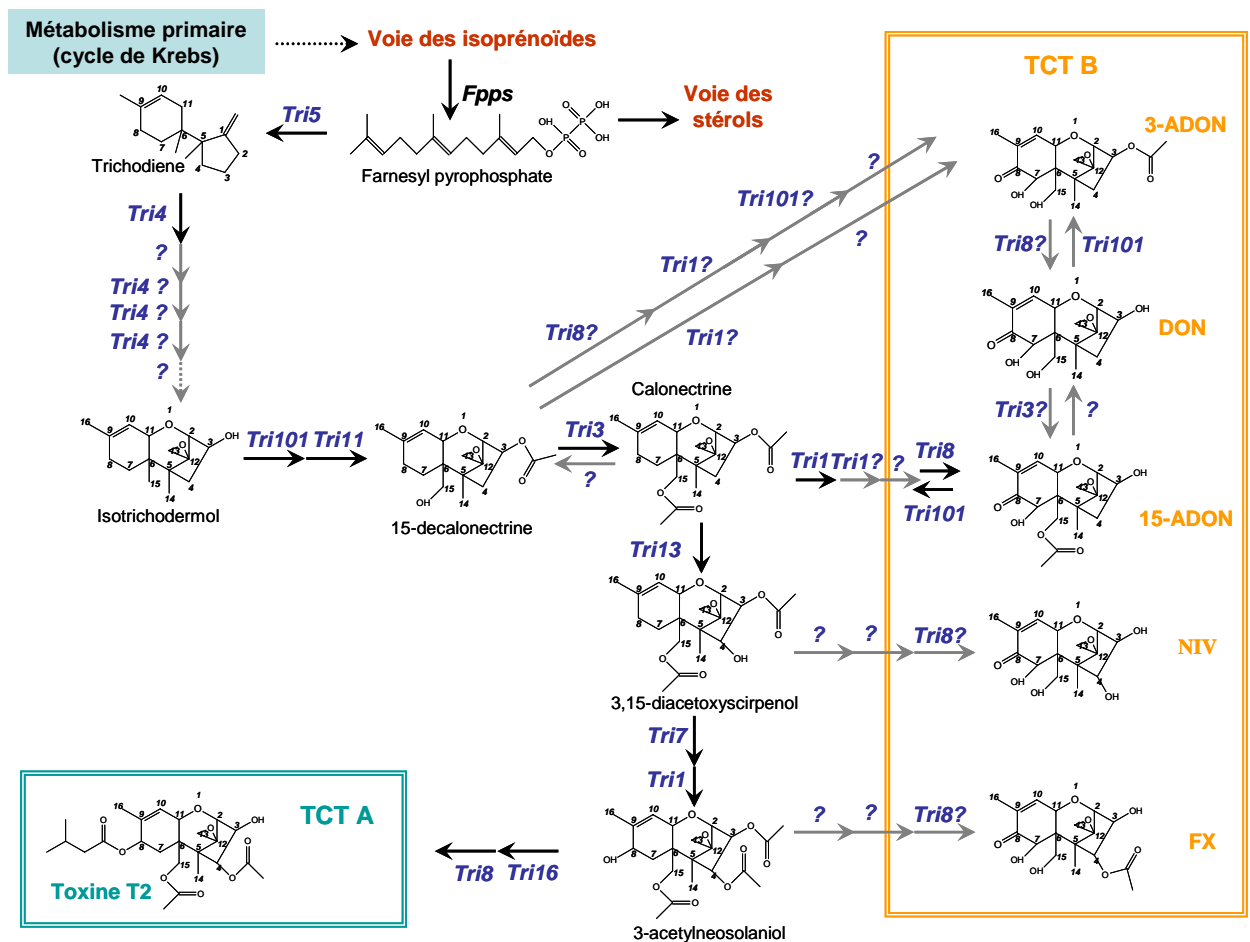
Les trichothécènes dérivent du trichodiène, lui-même synthétisé à partir du farnésyl pyrophosphate, produit de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes (figure 13). Le farnésyl pyrophosphate est en fait le précurseur de la voie de biosynthèse des stérols et des terpénoïdes.

La biosynthèse des trichothécènes à partir du trichodiène fait intervenir de nombreuses étapes d'oxygénation, d'isomérisation, de cyclisation et d'estérification, étapes qui ont été



**Figure 14 : Structure des régions génomiques contenant les gènes *Tri* connus. (Barreau C., communication personnelle)**

Les flèches représentent le sens de traduction de chaque gène. \* = gène non fonctionnel chez *F. graminearum* ; \*\* = gènes non fonctionnel chez *F. graminearum* de chémotype DON exclusivement.



**Figure 15 : Voie de biosynthèse des trichothécènes et gènes *Tri* impliqués (Barreau C., communication personnelle ; Ponts, 2005 ; Desjardins, 2006).**

Cette voie représente toutes les possibilités conduisant à la synthèse des différents trichothécènes B par les différentes espèces concernées et les gènes *Tri* impliqués ou supposés impliqués.



établies suite à de nombreuses expérimentations menées sur *F. sporotrichioides*, *G. pulicaris* et *F. culmorum* dans différents laboratoires (pour revue, voir Desjardins *et al.*, 1993 ; Desjardins, 2006 ; Kimura *et al.*, 2007). L'obtention de mutants et le clonage de certains gènes de la voie ont permis de connaître la fonction des principaux gènes requis pour les différentes étapes de synthèse des trichothécènes. La plupart des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes ont été identifiés et nommés gènes *Tri*. On dénombre actuellement 16 gènes *Tri* chez *F. sporotrichioides* et 15 chez *F. graminearum* (le gène *Tri16* étant non fonctionnel chez *F. graminearum*) (figure 14). Parmi ces gènes, 12 sont regroupés en cluster dans une région de 26-kb d'ADN génomique (Hohn *et al.*, 1993a ; Brown *et al.*, 2004). D'autres gènes *Tri* sont situés hors cluster. En effet, trois autres loci ont été identifiés. Un des locus comporte *Tri101* (Kimura *et al.*, 1998a ; Kimura *et al.*, 1998b ; McCormick *et al.*, 1999). Un autre locus comporte *Tri15* (Alexander *et al.*, 2004). Et, le dernier est composé de deux gènes *Tri*, les gènes *Tri16* et *Tri1* (Brown *et al.*, 2003 ; Meek *et al.*, 2003 ; McCormick *et al.*, 2004).

La séquence des gènes *Tri* est accessible *via* Internet (Broad Institute, 2003). En effet, la séquence complète du génome de *F. graminearum* est disponible. 11600 gènes ont été identifiés (Cuomo *et al.*, 2007).

La figure 15 présente la voie de biosynthèse des TCT B. Cette voie représente en fait toutes les possibilités conduisant à la synthèse des différents trichothécènes B par les différentes espèces concernées. Les gènes *Tri* impliqués ou supposés impliqués dans les différentes étapes de biosynthèse sont représentés sur cette voie. La fonction des gènes *Tri* est résumée dans le tableau 1. Le gène *Tri5* code la trichodiène synthase, enzyme clé catalysant la première étape de la voie de biosynthèse des TCT B qui transforme le farnésyl pyrophosphate en trichodiène (Hohn et Desjardins, 1992 ; Hohn *et al.*, 1993b). Une relation entre l'expression du gène *Tri5* et l'augmentation de la production de DON a déjà été observé dans des cultures de *Fusarium* (Doohan *et al.*, 1999 ; Covarelli *et al.*, 2004). Les gènes *Tri4*, *Tri11*, *Tri13* et *Tri1* codent des enzymes de type cytochrome P450 impliquées dans différentes étapes d'oxygénation de la voie. Les gènes *Tri3*, *Tri101*, *Tri8*, *Tri7* et *Tri16* codent des enzymes impliquées dans les étapes d'acétylation/déacétylation de la voie. Le gène *Tri12* code une protéine transporteur responsable de la sécrétion des trichothécènes (Alexander *et al.*, 1999 ; Wuchiyama *et al.*, 2000). Les gènes *Tri9* et *Tri14* sont des gènes corégulés de la voie dont la fonction demeure indéterminée.

Les gènes *Tri6*, *Tri10* et *Tri15* codent des facteurs de transcription importants qui régulent l'expression des autres gènes *Tri*. Le gène *Tri6* code un facteur de transcription qui

**Tableau 1 : Fonctions des gènes *Tri* impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes (d'après Desjardins, 2006)**

Type	Gène	Fonction	Références
Sesquiterpene cyclase	<i>Tri5</i>	trichodiène synthase	Hohn et Desjardins 1992; Hohn <i>et al.</i> , 1993b
Cytochrome P450	<i>Tri4</i>	trichodiène oxygenase	Hohn <i>et al.</i> , 1995; McCormick <i>et al.</i> , 2006; Tokai <i>et al.</i> , 2007
	<i>Tri11</i>	isotrichodermine 15-oxygenase	Alexander <i>et al.</i> , 1998; Brown <i>et al.</i> , 2001
	<i>Tri13*</i>	calonecitrine 4-oxygenase	Brown <i>et al.</i> , 2002; Lee <i>et al.</i> , 2002
	<i>Tri1</i>	triacetoxyscirpenol 8-oxygenase/ calonecitrine 8-oxygenase	Meek <i>et al.</i> , 2003; McCormick <i>et al.</i> , 2004
Acétylation/déacétylation	<i>Tri3</i>	trichothécène 15-O-acetyltransferase	McCormick <i>et al.</i> , 1996; Brown <i>et al.</i> , 2001
	<i>Tri101</i>	trichothécène 3-O-acetyltransferase	Kimura <i>et al.</i> , 1998a,b; McCormick <i>et al.</i> , 1999
	<i>Tri8</i>	trichothécène 3-O-esterase	Brown <i>et al.</i> , 2001; McCormick et Alexander, 2002
	<i>Tri7*</i>	trichothécène 4-O-acetyltransferase	Brown <i>et al.</i> , 2001; Lee <i>et al.</i> , 2001; Lee <i>et al.</i> , 2002
	<i>Tri16**</i>	trichothécène 8-O-acetyltransferase	Peplow <i>et al.</i> , 2003b
Régulation	<i>Tri6</i>	facteur de transcription	Proctor <i>et al.</i> , 1995b; Hohn <i>et al.</i> , 1999
	<i>Tri10</i>	gène régulateur	Peplow <i>et al.</i> , 2003a; Tag <i>et al.</i> , 2001
	<i>Tri15</i>	facteur de transcription	Alexander <i>et al.</i> , 2004
Transport	<i>Tri12</i>	trichothécène transporteur	Alexander <i>et al.</i> , 1999; Wuchiyame <i>et al.</i> , 2000
Gènes corégulés	<i>Tri9</i>	fonction indéterminée	Brown <i>et al.</i> , 2001
	<i>Tri14</i>	fonction indéterminée	Brown <i>et al.</i> , 2002

\* non fonctionnel chez *F. graminearum* de chémotype DON

\*\* non fonctionnel chez *F. graminearum*

serait capable de se fixer à des séquences des régions promotrices de plusieurs gènes *Tri* (Proctor *et al.*, 1995b ; Hohn *et al.*, 1999). Le gène *Tri10* est un régulateur positif du gène *Tri6* (Tag *et al.*, 2001; Peplow *et al.*, 2003a). Le gène *Tri15* code un facteur de transcription qui régulerait négativement la voie de biosynthèse (Alexander *et al.*, 2004). Les 12 gènes du cluster *Tri* sont corégulés par les facteurs de transcription TRI6 et TRI10.

#### **I. 4. Facteurs influençant les niveaux de mycotoxines produits**

Au cours de l'interaction entre *Fusarium* et son hôte, plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer les niveaux de mycotoxines produits tels l'inoculum, sa composition et sa disponibilité mais également la nature du grain servant de substrat.

##### **I. 4. 1. L'inoculum**

Plusieurs études ont suggéré un rôle des mycotoxines de *Fusarium* en tant que facteurs d'agressivité *in planta* (Desjardins *et al.*, 1996 ; Desjardins et Hohn, 1997, Proctor *et al.*, 1995a ; Harris *et al.*, 1999 ; Proctor *et al.*, 2002 ; Yao *et al.*, 2005 ; Maier *et al.*, 2006). Rappelons que en général, le pouvoir pathogène d'un parasite comprend la virulence et l'agressivité, la virulence étant la capacité qualitative d'une souche à infecter spécifiquement une plante hôte et l'agressivité la capacité d'une souche à infecter quantitativement une gamme de plantes hôtes. Il a été démontré que des mutants de *G. zea* (*Tri5*), non producteurs de trichothécènes, seraient moins agressifs que les souches sauvages vis-à-vis de plantules de blé et de riz (Proctor *et al.*, 1995a). Les mêmes résultats ont été obtenus par Maier *et al.* (2006) avec des souches de *F. graminearum* mutantes pour le gène *Tri5* vis-à-vis du blé, de l'orge et du maïs. Ils démontrent que les trichothécènes ont une influence sur l'agressivité de *F. graminearum*, et que cette influence est hôte dépendant et dans une moindre mesure chémotype de la souche dépendant. De même, une souche de *F. graminearum* mutée pour le gène *Tri12* a une agressivité réduite vis-à-vis du blé (Yao *et al.*, 2005). Selon Llorens *et al.* (2006), il existerait une relation entre les niveaux de toxines produits et l'agressivité des souches de *Fusarium*.

Les souches de *Fusarium* ont une grande influence sur les niveaux et les types de mycotoxines produits. Une souche de *Fusarium* est caractérisée par son potentiel toxinogène, défini par la capacité du champignon à produire différents types et différents niveaux de mycotoxines.



Il existerait une relation entre la taxonomie des souches de *Fusarium* et le type de trichothécènes produits. D'après l'analyse des séquences d'ADN codant la sous unité 28S des ribosomes de différentes espèces de *Fusarium*, Mulé *et al.* (1997) ont défini trois groupes de *Fusarium* : des espèces productrices de TCT A (*F. acuminatum*, *F. sambucinum*, *F. tumidum*, *F. compactum*, *F. camptoceras* R, *F. sporotrichioides*, *F. venenatum*), des espèces productrices de TCT B (*F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*) et des espèces non productrices de TCT (*F. camptoceras* B, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. tricinctum*, *F. decemcellulare*, *F. solani*). Cependant, cette classification des espèces de *Fusarium* en trois groupes n'est pas absolue puisque par exemple, la production de TCT A et de TCT B par des souches de *F. equiseti* a été rapportée (Pinson-Gadais L., communication personnelle).

Au sein des espèces de *Fusarium* productrices de TCT B, on distingue des souches productrices de DON et de ses formes acétylées (15-ADON et 3-ADON) et des souches productrices de NIV et de sa forme acétylée, la FX (Lee *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2003). On parle de souches de chémotype DON et de souches de chémotype NIV. L'existence de ces deux chémotypes est déterminée génétiquement. Les gènes *Tri13* et *Tri7* sont requis pour l'oxygénation et l'acétylation en position C-4 lors de la synthèse de nivalenol et de son dérivé (Lee *et al.*, 2002). La présence des gènes *Tri13* et *Tri7* à l'état fonctionnel détermine alors le chémotype NIV d'une souche alors que le gène *Tri13* des souches de *Fusarium* de chémotype DON n'est pas fonctionnel (Lee *et al.*, 2002). Par conséquent, une souche productrice de TCT B produit soit du DON et ses dérivés acétylés soit de la NIV et son dérivé acétylé. Cependant, la production de DON et de NIV par une même souche de *F. graminearum* a déjà été observée (Sugiura *et al.*, 1990 ; Lori *et al.*, 1992 ; Kim *et al.*, 2003).

Certaines souches de *Fusarium* produisent des mycotoxines, d'autres pas, alors qu'elles possèdent toutes le même équipement génétique. De plus, au sein des espèces de *Fusarium* productrices de TCT B, les niveaux de toxines produits peuvent varier considérablement. Au sein d'une même espèce et dans des conditions de croissance idéale, certaines souches produisent des quantités importantes de toxines alors que d'autres souches en produisent des quantités infimes voire non détectables (Bakan, 1998 ; Bakan *et al.*, 2001 ; Wagacha et Muthomi, 2007). Bakan *et al.* (2002) ont montré que la séquence intergénique entre les gènes *Tri6* et *Tri5* de 30 souches de *F. culmorum* productrices de DON présente des variations intra spécifiques corrélées avec les niveaux de trichothécènes produits *in vitro* sur grains. Sur la base de leur polymorphisme génétique, Bakan *et al.* (2002) ont alors divisé en deux groupes les souches de *F. culmorum* : des souches "fortes productrices" (> 1 ppm) et des souches faibles productrices de trichothécènes (< 0,07 ppm). Cependant, parmi les souches



simplement définies "fortes productrices", cette classification ne distingue pas les souches faibles, moyennes et fortes productrices. Au sein du laboratoire MycSA, les potentiels toxigènes des souches de *Fusarium* de la collection ont été définis *in vitro* en cultures sur grains. Au sein d'une même espèce on distingue réellement des souches fortes, moyennes et faibles productrices de trichothécènes. Cependant, comme le souligne Ponts (2005), cette classification des souches est arbitraire puisque des valeurs numériques distinguant des productions fortes, moyennes ou faibles n'ont jamais été définies. Des souches de *F. graminearum* définies *in vitro* fortes productrices de trichothécènes sont généralement retrouvées fortes productrices de trichothécènes aux champs (Forget F., Naïbo B., Trottet M., Caron D., communications personnelles). Par contre, nous avons pu observer que les potentiels toxigènes des souches de *Fusarium* définis en culture sur grains ne corrèlent pas du tout avec les potentiels toxigènes définis en cultures liquides.

Aux champs, plusieurs facteurs culturaux, tels la rotation des cultures, l'enfouissement des résidus de culture, le type de fertilisation utilisée, l'utilisation ou non de fongicides et d'herbicides peuvent influencer les évènements de fusariose et les niveaux de contamination des grains en mycotoxines (pour revue, voir Pirgozliev *et al.*, 2003 ; Champeil *et al.*, 2004 ; Edwards, 2004). L'enfouissement des résidus de cultures antérieures est un premier moyen de lutte contre l'incidence de la maladie, en réduisant les sources d'inoculum (Teich et Nelson, 1984 ; Champeil *et al.*, 2004). La rotation avec des cultures tel que le colza ou le soja réduirait l'apparition de la fusariose. En effet, les évènements de fusariose seraient plus important si les cultures précédentes sont du maïs, du blé dur ou de l'avoine que du blé ou de l'orge (Champeil *et al.*, 2004). De la même façon, la contamination du blé en DON serait réduite de 25% et de 49% si la culture précédente est du soja plutôt que respectivement du blé et du maïs (Dill-Macky et Jones, 2000). Au contraire, certaines pratiques culturales telle l'irrigation intensive augmenteraient l'incidence des blés fusariés (Teich *et al.*, 1987). Des études ont observé qu'un apport d'azote à 100 kg/ha pouvait réduire la fusariose du blé mais qu'un apport à 200 kg/ha l'augmentait (Teich et Nelson, 1984). Divers fongicides existent, cependant leur efficacité aux champs contre la fusariose et la mycotoxinogénèse est controversée (Pirgozliev *et al.*, 2003 ; Champeil *et al.*, 2004). L'utilisation des fongicides est délicate et le moment d'application est important.

La lutte biologique est une méthode prometteuse contre la fusariose (Schisler *et al.*, 2002). Par exemple, au cours d'études menées en serre, l'inoculation des épis de blé à

### Grille agronomique du risque DON en blés

Précédent cultural	Travail du sol	Sensibilité variétale au DON			
		Peu Sensible	Peu Sensible à Moy. Sensible	Moy. Sensible à Sensible	Sensible
Réducteur	Tous	I a	I a	I b	II a
	Labour	I a	I b	II a	II b
Neutre	Non labour	I b	II a	II b	III a
	Labour	II a	II b	III a	III b
Maïs	Fourrage	III a	III a	III b	IV
	Grain	III a	III b	IV	IV
	Fourrage	III a	III b	IV	IV
	Grain	III a	III b	IV	IV

© Syngenta Agro

**Légende :**  
 Classes de hiérarchisation du risque DON :   
 Très faible Très fort

Réducteur : Colza, pois, lin, œillette, fève, luzerne, chou  
 Neutre : Avoine, betterave, blé, chicorée, endive, haricot, jachère, lupin, oignon, orge, pomme de terre, ray grass, soja, tournesol  
 Grain : Maïs grain, sorgho.

**Figure 16 : Grille agronomique du risque DON en blés (Syngenta).**

source : [http://www.syngenta-agro.fr/synweb/agroCompet\\_19\\_2\\_975\\_237\\_Grille-du-risque-DON-blés.aspx](http://www.syngenta-agro.fr/synweb/agroCompet_19_2_975_237_Grille-du-risque-DON-blés.aspx)



l'anthèse avec le champignon *Phoma betae* réduit de 60% la sévérité des symptômes de fusariose causé par *F. culmorum* (Diamond et Cooke, 2003). Au cours d'essais aux champs, Khan *et al.* (2004) rapportent que les levures *Cryptococcus* sont capables de diminuer la sévérité de la fusariose, l'antagoniste le plus efficace réduisant la sévérité de la fusariose de 50-60 %.

Ces dernières années, des outils prenant en compte les différents facteurs culturaux et permettant d'évaluer et de maîtriser les risques de contamination du blé en DON ont été mis au point par Syngenta (Qualimètre®), Arvalis (Myco-LIS®), Bayer Crop Science (DONcast) ou encore BASF (Quali'DIAG).

Par exemple, Syngenta a défini une grille agronomique "Clé des champs" qui constitue un outil de gestion des risques DON du blé (figure 16). Cette grille a été élaborée grâce au suivi de sept années de données agronomiques parcellaires en blé tendre et blé dur (10264 parcelles de blés). Les enquêtes "Clé des champs" permettent de croiser l'itinéraire cultural (précédent, travail du sol, variétés, protection des semences, protection fongicide, ...) et les analyses de DON d'échantillons de grains représentatifs de chaque parcelle. Ce travail a permis d'identifier les critères agronomiques jouant un rôle significatif dans l'apparition des fusariotoxines du blé (source : [http://www.syngenta-agro.fr/synweb/agroCompet\\_19\\_2\\_975\\_237\\_Grille-du-risque-DON-blés.aspx](http://www.syngenta-agro.fr/synweb/agroCompet_19_2_975_237_Grille-du-risque-DON-blés.aspx)). Ces enquêtes "Clé des champs" sont la base de l'outil de prévision du DON un mois avant récolte : le Qualimètre® blé tendre et le Qualimètre blé dur (Syngenta).

Arvalis a défini un modèle agroclimatique Myco-LIS® Blé tendre. Le diagnostic agronomique du risque DON, complété des données climatiques dès la floraison des blés permet de prédire la teneur en DON avant récolte (source : [http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/fr/fichier/communique/328\\_DON\\_ble\\_06X01\\_plaquette\\_DON.pdf](http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/fr/fichier/communique/328_DON_ble_06X01_plaquette_DON.pdf)).

Les facteurs culturaux influençant la contamination en DON du blé ont été classés selon leur importance (Arvalis), avec en premier le climat, puis les résidus de culture, la variété, l'utilisation de fongicides à la floraison et les autres facteurs culturaux (culture précédente, travail du sol, récoltes) (source : [http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/fr/fichier/communique/328\\_DON\\_ble\\_06X01\\_plaquette\\_DON.pdf](http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/fr/fichier/communique/328_DON_ble_06X01_plaquette_DON.pdf)). Le climat étant un facteur cultural non maîtrisable, le facteur variétal devient alors un facteur primordial pour réduire l'incidence de la maladie. Un classement des variétés de blé existe selon leur niveau de résistance à la fusariose, il s'agit de la notation GEVES qui va de 2 (variété sensible) à 8 (variété résistante).



#### I. 4. 2. Nature du grain servant de substrat

Parmi les souches de *Fusarium* productrices de TCT B, les niveaux de toxines produits *in vitro* sont fortement influencés par les conditions de culture et par la nature du substrat.

L'influence des facteurs hydratation, température et temps de culture sur les niveaux de toxines produits ont été largement étudiés (Cuero *et al.*, 1987 ; Hope et Magan, 2003 ; Llorens *et al.*, 2004 ; Hope *et al.*, 2005 ; Ramirez *et al.*, 2006). L'hydratation des grains, et plus précisément l'activité thermodynamique de l'eau ( $a_w$ ), influence le développement des champignons et les niveaux de toxines produits (Bakan, 1998). Les optima d'hydratation déterminés sur grains pour la production de trichothécènes correspondent à des  $a_w$  proches de 1 (Vesonder *et al.*, 1982 ; Greenhalgh *et al.*, 1983 ; Cuero *et al.*, 1987). Le facteur température a clairement une influence sur la toxinogénèse. Les optima de température définis sur grain varient d'une étude à une autre et semblent se situer entre 25 et 30°C pour la production de DON (Hope et Magan, 2003 ; Llorens *et al.*, 2004 ; Ramirez *et al.*, 2006). Ryu et Bullerman (1999) observent que l'effet d'un passage au froid des grains (15°C pendant quatre semaines) semble stimuler la production de DON par *F. graminearum*. L'étude de l'influence de ces facteurs sur la toxinogénèse *in vitro* permet de mieux appréhender l'influence des facteurs climatiques (température, humidité et pluie) qui ont une grande influence sur la toxinogénèse au champ.

Les niveaux de toxines produits par *Fusarium in vitro* sont fortement influencés par la nature du grain servant de substrat (Greenhalgh *et al.*, 1983 ; Megalla *et al.*, 1987 ; Bilgrami *et al.*, 1990 ; Lori *et al.*, 1990 ; O'Neill *et al.*, 1993 ; Bakan, 1998 ; Mateo *et al.*, 2002). Dans des conditions de culture identique, les niveaux de DON produits par une même souche de *F. graminearum* sont plus importants sur riz (91,9-202 ppm) et maïs (34,1-84,5 ppm) que sur blé (3,6-24,4 ppm) et orge (0,6-6 ppm) (Megalla *et al.*, 1987). Des études ont également montré que les substrats riz et maïs favorisent la toxinogénèse par rapport au substrat blé (Bilgrami *et al.*, 1990 ; Lori *et al.*, 1990 ; O'Neill *et al.*, 1993 ; Bakan, 1998). De plus, Bakan (1998) a observé que les différences de toxinogénèse mesurées sur maïs et blé ne pouvaient pas être attribuées à des variations de la croissance du champignon. L'ensemble de ces résultats suggère la présence de composés activateurs de la toxinogénèse dans les grains de riz et maïs et/ou la présence de composés inhibiteurs ou l'absence de composés activateurs dans les grains de blé.

Au sein d'un même substrat, les variétés pourraient également moduler la toxinogénèse de *Fusarium*. Bilgrami *et al.* (1990) ont montré que la biosynthèse de toxines (zéaralénone,



déoxynivalenol, toxine T-2) pouvait varier (jusqu'à 60%) selon la variété de blé ou de maïs utilisée, sans malheureusement préciser les différences de croissance. Au cours d'une étude menée sur quinze variétés de blé dur inoculées par une souche de *Fusarium* productrice de nivalenol, les niveaux de contamination fongique et d'accumulation de TCT B des grains ont été analysés (Favre *et al.*, 2004). Alors que de faibles différences étaient observées entre les différentes variétés au niveau du développement fongique, certaines variétés présentaient une contamination en TCT B limitée. Ces résultats suggèrent que certaines variétés de blé dur contiendraient des composés qui pourraient inhiber la biosynthèse des mycotoxines de *Fusarium* ou des activités biologiques qui pourraient métaboliser et par conséquent détoxifier les toxines (pour revue, voir Boutigny *et al.*, revue acceptée).



## II. Résistance des céréales à l'accumulation des mycotoxines de *Fusarium*

Revue acceptée dans *European Journal of Plant Pathology*

### Natural mechanisms for cereal resistance to accumulation of *Fusarium* trichothecenes

Anne-Laure Boutigny<sup>1,2,\*</sup>, Florence Richard-Forget<sup>2</sup> and Christian Barreau<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> IRTAC, 66 rue La Boétie, Paris 75008, France

<sup>2</sup> INRA, UPR1264 MycSA, 71 avenue Edouard Bourleaux BP81, Villenave d'Ornon 33883, France

**Résumé :** Cette revue décrit les mécanismes naturels qui existent chez les céréales et qui permettent une réduction de l'accumulation dans les grains des trichothécènes, mycotoxines synthétisées par *Fusarium*. Comme les trichothécènes agiraient en tant que facteurs d'agressivité, réduire la contamination des grains en toxines pourrait limiter l'infection fongique. Cette caractéristique, généralement nommée résistance de type V à la fusariose, peut être divisée en deux classes. Tout d'abord, dans la classe 1, les plantes peuvent transformer chimiquement la toxine par des activités métaboliques entraînant la dégradation ou la détoxification des mycotoxines. Parmi les stratégies de détoxification, la glycosylation des trichothécènes B est un processus naturel qui existe chez le blé. Compte tenu de la relation structure/toxicité des trichothécènes, l'acétylation et la dé-époxydation constituent deux autres processus de détoxification, qui pourraient être exprimés dans des plantes transgéniques. Ensuite, dans la classe 2, les plantes pourraient réduire l'accumulation des mycotoxines en inhibant leur biosynthèse sous l'action de composés endogènes des grains. Ces composés pourraient être constitutifs des grains ou induits en réponse à l'infection par le pathogène. Actuellement, différents composés avec des propriétés antioxydantes, comme les composés phénoliques, des peptides ou les caroténoïdes ou avec des propriétés pro oxydantes tels le peroxyde d'hydrogène ou les hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique ont été décrits comme des composés "modulateurs" de la biosynthèse des mycotoxines. Ici, nous rassemblons pour la première fois les différentes études consacrées aux effets spécifiques *in vitro* de tels composés sur la biosynthèse des mycotoxines. Une meilleure compréhension des processus naturels permettant de limiter l'accumulation des mycotoxines dans la plante est





nécessaire et pourrait ouvrir des voies pour la sélection de variétés possédant des activités métaboliques ou des compositions des grains appropriées, ce qui permettrait d'élargir les choix pour la réduction du "risque mycotoxique".

**Abstract:** This review describes the naturally occurring mechanisms in cereals that lead to a reduction of *Fusarium* trichothecene mycotoxin accumulation in grains. A reduction in mycotoxin contamination in grains could also limit fungal infection, as trichothecenes have been reported to act as virulence factors. The mechanisms explaining the low toxin accumulation trait, generally referred to as type V resistance to *Fusarium*, can be subdivided into two classes. Class 1 includes mechanisms by which the plants chemically transform the trichothecenes, leading to their degradation or detoxification. Among the detoxification strategies, glycosylation of trichothecenes is a natural process already reported in wheat. According to the structure and the toxicity of trichothecenes, two other detoxification processes, acetylation and de-epoxidation, can be expressed, at least in transgenic plants. Class 2 comprises mechanisms that lead to reduced mycotoxin accumulation by inhibition of their biosynthesis through the action of plant endogenous compounds. These include both grain constitutive compounds and compounds induced in response to the pathogen infection. There are already many compounds with antioxidant properties, like phenolic compounds, peptides or carotenoids, and with pro-oxidant properties, like hydrogen peroxide or linoleic acid-derived hydroperoxides, that have been described as "modulators" of mycotoxin biosynthesis. This review addresses for the first time the different studies reporting specific *in vitro* effects of such compounds on the biosynthesis of *Fusarium* mycotoxins. A better understanding of the natural processes limiting accumulation of trichothecenes in the plant will open the way to the development of novel breeding varieties with reduced "mycotoxin risk".

*Key words:* FHB resistance, *Fusarium*, glycosylation, phenolic compounds, mycotoxins, wheat

*Abbreviations:* 3-ADON - 3-acetyl-4-deoxynivalenol; 15-ADON - 15-acetyl-4-deoxynivalenol; 4-ABOA - 4-acetyl-benzoxazolin-2-one; 9S-HPODE - 9S-hydroperoxide; 13S-HPODE - 13S-hydroperoxide; DON – deoxynivalenol; FHB – *Fusarium* head blight; FX - fusarenone X; LC – liquid chromatography; LOX – lipoxygenase; MS – mass spectrometry; NIV – nivalenol; QTL - quantitative trait loci; TCT B – trichothecene B; UDP glycosyltransferase – uridine diphosphate glycosyltransferase



## Introduction

*Fusarium* head blight (FHB) or "scab", results from infection of cereal grains by microscopic fungi of the genus *Fusarium* and leads to drastic reductions in crop yield. Furthermore, various species of this genus can produce toxic secondary metabolites, referred to as mycotoxins, which accumulate in the grain. This causes a reduction in grain quality, leading to important economic losses. In addition, given the quantities of cereal-derived food consumed daily, the occurrence of mycotoxins in grains constitutes an important food safety issue.

Among *Fusarium* mycotoxins, trichothecenes are frequently encountered on cereal crops. As these are potent inhibitors of eukaryotic protein synthesis (Rocha et al. 2005), they constitute a toxin family of considerable concern to human and animal health (Bennett and Klich 2003). In Europe, trichothecenes from the type B group (TCT B) produced by *Fusarium graminearum* [teleomorph *Gibberella zeae* (Schwabe) Petch] and *Fusarium culmorum* species are predominant (Bottalico and Perrone 2002). They include deoxynivalenol (DON) and its acetylated forms 3-acetyl-4-deoxynivalenol and 15-acetyl-4-deoxynivalenol (3- and 15-ADON) and nivalenol (NIV) and its acetylated form 4-acetylnivalenol or fusarenone X (FX).

In June 2005, maximum DON contamination levels acceptable for cereals and corn food were set in Europe (EC No856/2005). Grains or derived products exceeding the established limits will not be authorized for human consumption. It is of great concern to reduce DON occurrence in cereals and derived products generated in Europe. Type-B trichothecenes are heat-stable molecules and are not eliminated by current food manufacturing processes (Hazel and Patel 2004). In consequence, the most efficient way to reduce or prevent trichothecene occurrence in food today is to limit their biosynthesis by the fungus before harvest. Since no efficient fungicides are presently available to fully control *Fusarium* development and/or toxin accumulation (Champeil et al. 2004), it is best to prevent the development of the disease in the crop. It has been shown that some cultural practices (ploughing, tillage, preceding crop and choice of cultivar) can contribute to the occurrence of FHB (Champeil et al. 2004). As a consequence, appropriate agronomic practises are generally used to reduce the risk of contamination of wheat with trichothecenes (Champeil et al. 2004; Edwards 2004). Among the different factors that are relevant for that purpose, choice of cultivar can be a determinant. However, there is not yet a large choice of varieties adapted to various climatic or agronomic situations and this represents a challenge for the future.



One obvious approach against the mycotoxin threat consists of breeding varieties for resistance to FHB disease. This strategy could limit mycotoxin contamination in grains. However, a direct relationship between resistance to FHB and resistance to toxin contamination of the infected grain remains a subject of controversy. In fact, some authors claim a correlation between FHB symptoms and trichothecene level in wheat in contrast to other literature data that shows that infection severity alone is not enough to predict a potential level of toxin concentration in wheat grain (Mesterházy et al. 1999; Snijders 2004). Although there is a general trend showing that the higher the level of resistance of a genotype is the fewer the toxin accumulates in it, varieties with low apparent FHB symptom severity and high DON content, and *vice versa*, have also been described (Mesterházy et al. 1999). Because FHB symptoms and *Fusarium* trichothecene levels are not always correlated, breeding for FHB-resistant wheat varieties with lower mycotoxin level in the grain is not straightforward and presents some difficulties.

Besides the resistance mechanisms that modulate the severity of FHB; there may be additional mechanisms which lead to a decrease in accumulation of TCT B in kernels. In addition to quantitative trait loci (QTL) controlling resistance to FHB, a QTL linked to the control of trichothecene accumulation has recently been characterised in wheat (Lemmens et al. 2005). As trichothecenes have been shown to act as virulence factors for fungal infection (Proctor et al. 1995), limiting mycotoxin production in the kernel would consequently reduce fungal infection.

No FHB resistant varieties are commercially available yet for durum wheat. In a recent study, the occurrence of different sensitivities to TCT B accumulation was demonstrated for a collection of *Triticum turgidum* subsp. *durum* lines inoculated with a nivalenol-producing *Fusarium* strain (Favre et al. 2004). While only slight differences in the level of fungal biomass were observed for the different lines, four of the lines exhibited limited TCT B contamination. The current hypothesis is that those wheat lines may either contain endogenous compounds able to inhibit *Fusarium* trichothecene biosynthesis or possess biological activities able to degrade or modify the toxins. Such a wide variation in TCT B production in different lines of the same crop suggests that, even for cereal species in which no resistance to the pathogen development can be selected, varieties supporting lower toxin production can be generated. The identification of the precise chemical or biological nature of the factors responsible for the differences in susceptibility to toxin accumulation among varieties will help plant geneticists to breed for varieties with such desirable characteristics. A breeding strategy to combine both resistance to the pathogen development and to toxin



accumulation would probably lead to new genotypes able to efficiently limit the "mycotoxin risk".

In 1963, Schroeder and Christensen distinguished between two types of resistance to FHB in wheat: type I resistance that operates against initial infection, and type II resistance that operates against the spread of the pathogen within the host. Afterwards, other types of resistance were defined from characteristics observed in FHB-resistant wheat: ability to resist to kernel infection (type III), tolerance to infection (type IV), and resistance to DON accumulation (type V) (Miller et al. 1985; Mesterházy 2002).

The aim of this review is to focus on the natural processes limiting *Fusarium* trichothecene accumulation in cereals (type V resistance), especially in wheat. These processes include both chemical transformation of the toxins by plant metabolic activities and inhibition of their biosynthesis by natural plant compounds. We propose to divide the type V resistance into two components of resistance: (V-1) resistance to trichothecene accumulation by metabolic transformation of the toxin and (V-2) resistance *via* inhibition of trichothecene biosynthesis.

### **Metabolic transformation of *Fusarium* trichothecenes**

Occurrence of chemical transformation of *Fusarium* trichothecenes *in planta* has long been suspected from studies devoted to DON accumulation in kernels (Miller et al. 1983; Scott et al. 1984; Miller et al. 1985; Miller and Young 1985). In 1983, Miller et al. observed a decrease of DON and 15-ADON levels during the growing season in field corn inoculated with *F. graminearum* and hypothesized that this decrease could be explained by a chemical transformation of the mycotoxins by plant enzymes. This reduction in toxin levels was also noticed in wheat either artificially or naturally infected with *F. graminearum* (Scott et al. 1984; Miller and Young 1985).

Later on, different studies described interactions between plant components and trichothecenes. For example, during germination of barley seeds spiked with deoxynivalenol, a 77.1% degradation of DON was observed within five days (El-Banna 1987). In sweet potato root tissues, <sup>14</sup>C-labeled deoxynivalenol was rapidly metabolized and converted into several unknown metabolites (Fujita and Yoshizawa 1990). In 1985, Miller et al. experimentally infected a set of spring cereals (wheat, rye and triticale; 20 cultivars) with *F. graminearum*, and observed that there was proportionally less DON in the resistant cultivars than in the susceptible ones when compared to the expected values based on fungal biomass





measurements. Yao et al. (1996) showed that extracts of leaves from two varieties of wheat resistant to FHB (Sumai 3 and Fan 9) transformed DON into an unknown compound while no transformation was noticed in varieties susceptible to FHB. Miller et al. (1985) suggested that resistance in some cultivars might result in part from the degradation or transformation of the toxins.

Such mechanisms would be supported by the identification of either the bypass products or degradation metabolites, or by the identification of plant chemical transformation activities using the trichothecenes. Some recent work clearly demonstrates that those mechanisms exist.

#### *Glycosylation: a natural TCT B detoxification process for cereals*

A detoxification process for plants consists in reducing the toxicity of pollutants by chemical modification and sequestering in the vacuole (Coleman et al. 1997). Chemical transformation may involve conjugation of the toxic compound to polar substances such as sugars, amino acids, or sulphates (Berthiller et al. 2005). So far, conjugation of TCT B to sugars is the only modification reported to occur *in planta* (Berthiller et al. 2005). In general, glycosylation transforms toxic metabolites into stable and non-reactive storage forms with increased water solubility and the reactive site of the toxin is blocked by the addition of the sugar residue, leading to a reduced toxicity for the plant (Jones and Vogt 2001).

In 1986, Miller and Arnison observed that the FHB resistant wheat cultivar Frontana was able to metabolize 18% of  $^{14}\text{C}$  deoxynivalenol added to suspension cultures while the FHB susceptible cultivar Casavant only converted a small amount of  $^{14}\text{C}$  DON (< 5%). In the Frontana cultures, three derived products were formed and one of them was identified as a possible glycoside of deoxynivalenol based on its molecular weight. However, this product was not fully characterized at the time of the study.

In 1991, Savard was the first to chemically synthesize a glycoside derivative of deoxynivalenol. Thus, with standards available, analytical methods could be developed and presence of conjugated mycotoxins could be investigated in plant extracts. First, a glycoside of deoxynivalenol was isolated from maize cell suspension cultures incubated with DON (Sewald et al. 1992). Poppenberger et al. (2003) identified an UDP-glycosyltransferase in *Arabidopsis thaliana* able to catalyse glycosylation of DON and showed that the glycosylated form had a strongly reduced capacity to inhibit protein synthesis. Later on, the natural occurrence of glycoside derivatives of deoxynivalenol was reported in artificially (Berthiller et al. 2005; Dall'Asta et al. 2005) and naturally (Berthiller et al. 2005) contaminated cereals.



In their study, Lemmens et al. (2005) even established a close relationship between the ratio of DON glycoside/DON and DON resistance in DON treated wheat. Moreover, in their report, a quantitative trait locus analysis linked DON resistance and *Qfhs.ndsu-3BS*, a QTL that is hypothesized to encode a DON-glycosyltransferase or to regulate the expression of such an enzyme. In such DON-resistant cultivars, trichothecenes seems to accumulate mainly as DON glycoside and in addition, the total content of DON + DON glycoside appears one order of magnitude lower in the resistant lines compared to the sensible one (Lemmens et al. 2005). New wheat cultivars with increased glycosyltransferase activity can now be selected by introgression of the *Qfhs.ndsu-3BS* QTL in sensible cultivar.

Detoxification of trichothecenes by glycosylation leading to "masked mycotoxins" could be an important natural mechanism used by plants for resistance to mycotoxins accumulation. A mechanism leading to zearalenone glycosylation has also been described (Schneweis et al. 2002) showing that it is not limited to trichothecenes. However, although glycosylated compounds seem less toxic (Poppenberger et al. 2003; Wu et al. 2007), the possibility that they can be re-converted into the original toxic form by hydrolysis during food/feed processing or in the digestive tract of humans and animals cannot be excluded (Gareis et al. 1990). The "masked mycotoxins" are often not researched when using the routine methods of mycotoxin analysis (Berthiller et al. 2005). Because of the increased water solubility of glycosylated compounds, the solvent generally used in the extraction process is not adapted for an efficient extraction of the conjugated mycotoxins that can then get lost during the cleanup process (Berthiller et al. 2005). Since very sensitive LC-MS/MS methods are now available for structural characterization and quantification of trichothecenes glycosides (Berthiller et al. 2005), an emphasis should be placed on tracking down these "masked mycotoxins" in field sample analysis.

#### *Acetylation and de-epoxidation: additional chemical modifications that reduce toxicity of TCTB*

Based on the relationship between structure and toxicity for the trichothecenes, acetylation and de-epoxidation are two possible mechanisms that could reduce the toxicity of trichothecenes (Eriksen 2003; Kimura et al. 2006). Can these strategies be used in plants to protect themselves against trichothecene accumulation?

Acetylation has been described as a trichothecene detoxification process used by *Fusarium* to protect itself from its own toxins (Kimura et al. 1998; McCormick et al. 1999).



First, Kimura et al. (1998) isolated from *F. graminearum* the *Tri101* gene that encodes a trichothecene 3-O-acetyltransferase catalysing the transfer of an acetyl group to the C3 hydroxyl group of trichothecenes. They showed that the 3-O-acetylation of trichothecenes led to a reduced toxicity on *in vitro* protein synthesis in the rabbit reticulocyte lysate translation system. The acetylated forms 15-ADON and 3-ADON have generally been reported as being less toxic for animal and human (Atkinson and Miller 1984; Eriksen et al. 2004). McCormick et al. (1999) observed that expression of *Tri101* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* increased their resistance to trichothecenes. Since trichothecene production has been suggested as a virulence factor, Kimura et al. (1998) hypothesized that transgenic plants expressing *Tri101* could contribute to the control of FHB by decreasing *Fusarium* aggressiveness. Various studies with wheat (Okubara et al. 2002), barley (Manoharan et al. 2006) and rice (Kimura et al. 2006; Ohsato et al. 2007) have shown that the expression of a transgenic *Tri101* gene can reduce DON accumulation or FHB symptoms in greenhouse tests but this was not effective in field trial assays (Okubara et al. 2002; Manoharan et al. 2006). To date, no literature data has reported the natural occurrence of trichothecene acetylation as a detoxification process in plants.

There are conflicting observations concerning the phytotoxicity of acetylated DON to cereal plants. In a study focused on rice seedlings, Ohsato et al. (2007) reported that DON was not phytotoxic to the transgenic lines expressing *Tri101*. In contrast, other literature data reported that acetylated DON was nearly as toxic as DON for cereal plants (Wang and Miller 1988; Wakulinski 1989; Bruins et al. 1993; Eudes et al. 2000). According to Ohsato et al. (2007), the apparent toxicity of 3-ADON observed in studies mentioned earlier with non-transgenic plants may be ascribed to C-3 de-acetylation inside the cells. According to Mitterbauer and Adam (2002), the efficiency of over-expression of an acetyl transferase in plants could be severely limited by the re-conversion of the acetylated precursors to DON by plant de-acetylases. This could be experimentally demonstrated by tracing the re-conversion of 3-ADON applied to plant to DON. In contrast, Kimura et al. (2006) support the idea that transgenic expression of *Tri101* could continuously eliminate the C-3 deacetylated trichothecenes from plant cells. More studies are needed to resolve the ambiguities concerning the phytotoxicity and stability of acetylated derivatives of DON in cereals and the problems concerning the stability of expression of *Tri101* in transgenic plants before *Tri101* can be part of a biotechnological application. A recent work reported a significant difference in the catalytic properties of TRI101 orthologs from *F. sporotrichioides* and *F.graminearum* to inactivate DON (Garvey et al. 2007). New forms of acetyl transferase with an increased



efficiency to acetylate the DON and which can be stably expressed *in planta* have to be researched in order to generate transgenic plants that could be substantially protected against FHB and DON accumulation at the field level.

Chemically, trichothecenes constitute a family of sesquiterpenoids with a 12,13 epoxide ring, which confers the toxicity to these molecules (Eriksen 2003). The epoxide reduction corresponds to the removal of the oxygen from the epoxide group to yield a carbon-carbon double bond. Eriksen et al. (2004) used a cell toxicity test to show that the IC<sub>50</sub> values for the DON and NIV de-epoxides were respectively 55 and 54 times higher than for the corresponding toxins. Other studies showed that de-epoxide metabolites of the trichothecenes T-2 toxin and diacetoxyscirpenol were less toxic than the corresponding toxins with an intact epoxide ring (Swanson et al. 1987; Swanson et al. 1988). All those studies suggested that de-epoxide forms of trichothecenes are much less toxic. However, no de-epoxide forms of trichothecenes have been reported yet *in planta*. Although phytotoxicity tests of de-epoxide trichothecenes on cereals have not been performed, transgenic strategies using expression of a gene encoding an enzyme able to de-epoxidize the trichothecene molecule could be of great interest for reducing toxin toxicity. De-epoxide trichothecenes, presumably formed through metabolism by intestinal and ruminal flora, have been found in plasma or excreta from animals exposed to trichothecenes (Eriksen 2003). Enzymatic reduction of the epoxide bond by micro-organisms has been attempted by numerous research groups worldwide but very few led to successful results (Schatzmayr et al. 2006). Deoxynivalenol and different type A trichothecenes can enzymatically be reduced by an epoxidase from *Eubacterium* BBSH 797 to non-toxic de-epoxide metabolites (Fuchs et al. 2002). However, the genes involved in the detoxification pathway remain to be identified.

### **Inhibition of *Fusarium* trichothecenes biosynthesis by kernel compounds**

Another alternative strategy to limit mycotoxin content in grains consists of reducing their biosynthesis during the growth of the plant. We previously raised the hypothesis that resistance to *Fusarium* trichothecene accumulation in some durum wheat cultivars could be explained by a particular biochemical composition of the kernel, rich in specific endogenous compounds able to reduce trichothecene biosynthesis (Pinson-Gadais et al. 2007). Several studies indicated an inhibitory effect of plant secondary metabolites on mycotoxin production. These include both constitutive compounds of kernels and compounds induced in response to the pathogen infection. Trichothecenes are synthesized from trichodiene by a series of





oxygenations known to require molecular oxygen (Desjardins et al. 1993). Therefore, changes in the oxidative parameters of the nutrient source, the kernels, can interfere with the secondary metabolism of the fungus and modulate the levels of trichothecene production (Ponts 2005).

Different compounds with antioxidant properties, like phenolic compounds, peptides or carotenoids, and with pro-oxidant properties, like hydrogen peroxide or linoleic acid derived hydroperoxides, have been presumed to modulate biosynthesis of mycotoxins (Burow et al. 1997; Huang et al. 1997; Norton 1997; Hua et al. 1999; Ponts et al. 2006). Literature data on this subject have accumulated in the last few years but remain dispersed. Here, we review different studies reporting *in vitro* effects of such compounds on biosynthesis of trichothecenes.

#### *Secondary metabolites with pro-oxidant properties*

*In planta*, substrate composition may be greatly modified when invasion by pathogens occurs, triggering several defence mechanisms in the host. Among the broad range of defence responses, the generation of reactive oxygen species, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is one of the earliest events (Repka 1999; Kachroo et al. 2003). This molecule orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response (Levine et al. 1994). In the interaction between *F. graminearum* and wheat, proteins with antioxidant function are observed five days after inoculation suggesting an oxidative burst of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inside the infected tissues (Zhou et al. 2005). Because many oxidation steps are involved in trichothecene biosynthesis, the very strong oxidant characteristics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may interfere with fungal metabolism and modulate toxin yield (Ponts 2005). Previous data indicate that DON production by *Fusarium* requires weak oxidant conditions (Miller and Blackwell 1986). However, our more recent *in vitro* experiments showed that exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to enhanced DON/ADON production by *F. graminearum* (Ponts et al. 2003; Ponts et al. 2006) and up-regulates expression of various *Tri* genes involved in trichothecene biosynthesis (Ponts et al. 2007). Relieving the fungus from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress by addition of catalase in the medium leads to a significant down-regulation of these genes and a strong decrease in trichothecene biosynthesis (Ponts et al. 2007). This result reinforces the hypothesis that oxidative conditions encountered by *F. graminearum* during its development on the spike can be a determinant factor in the level of induction of toxin biosynthesis. Thus, the efficiency of the oxidative burst will not only act on the development of the fungus in the infected kernels but also have an effect on the level of the virulence



factors, the trichothecenes produced by the fungus. This may explain in part the difference observed between various wheat cultivars in levels of resistance to FHB and of mycotoxin accumulation. In addition, Ponts et al. (2006) observed that the regulation of TCT B accumulation induced by an oxidative stress may be compound dependent, as paraquat, another pro-oxidant molecule, inhibits their production. The results also suggested that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effect on TCT B production could be chemotype dependent, as mycotoxin accumulation in liquid culture of a nivalenol and fusarenon X-producing *F. graminearum* strain was not affected by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. From this study on the effects of pro-oxidants on trichothecene synthesis, the authors concluded that the difference in *F. graminearum* virulence levels could partially be explained by an adaptation of *Fusarium* to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress.

The plant lipoxygenase (LOX) pathway produces metabolites implicated in pathogen resistance (Gardner 1991). It has been shown with *Aspergillus* species that oxidation products of lipids, induced by stress conditions, can also affect aflatoxin biosynthesis (Fabbri et al. 1983; Fanelli and Fabbri 1989). Several *in vitro* studies demonstrated an effect of LOX products on aflatoxin production by *Aspergillus*, including inhibitory effects (Goodrich-Tanrikulu et al. 1995; Burow et al. 1997) but also activating effects (Fabbri et al. 1983; Passi et al. 1984; Fanelli et al. 1989). Burow et al. (1997) showed that 13S-hydroperoxide (13S-HPODE), one of the LOX derived metabolites from linoleic acid, can decrease aflatoxin biosynthesis *in vitro* while 9S-HPODE did not. Derivatives of 13S-HPODE like methyl jasmonate (Goodrich-Tanrikulu et al. 1995; Vergopoulou et al. 2001) or aldehyde products of 13S-HPODE (Castoria et al. 1989; Zeringue et al. 1996) can also modulate aflatoxin production. *In planta*, past studies showed a relationship between the percentage of polyunsaturated fatty acids of lipid extracts from seeds and aflatoxin production (Fabbri et al. 1983; Passi et al. 1984). The authors ascribed this result to the fact that polyunsaturated fatty acids are more easily peroxidizable than the mono-unsaturated fatty acids. These results suggest that the activity of the plant lipoxygenase system may influence the mycotoxin production. Regarding the trichothecenes, there are very few studies on the effect of the plant lipoxygenase pathway on their production. A recent *in vitro* experiment performed in our laboratory showed that 13S-HPODE can activate TCT B production by *F. graminearum* (Ponts 2005). However, this is a preliminary result and further studies are necessary to clarify the effect of LOX products on trichothecene production.

#### *Secondary metabolites with antioxidant properties*



Since plant metabolites with pro-oxidant properties have a strong effect on trichothecene biosynthesis, we could reasonably suppose that plant secondary metabolites with antioxidant properties may also have a modulator effect on trichothecene biosynthesis. Among the secondary metabolites of cereal kernels with antioxidant properties, carotenoids, peptides, and especially phenolic compounds have been studied for their efficiency to reduce mycotoxin biosynthesis (Norton 1997; Bily 2003; Chen et al. 2006).

Literature data concerning the effect of carotenoids on mycotoxin biosynthesis are scarce. Some studies report an inhibitory effect of carotenoids on aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus* (Norton 1997; Wicklow et al. 1998). As the amount and type of carotenoids present in cereal grains are subject to variations between species, cultivars and environmental growing conditions (Hentschel et al. 2002; Konopka et al. 2006; Abdel-Aal et al. 2007), more studies evaluating the effect of these antioxidant molecules on TCT B production by *Fusarium* are needed. Preliminary work *in vitro* in our laboratory suggested an inhibitory effect of lutein extracted from durum wheat bran on TCT B production by *F. culmorum*, and also of a carotenoid extract from maize kernels on fumonisin production by *F. verticillioides* (unpublished data).

Plant seeds contain high levels of many antimicrobial and antifungal proteins including pathogenesis-related proteins, enzyme inhibitors, hydrolytic enzymes like chitinases and glucanases, ribosome-inactivating proteins, lipid transfer proteins, and small peptides such as defensins, lectins, and thionins (Apel et al. 1990; Vigers et al. 1991; Duvick et al. 1992; Van Loon and Van Strien 1999; Muthukrishnan et al. 2001). Such antifungal defence compounds may be expressed constitutively by the host plants or induced upon pathogen infection (Fritig et al. 1998). Small peptides and proteins have been characterized in maize and wheat kernels that have antifungal activity against *Fusarium* (Duvick et al. 1992; Huynh et al. 1992a, b; Egorov et al. 2005) and *Aspergillus* (Neucere and Godshall 1991; Chen et al. 1998). Some authors have suggested a relationship between maize kernel resistance to *Aspergillus* and expression of antifungal proteins (Huang et al. 1997; Chen et al. 1998; Chen et al. 2006). Doohan et al. (2000) identified antifungal proteins from seed extracts of the FHB-resistant wheat cultivar Arina. According to the molecular mass of this antifungal protein, they suggested chitinases, ribosome-inactivating proteins, permatins or glucanases as possible candidates. Strikingly, few studies attempting to understand the effect of these antifungal proteins or peptides from kernels on mycotoxin production have been reported. The inhibition of *Aspergillus* aflatoxin production by maize seed proteins (Nagarajan and Bhat 1972; Huang et al. 1997; Chen et al. 2006) or cotton seed proteins (McCormick et al. 1988) has been



examined. Thus, as with carotenoids, studies evaluating the effect of antifungal seed proteins and peptides on TCT B production by *Fusarium* are required.

Among the secondary metabolites with antioxidant properties, phenolic compounds have often been described in literature as inhibitors of both fungal growth and mycotoxin production (Guiraud et al. 1995; Hua et al. 1999). Phenolic compounds are present in all plants, and they or their oxidation products have been shown to have a role in disease resistance (Friend 1981; Matern and Kneusel 1988, Nicholson and Hammerschmidt 1992). Some phenolic compounds are linked to various cell wall components (Wallace and Fry 1994). In response to the pathogen infection, they can be either released from the cell wall or massively synthesized by the plant, accumulating rapidly at the infection site (Nicholson and Hammerschmidt 1992). They can thus operate in defence response through inactivation of fungal enzymes or reinforcement of plant structural components (Bell 1981), such as the host cell wall which acts as a mechanical barrier against the pathogen, limiting the diffusion of toxins released by the pathogens into the host cell and the flux of nutrients from the host cell to the pathogen (Siranidou et al. 2002).

During the infection process, the fungal mycelium progresses from the surface of the kernel to the endosperm (McKeehen et al. 1999). This suggests that the biochemical organization of the outer layers can interact with the penetration of *Fusarium* (McKeehen et al. 1999). The cell walls of kernels are rich in phenolic compounds (Naczki and Shahidi 2006). Phenolic compounds have been shown to inhibit the *in vitro* growth and reproduction of a wide array of fungal genera (Guiraud et al. 1995; Aziz et al. 1998). Several reports suggest that resistance to *Fusarium* is correlated with kernel phenolic content at maturity in maize (Reid et al. 1992; Assabgui et al. 1993; Bily et al. 2003) and wheat (McKeehen et al. 1999; Siranidou et al. 2002). In these studies, the phenolic compounds associated with FHB resistance are flavonoids (Reid et al. 1992) and phenolic acids, especially ferulic and *p*-coumaric acid (Assabgui et al. 1993; McKeehen et al. 1999; Siranidou et al. 2002; Bily et al. 2003). In response to inoculation with *F. graminearum*, Reid et al. (1992) observed that the concentration of phenolic compounds in the silk tissue increased in the resistant maize cultivars and decreased in the susceptible ones. In the latter case, the authors explained this decrease in phenolic compounds either by their degradation by the pathogen or by an inhibition of their biosynthesis by the fungal trichothecenes, which are known as potent inhibitors of protein biosynthesis. In the former case, Reid et al. (1992) suggested that either the cultivar is resistant to the toxin or may be able to detoxify it. Thus, in the resistant cultivar, the metabolism is not affected by the toxin and the plant reacts by synthesizing more phenolic





compounds that are targeted to the infection site. This led the authors to hypothesize that this increase in phenolic compounds that seems to be induced in resistant genotypes may play a crucial role in resistance to trichothecene accumulation.

Several *in vitro* experiments have described an inhibitory effect of various phenolic compounds on mycotoxin production. The inhibitory effect of different phenolic compounds on aflatoxin production by *Aspergillus* have been widely reported in the literature (Uraih et al. 1977; Chipley and Uraih 1980; Sinha and Singh 1981; DeLuca et al. 1987; Mallozzi et al. 1996; Hua et al. 1999; Norton 1999; Mahoney and Molyneux 2004; Nesci and Etcheverry 2006). Interestingly, several natural phenolic compounds (quinones, coumarins, flavonoids, phenolic acids) isolated from various plants were shown to be potent inhibitors of aflatoxin formation (Paster et al. 1988, Sinha 1990; Mahoney et al. 2000; Lee et al. 2001; Mahoney and Molyneux 2004). Similarly, phenolic acids were found to be effective inhibitors of fumonisin B1 production by *F. verticillioides* (Beekrum et al. 2003). Miller et al. (1996) and Desjardins et al. (1988) reported an inhibitory effect of respectively 4-acetyl-benzoxazolin-2-one (4-ABOA) and naturally occurring flavonoids and furanocoumarins on TCT B biosynthesis. A more recent study suggested that soluble phenolic compounds of maize germ could reduce trichothecene accumulation (Bakan et al. 2003). The same year, Bily (2003) reported that caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, vanillic acid and 3-hydroxybenzoic acid can reduce TCT B production by *F. graminearum*. Interestingly, in the last two studies, toxin inhibition by phenolic compounds occurred at concentrations where fungal growth was not affected, suggesting that the effect of phenolic compounds on mycotoxin accumulation was not the result of a fungitoxic effect but a specific effect on toxin biosynthesis. Bily (2003) showed that ferulic acid acted on the TCT B biosynthesis pathway but not on the steps involved in the initiation of production. This is in agreement with a previous report from Desjardins et al. (1988) showing that in cultures of *F. sporotrichioides* treated with flavones or furanocoumarins, accumulation of the final toxin decreased while there was an increased accumulation of trichodiene (the first intermediate in trichothecene biosynthesis). Their interpretation was that conversion of trichodiene to oxygenated trichothecene was blocked by the phenolic compounds tested, therefore impeding the production of any toxic trichothecenes with a 12, 13-epoxide group.

As phenolic acid profiles vary between wheat varieties (Regnier and Macheix 1996; Lempereur et al. 1997; Lempereur et al. 1998; Peyron et al. 2002; Moore et al. 2006; Mpofo et al. 2006), they could be good candidate compounds for the reduced TCT B biosynthesis trait in kernels. Recent work in our laboratory showed that a phenolic fraction extracted from



wheat bran exhibited a strong inhibitory effect on *in vitro* DON/ADON biosynthesis by *F. culmorum* (Boutigny et al. submitted) and suggested a possible role of phenolic acids in resistance to trichothecene accumulation in durum wheat.

## Conclusion

Up to now, most cereal breeding approaches to develop varieties with high levels of FHB resistance have focused on selection for reduced FHB symptoms. As trichothecenes have been shown to act as virulence factors, an alternative strategy to limit FHB could consist of reducing the mycotoxin contamination of kernels. This would limit fungal infection by decreasing or removing the fungal virulence factors. An improved breeding strategy would be to select for varieties exhibiting natural mechanisms of plant resistance to both fungal spread and mycotoxin accumulation.

Cereals can deploy various natural mechanisms to reduce mycotoxin accumulation. Among these natural mechanisms, we reported here that cereal plants can promote degradation or detoxification of mycotoxins (type V-1 resistance) or prevent their biosynthesis (type V-2 resistance).

Concerning the detoxification mechanisms, glycosylation of TCT B is a recently described natural process encountered in wheat. Based on the structure and toxicity of trichothecenes, two other mechanisms of chemical modification can reduce the toxicity of TCT B: acetylation and de-epoxidation. To our knowledge, the occurrence of these two mechanisms has not yet been reported to occur naturally in cereals. Studies with transgenic plants containing a *Fusarium* gene that acetylates TCT B as a detoxification process have been promising. However, before using heterologous detoxification genes in cereals, it may be worthwhile to investigate first the phytotoxicity and the stability of acetylated and de-epoxyde derivatives of TCT B. When relevant, the genes conferring the ability to detoxify trichothecenes could be introduced in susceptible genotypes, using either marker-assisted selection or transgenic approaches.

Plants can also prevent mycotoxin biosynthesis by the fungus. In fact, some compounds, constitutive in the kernels or induced as a response to the pathogen attack, can effectively reduce mycotoxin production. Literature data dealing with kernel phenolic compounds that inhibit biosynthesis of various mycotoxins, including trichothecenes, are numerous. In addition, it seems that many other kernel compounds can interfere with mycotoxin metabolism. These include carotenoids, antifungal peptides, hydrogen peroxide and oxidation



products of lipids. Unfortunately, many studies that showed an inhibitory effect of some of these compounds on fungal growth have not looked at their effect on mycotoxin biosynthesis. Recent efforts in this direction from different groups, including our laboratory, seem very promising and suggest that, at least *in vitro*, various kernel compounds can greatly modulate accumulation of trichothecenes. Such studies have to be extended to confirm these results and to identify new kernel compounds able to inhibit mycotoxin biosynthesis. In this review, we reported different compounds that modulated *in vitro* TCT B biosynthesis by *Fusarium*. However, the question remains: "Are these compounds effective *in planta*?" An exciting challenge for the near future is to answer to this question. If the answer is yes, this will open the way for selecting varieties exhibiting an appropriate kernel composition, rich in such endogenous compounds.

Thus, a strategy of "pyramiding" resistance QTLs, genes for detoxification and improved composition in kernel compounds limiting trichothecene accumulation could lead to a palette of new varieties, increasing the choices for cultural practices aiming at reducing the "mycotoxin risk" in cereals.

### **Acknowledgments**

This work is part of Anne-Laure Boutigny' PhD project financially supported by the IRTAC (Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales), the ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique) and the "Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche" as a part of the National Integrated Research Project "RARE fusariotoxines 2003-2007". We would like to thank Thérèse Ouellet and Shea Miller for review of the manuscript.

### **References**

- Abdel-Aal, E. S. M., Young, J. C., Rabalski, I., Hucl, P., & Fregeau-Reid, J. (2007). Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 787-794.
- Apel, K., Bohlmann, H., & Reimann-Philipp, U. (1990). Leaf thionins, a novel class of putative defence factors. *Physiologia Plantarum*, 80, 315-321.
- Assabgui, R. A., Reid, L. M., Hamilton, R. I., & Arnason, J. T. (1993). Correlation of kernel (E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 83, 949-953.



- Atkinson, H. A. C., & Miller, K. (1984). Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation. *Toxicology Letters*, *23*, 215-221.
- Aziz, N. H., Farag, S. E., Mousa, L. A. A., & Abo-Zaid, M. A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, *93*, 43-54.
- Bakan, B., Bily, A. C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogene, B. J. R., & Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 2826-2831.
- Beekrum, S., Govinden, R., Padayachee, T., & Odhav, B. (2003). Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B<sub>1</sub>. *Food Additives and Contaminants*, *20*, 490-493.
- Bell, A. A. (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology*, *32*, 21-81.
- Bennett J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*, 497-516.
- Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., & Krska, R. (2005). Masked mycotoxins: Determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 3421-3425.
- 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. Doctoral Thesis, Pau University, France.
- Bily, A. C., Reid, L. M., Taylor, J. H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A. J., Bakan, B., Regnault-Roger, C., Pauls, K. P., Arnason, J. T., & Philogene, B. J. R. (2003). Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, *93*, 712-719.
- Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxicogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, *108*, 611-624.
- Bruins, M. B. M., Karsai, I., Schepers, J., & Snijders, C. H. A. (1993). Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to *in vitro* selection for *Fusarium* head blight resistance. *Plant Science*, *94*, 195-206.
- Burow, G. B., Nesbitt, T. C., Dunlap, J., & Keller, N. P. (1997). Seed lipoxygenase products modulate *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *10*, 380-387.
- Castoria, R., de Luca, C., Fabbri, A. A., Passi, S., & Fanelli, C. (1989). By-products of lipoperoxidation and aflatoxin production. *Journal of Toxicology*, *8*, 349-360.
- Champeil, A., Dore, T., & Fourbet, J. F. (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.
- Chen, Z. Y., Brown, R. L., Lax, A. R., Guo, B. Z., Cleveland, T. E., & Russin, J. S. (1998). Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels is associated with a 14-kDa protein. *Phytopathology*, *88*, 276-281.
- Chen, Z. Y., Brown, R. L., Rajasekaran, K., Damann, K. E., & Cleveland, T. E. (2006). Identification of a maize kernel pathogenesis-related protein and evidence for its involvement in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Phytopathology*, *96*, 87-95.





- Chipley, J. R., & Uraih, N. (1980). Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, *40*, 352-357.
- Coleman, J. O. D., Blake-Kalff, M. M. A., & Davies, T. G. E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, *2*, 144-151.
- Dall'Asta, C., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G., Lemmens, M., & Krska, R. (2005). DON-glycosides: characterisation of synthesis products and screening for their occurrence in DON-treated wheat samples. *Mycotoxin Research*, *21*, 123-127.
- DeLuca, A. J. II, Palmgren, M. S., & Daigle, D. J. (1987). Depression of aflatoxin production by flavonoid-type compounds from peanut shells. *Phytopathology*, *77*, 1560-1563.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., & Spencer, G. F. (1988). Inhibition of trichothecene toxin biosynthesis by naturally occurring shikimate aromatics. *Phytochemistry*, *27*, 767-771.
- Desjardins, A. E., Hohn, T. M., & McCormick, S. P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiological Reviews*, *57*, 595-604.
- Doohan, F. M., Mentewab, A., & Nicholson, P. (2000). Antifungal activity toward *Fusarium culmorum* in soluble wheat extracts. *Phytopathology*, *90*, 666-671.
- Duvick, J. P., Rood, T., Rao, A. G., & Marshak, D. R. (1992). Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Biological Chemistry*, *267*, 18814-18820.
- Edwards, S. G. (2004). Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, *153*, 29-35.
- Egorov, T. A., Odintsova, T. I., Pukhalsky, V. A., & Grishin, E. V. (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, *26*, 2064-2073.
- El-Banna, A. A. (1987). Stability of citrinin and deoxynivalenol during germination process of barley. *Mycotoxin Research*, *3*, 37-41.
- Eriksen, G. S. (2003). Metabolism and toxicity of trichothecenes. Doctoral Thesis, Uppsala University, Sweden.
- Eriksen, G. S., Pettersson, H., & Lundh, T. (2004). Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology*, *42*, 619-624.
- Eudes, F., Comeau, A., Rioux, S., & Collin, J. (2000). Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with the fusariosis of wheat spikelets. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *22*, 286-292.
- Fabbri, A. A., Fanelli, C., Panfili, G., Passi, S., & Fasella, P. (1983). Lipoperoxidation and aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. *Journal of General Microbiology*, *129*, 3447-3452.
- Fanelli, C., & Fabbri, A. A. (1989). Relationship between lipids and aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia*, *107*, 115-120.
- Fanelli, C., Fabbri, A. A., Panfili, G., Castoria, R., Luca, C. D., & Passi, S. (1989). Aflatoxin congener biosynthesis induced by lipoperoxidation. *Experimental Mycology*, *13*, 61-68.
- Favre L., Verdal-Bonnin M. N., Pinson-Gadais L., Roumet P., Barreau C., & Richard-Forget F (2004, December). Does biochemical composition of durum wheat kernels influence the trichothecenes B (TCT B) contamination levels? (Paper presented at the 2<sup>nd</sup> International Symposium on *Fusarium* Head Blight, Orlando, Florida, USA).
- Friend, J. (1981). Plant phenolics, lignification and plant disease. *Progress in Phytochemistry*, *7*, 197-261.



- Fritig, B., Heitz, T., & Legrand, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, *10*, 16-22.
- Fuchs, E., Binder, E. M., Heidler, D., & Krska, R. (2002). Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food Additives and Contaminants*, *19*, 379-386.
- Fujita, M., & Yoshizawa, T. (1990). Metabolism of deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in sweet potato root tissues. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, *31*, 474-478.
- Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathways of plants. *Biochimica and Biophysica Acta*, *1084*, 221-239.
- Gareis, M., Bauer, J., Thiem, J., Plank, G., Grabley, S., & Gedek, B. (1990). Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin during digestion in swine. *Journal of Veterinary Medicine*, *37*, 236-240.
- Garvey, G. S., McCormick, S. P., & Rayment, I. (2007). Structural and functional characterization of the TRI101 trichothecene 3-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*; kinetic insights to combating *Fusarium* head blight. *Journal of Biological Chemistry*. DOI 10.1074/m705752200.
- Goodrich-Tanrikulu, M., Mahoney, N. E., & Rodriguez, S. B. (1995). The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Microbiology*, *141*, 2831-2837.
- Guiraud, P., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., & Benoit-Guyod, J. L. (1995). Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *32*, 29-33.
- Hazel, C. M., & Patel, S. (2004). Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters*, *153*, 51-59.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G., Bohm, V., & Bitsch, R. (2002). Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 6663-6668.
- Hua, S.-S. T., Grosjean, O.-K., & Baker, J. L. (1999). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology*, *29*, 289-291.
- Huang, Z., White, D. G., & Payne, G. A. (1997). Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. *Phytopathology*, *87*, 622-627.
- Huynh, Q. K., Hironaka, C. M., Levine, E. B., Smith, C. E., Borgmeyer, J. R., & Shah, D. M. (1992a). Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. *Journal of Biological Chemistry*, *267*, 6635-6640.
- Huynh, Q. K., Borgmeyer, J. R., & Zobel, J. F. (1992b). Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *182*, 1-5.
- Jones, P., & Vogt, T. (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, *213*, 164-174.
- Kachroo, A., He, Z. H., Patkar, R., Zhu, Q., Zhong, J., Li, D., Ronald, P., Lamb, C., & Chattoo, B. B. (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.
- 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.
- Kimura, M., Takahashi-Ando, N., Nishiuchi, T., Ohsato, S., Tokai, T., Ochiai, N., Fujimura, M., Kudo, T., Hamamoto, H., & Yamaguchi, I. (2006). Molecular biology and biotechnology for reduction of *Fusarium* mycotoxin contamination. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86, 117-123.
- Konopka, I., Czaplicki, S., & Rotkiewicz, D. (2006). Differences in content and composition of free lipids and carotenoids in flour of spring and winter wheat cultivated in Poland. *Food Chemistry*, 95, 290-300.
- Lee, S. E., Campbell, B. C., Molyneux, R. J., Hasegawa, S., & Lee, H. S. (2001). Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B1 biotransformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5171-5177.
- Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterházy, Á., Krska, R., & Ruckebauer, P. (2005). The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 1318-1324.
- Lempereur, I., Rouau, X., & Abecassis, J. (1997). Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25, 103-110.
- Lempereur, I., Surget, A., & Rouau, X. (1998). Variability in dehydrodiferulic acid composition of durum wheat (*Triticum durum* desf.) and distribution in milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 28, 251-258.
- 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.
- Mahoney, N., Molyneux, R. J., & Campbell, B. C. (2000). Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4418-4421.
- Mahoney, N., & Molyneux, R. J. (2004). Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1882-1889.
- Mallozzi, M. A. B., Correa, B., Haraguchi, M., & Neto, F. B. (1996). Effect of flavonoids on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Revista de Microbiologia*, 27, 161-165.
- Manoharan, M., Dahleen, L. S., Hohn, T. M., Neate, S. M., Yu, X. H., Alexander, N. J., McCormick, S. P., Bregitzer, P., Schwarz, P. B., & Horsley, R. D. (2006). Expression of 3-OH trichothecene acetyltransferase in barley (*Hordeum vulgare* L.) and effects on deoxynivalenol. *Plant Science*, 171, 699-706.
- Matern, U., & Kneusel, R. E. (1988). Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica*, 16, 153-170.
- McCormick, S. P., Bhatnagar, D., Goynes, W. R., & Lee, L. S. (1988). An inhibitor of aflatoxin biosynthesis in developing cottonseed. *Canadian Journal of Botany*, 66, 998-1002.
- McCormick, S. P., Alexander, N. J., Trapp, S. E., & Hohn, T. M. (1999). Disruption of *TRI101*, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5252-5256.



- McKeehen, J. D., Bush, R. H., & Fulcher, R. G. (1999). Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 1476-1482.
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Mirocha, C. G., & Komoróczy, R. (1999). Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding*, *118*, 97-110.
- Mesterházy, Á. (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.
- Miller, J. D., Young, J. C., & 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.
- Miller, J. D., & Young, J. C. (1985). Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *7*, 132-134.
- Miller, J. D., Young, J. C., & Sampson, D. R. (1985). Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *Phytopathologische Zeitschrift*, *113*, 359-367.
- Miller, J. D., & Arnison, P. G. (1986). Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *8*, 147-150.
- Miller, J. D., & 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., Fielder, D. A., Dowd, P. F., Norton, R. A., & Collins, F. W. (1996). Isolation of 4-acetylbenzoxazolin-2-one (4-ABOA) and diferuloylputrescine from an extract of *Gibberella* ear rot-resistant corn that blocks mycotoxin biosynthesis, and the insect toxicity of 4-ABOA and related compounds. *Biochemical Systematics and Ecology*, *24*, 647-658.
- Mitterbauer, R., & Adam, G. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*: useful model systems for the identification of molecular mechanisms involved in resistance of plants to toxins. *European Journal of Plant Pathology*, *108*, 699-703.
- Moore, J., Liu, J. G., Zhou, K. Q., & Yu, L. L. (2006). Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 5313-5322.
- Mpofu, A., Sapirstein, H. D., & Beta, T. (2006). Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 1265-1270.
- Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Trick, H. N., & Gill, B. S. (2001). Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *64*, 93-114.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, *1054*, 95-111.
- Nagarajan, V., & Bhat, R. V. (1972). Factor responsible for varietal differences in aflatoxin in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *20*, 911-914.
- Nesci, A. V., & Etcheverry, M. G. (2006) Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. *Pest Management Science*, *62*, 775-784.





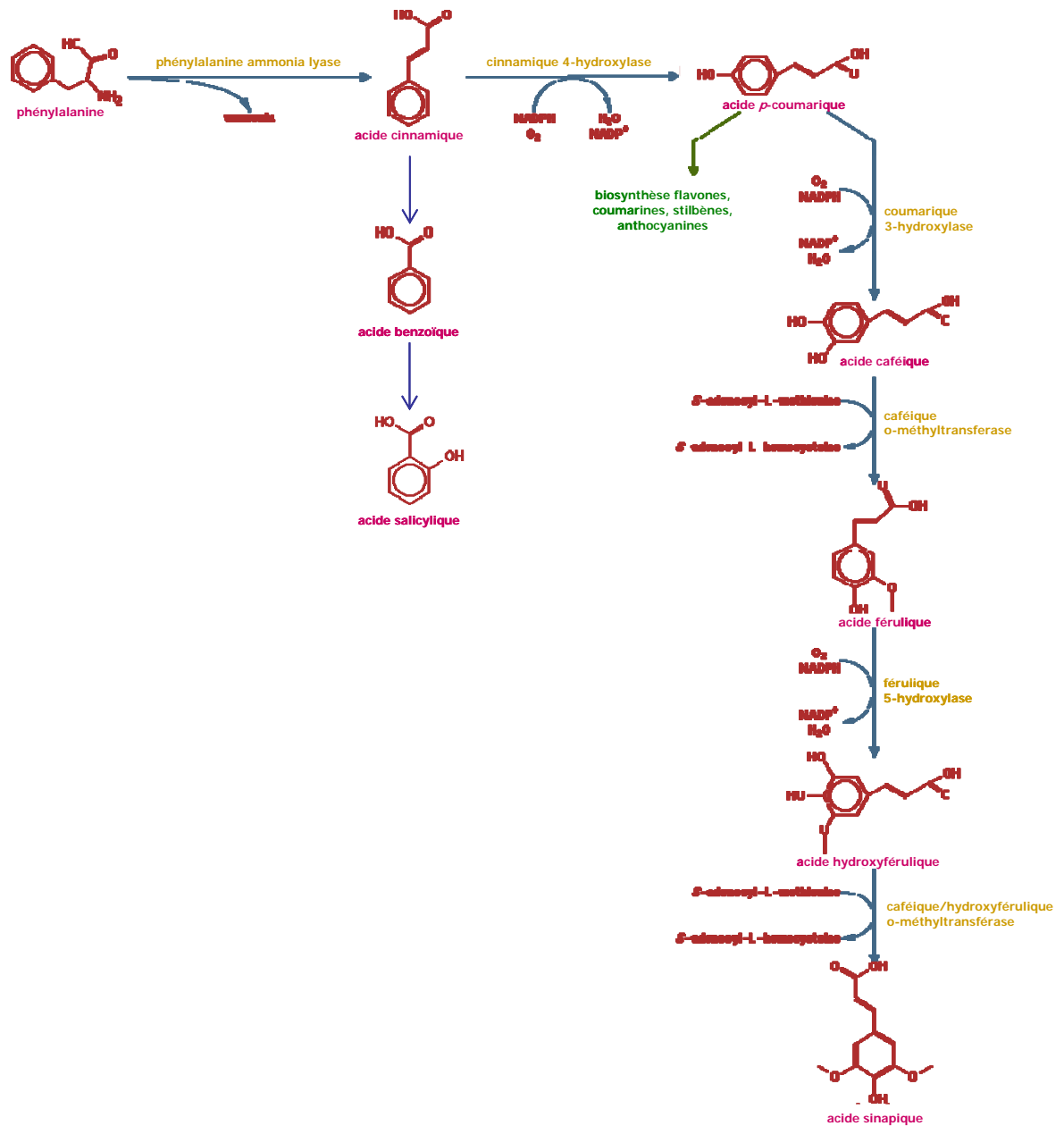
- Neucere, J. N., & Godshall, M. A. (1991). Effects of base-soluble proteins and methanol-soluble polysaccharides from corn on mycelial growth of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, *113*, 103-108.
- Nicholson, R. L., & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic-compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, *30*, 369-389.
- Norton, R. A. (1997). Effect of carotenoids on aflatoxin B1 synthesis by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, *87*, 814-821.
- Norton, R. A. (1999). Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus* by anthocyanidins and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 1230-1235.
- Ohsato, S., Ochiai-Fukuda, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Koizumi, S., Hamamoto, H., Kudo, T., Yamaguchi, I., & Kimura, M. (2007). Transgenic rice plants expressing trichothecene 3-O-acetyltransferase show resistance to the *Fusarium* phytotoxin deoxynivalenol. *Plant Cell Reports*, *26*, 531-538.
- Okubara, P. A., Blechl, A. E., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Dill-Macky, R., & Hohn, T. M. (2002). Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene. *Theoretical and Applied Genetics*, *106*, 74-83.
- Passi, S., Nazzaro-Porro, M., Fanelli, C., Fabbri, A. A., & Fasella, P. (1984). Role of lipoperoxidation in aflatoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *19*, 186-190.
- Paster, N., Juven, B. J., & Harshemesh, H. (1988). Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, *64*, 293-297.
- Peyron, S., Surget, A., Mabile, F., Autran, J. C., Rouau, X., & Abecassis, J. (2002). Evaluation of tissue dissociation of durum wheat grain (*Triticum durum* Desf.) generated by the milling process. *Journal of Cereal Science*, *36*, 199-208.
- Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Chaurand, M., Gregoire, S., Monmarson, M., & Richard-Forget, F. (2007). Distribution of toxigenic *Fusarium spp.* and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. *Food Additives and Contaminants*, *24*, 53-62.
- 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*, *68*, 223-228.
- Ponts, N. (2005). Influence de stress oxydatifs sur la biosynthèse de mycotoxines de *Fusarium spp.* contaminantes de l'épi de Maïs. Doctoral Thesis, Bordeaux University, France.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M. N., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2006). Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*, *258*, 102-107.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., & Ouellet, T. (2007). Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters*, *581*, 443-447.
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glossl, J., Luschnig, C., & Adam, G. (2003). Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 47905-47914.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., & McCormick, S. P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *8*, 593-601.



- Regnier, T., & Macheix, J. J. (1996). Changes in wall-bound phenolic acids, phenylalanine and tyrosine ammonia-lyases, and peroxidases in developing durum wheat grains (*Triticum turgidum* L var *Durum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 1727-1730.
- Reid, L. M., Mather, D. E., Arnason, J. T., Hamilton, R. I., & Bolton, A. T. (1992). Changes in phenolic constituents of maize silk infected with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Botany*, *70*, 1697-1702.
- 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.
- Rocha, O., Ansari, K., & Doohan, F. M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, *22*, 369-378.
- Savard, M. E. (1991). Deoxynivalenol fatty acid and glucoside conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 570-574.
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Taubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner A. P., & Binder, E. M. (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition and Food Research*, *50*, 543-551.
- Schneweis, I., Meyer, K., Engelhardt, G., & Bauer, J. (2002). Occurrence of zearalenone-4-beta-D-glucopyranoside in wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1736-1738.
- Schroeder, H. W., & Christensen, J. J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zea*. *Phytopathology*, *53*, 831-838.
- Scott, P. M., Nelson, K., Kanhere, S. R., Karpinski, K. F., Hayward, S., Neish, G. A., & Teich, A. H. (1984). Decline in deoxynivalenol (vomitoxin) concentrations in 1983 Ontario winter wheat before harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, *48*, 884-886.
- Sewald, N., Vongleissenthall, J. L., Schuster, M., Muller, G., & Aplin, R. T. (1992). Structure elucidation of a plant metabolite of 4-desoxynivalenol. *Tetrahedron-Asymmetry*, *3*, 953-960.
- Sinha, K. K., & Singh, P. (1981). Effect of some phenolics on aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus*. *Indian Phytopathology*, *34*, 530-531.
- Sinha, K. K. (1990). Prevention of aflatoxin production in some cereals and oil-seeds by natural plant constituents. *Irish Journal of Food Science and Technology*, *14*, 109-120.
- Siranidou, E., Kang, Z., & Buchenauer, H. (2002). Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *Journal of Phytopathology*, *150*, 200-208.
- Snijders, C. H. A. (2004). Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. *Toxicology Letters*, *153*, 37-46.
- Swanson, S. P., Rood, H. D., Jr., Behrens, J. C., & Sanders, P. E. (1987). Preparation and characterization of the deepoxy trichothecenes: deepoxy HT-2, deepoxy T-2 triol, deepoxy T-2 tetraol, deepoxy 15-monoacetoxyscirpenol and deepoxy scirpentriol. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*, 2821-2826.
- Swanson, S. P., Helaszek, C., Buck, W. B., Rood, H. D., Jr., & Haschek, W. M. (1988). The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*, *26*, 823-829.
- Uraih, N., Cassity, T. R., & Chipley, J. R. (1977). Partial characterization of the mode of action of benzoic acid on aflatoxin biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, *23*, 1580-1584.



- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *55*, 85-97.
- Vergopoulou, S., Galanopoulou, D., & Markaki, P. (2001). Methyl jasmonate stimulates aflatoxin B1 biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 3494-3498.
- Vigers, A. J., Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *4*, 315-323.
- Wakulinski, W. (1989). Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight). *Acta Physiologiae Plantarum*, *11*, 301-306.
- Wallace, G., & Fry, S. C. (1994). Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology*, *151*, 229-267.
- Wang, Y. Z., & Miller, J. D. (1988). Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance. *Journal of Phytopathology*, *122*, 118-125.
- Wicklow, D. T., Norton, R. A., & McAlpin, C. E. (1998).  $\beta$ -Carotene inhibition of aflatoxin biosynthesis among *Aspergillus flavus* genotypes from Illinois corn. *Mycoscience*, *39*, 167-172.
- Wu, X., Murphy, P., Cunnick, J., & Hendrich, S. (2007). Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. *Food and Chemical Toxicology*, *45*, 1846-1855.
- Yao, Q., Liu, Z., & Zeng, Y. (1996). Detoxification of deoxynivalenol by scab resistant wheat and the bioactivities of the product. *Acta Mycologica Sinica*, *15*, 59-64.
- Zeringue, H. J., Jr., Brown, R. L., Neucere, J. N., & Cleveland, T. E. (1996). Relationships between C6-C12 alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 403-407.
- Zhou, W. C., Kolb, F. L., & Riechers, D. E. (2005). Identification of proteins induced or upregulated by *Fusarium* head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, *48*, 770-780.



**Figure 17 : Voie de biosynthèse des acides phénoliques chez *Arabidopsis thaliana*.**

source: <http://www.arabidopsis.org:1555/ARA/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY1F-467>

<http://www.arabidopsis.org:1555/ARA/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-2181>

<http://www.arabidopsis.org:1555/ARA/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-981>

### **III. Les acides phénoliques des parois et leurs rôles dans les mécanismes de résistance du blé**

Les acides phénoliques sont présents chez toutes les plantes et leurs rôles dans les mécanismes de résistance a été décrits par de nombreux chercheurs (Friend, 1981 ; Bell, 1981 ; Matern et Kneusel, 1988 ; Nicholson et Hammerschmidt, 1992 ; Métraux et Raskin, 1993). Ils interviendraient dans les mécanismes de défense des plantes en tant que constituants des parois cellulaires, en tant que composés antimicrobiens constitutifs des plantes ou induits en réponse à l'infection et en tant que molécule signal (Métraux et Raskin, 1993).

#### **III. 1. Les acides phénoliques des parois cellulaires**

Les acides phénoliques sont des composés aromatiques qui contiennent au moins un groupement carboxylique et un cycle phénolique. Ces composés sont issus de la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes à partir de la phénylalanine dérivée de la voie des shikimates (figure 17). Les acides phénoliques sont dérivés des acides cinnamiques et benzoïques. Ils sont situés à des carrefours métaboliques importants puisqu'ils sont précurseurs d'un grand nombre de composés secondaires tels que les stilbènes, les coumarines, les flavones, la lignine et les anthocyanes notamment.

Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique fluorescent sous UV dans le bleu ce qui permet en particulier d'étudier leur distribution histologique par microscopie UV. Cette technique a été utilisée par Fulcher *et al.* (1972) pour étudier la distribution de l'acide férulique dans la couche à aleurone de blé. Puis, des techniques de microspectrofluorométrie ont été utilisées et ont permis de quantifier et d'étudier la distribution des acides phénoliques dans les grains entiers (Sen *et al.*, 1991 ; Sen *et al.*, 1994 ; Akin, 1995). C'est dans les parois cellulaires des cellules de la couche à aleurone et des sons de blé que les concentrations en acides phénoliques sont les plus élevées, et, ces composés sont aussi présents dans le germe. Les acides phénoliques sont présents chez les céréales sous une forme libre et sous des formes conjuguées (estérifiées ou glycosylées).

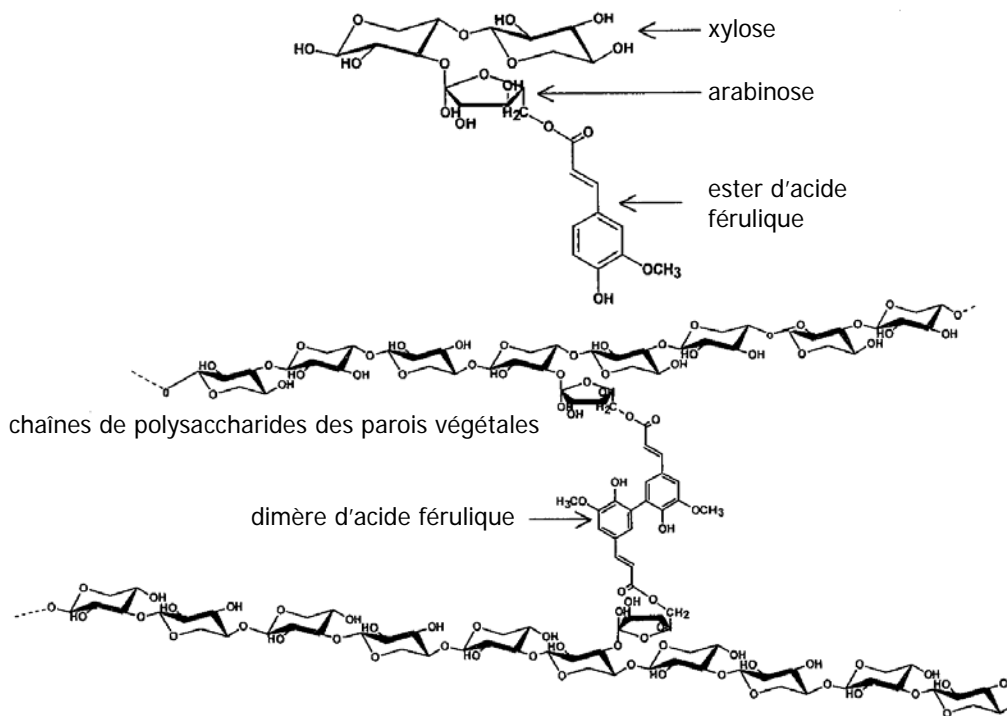


Figure 18 : Complexe entre l'acide férulique et les polysaccharides de la paroi des céréales (Wallace et Fry, 1994 ; Bily, 2003).

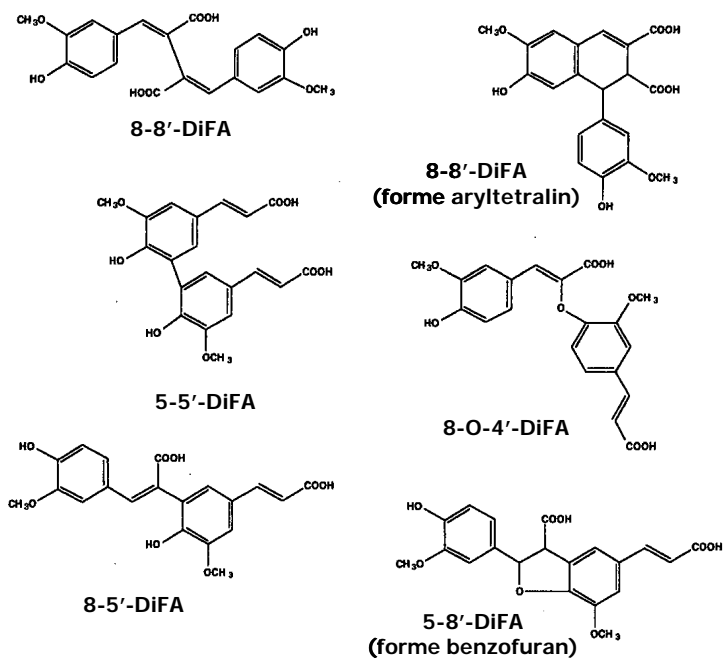


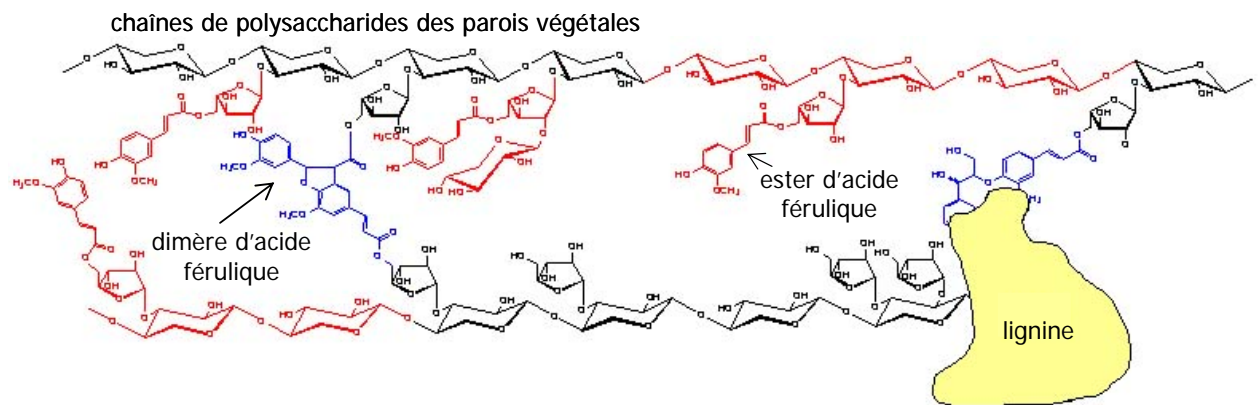
Figure 19 : Exemples de dimères d'acide férulique (Waldron *et al.*, 1996).



Plusieurs acides phénoliques sont présents dans les grains de blé, il s'agit en particulier des acides férulique, vanillique, gentisique, caféique, salicylique, syringique, *p*-coumarique, *p*-hydroxybenzoïque ; et des aldéhydes tels que la vanilline et le syringaldéhyde (Naczki et Shahidi, 2006). L'acide férulique est l'acide phénolique largement majoritaire des grains (Klepacka et Fornal, 2006). Les acides phénoliques existent sous formes solubles libres ou conjuguées (phénoliques solubles libres, phénoliques solubles esters, phénoliques solubles glycosides). La majorité des acides phénoliques sont en fait insolubles. Cependant, ils sont extraits des parois cellulaires par une hydrolyse alcaline (phénoliques insolubles liés aux parois).

Les acides phénoliques des parois cellulaires sont liés aux chaînes de polysaccharides. Les parois cellulaires des sons de blé sont riches en arabinose et en xylose avec des quantités significatives de glucose et d'acides uroniques et des quantités relativement faibles de galactose et de mannose (Parker *et al.*, 2005). L'acide férulique serait le plus souvent lié par des liaisons ester avec les résidus arabinose des chaînes d'arabinoxylanes (polymères de xylose et d'arabinose) (figure 18). De la même façon, l'acide *p*-coumarique peut être estérifié aux chaînes d'arabinoxylanes mais dans une moindre proportion que l'acide férulique, il apparaît plus souvent associé aux lignines (Jung, 1989). L'acide férulique se trouverait aussi lié aux glycoprotéines pariétales.

Les esters d'acide férulique liés aux polysaccharides des parois créent des réticulations. Des réactions de couplage oxydatif catalysées par des peroxydases aboutissent à la formation de dimères ou déhydrodimères d'acide férulique (DiFA) qui permettent ainsi la formation de liaison entre deux chaînes d'arabinoxylanes (figure 18). De nombreux isomères de dimères d'acide férulique ont été identifiés dans les sons de blé (figure 19). L'isomère 5-5'-DiFA a été isolé pour la première fois de la paroi cellulaire de germes de blé par Markwalder et Neukom en 1976. Waldron *et al.* (1996) ont identifié les isomères 8-O-4'-DiFA, 8-5'-DiFA et 5-5'-DiFA dans les parois cellulaires des chaumes de blé. A partir de grain de blé, divers isomères de dimères d'acide férulique ont été identifiés dans les parois cellulaires : 8-5'-DiFA, 8-O-4'-DiFA, 8-8'-DiFA, 5-5'-DiFA et 4-O-5' DiFA (Bunzel *et al.*, 2000 ; Renger et Steinhart, 2000 ; Bunzel *et al.*, 2001). Dans les parois cellulaires des sons de blé, Parker *et al.* (2005) ont isolé les isomères 8-8'-DiFA (forme aryltetralin), 5-8'-DiFA, 5-5'-DiFA, 8-O-4'-DiFA et 5-8'-DiFA (forme benzofuran). La présence de déhydrodimères d'acide sinapique ainsi que d'hétérodimères d'acide férulique et d'acide sinapique a été rapporté dans les parois cellulaires de grains de céréales (Bunzel *et al.*, 2003a ; Bunzel *et al.*, 2003b). La dimérisation



**Figure 20 : Les acides phénoliques des parois cellulaires lient les chaînes de polysaccharides entre elles et avec les autres composés des parois, incluant la lignine.**

source : <http://www.chemie.uni-hamburg.de/lc/ballaststoffe.html>

oxydative des esters d'acide férulique peut se produire théoriquement à deux endroits : dans le compartiment intracellulaire, dans l'appareil de Golgi ou dans le compartiment extracellulaire au niveau de la paroi (Grabber *et al.*, 1998 ; Fry *et al.*, 2000 ; Bily, 2003). Fry *et al.* (2000) suggèrent que ces deux mécanismes coexistent *in planta*, la dimérisation intracellulaire serait majoritaire dans les tissus en croissance alors que la dimérisation extracellulaire aurait lieu dans les tissus âgés ou en réponse à une infection.

Les acides phénoliques des parois cellulaires jouent également un rôle très important dans les liaisons des polysaccharides avec les autres composés des parois cellulaires, incluant la lignine par des liaisons ester et éther (figure 20). La lignine est un hétéropolymère tridimensionnel formé d'unités monomériques de type phényl-propanol (Seyer, 2005). Les trois monomères majeurs sont l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. La composition en monomères varie suivant l'espèce considérée (Seyer, 2005 ; Bunzel *et al.*, 2004). Les sons de céréales sont décrits comme fortement lignifiés. Dans divers grains de céréales, incluant le blé, la lignine serait reliée aux chaînes de polysaccharides par l'acide férulique des parois cellulaires (Bunzel *et al.*, 2004 ; Klepacka et Fornal, 2006). Les esters d'acide férulique liés aux polysaccharides des parois créent ainsi des sites de nucléation pour le processus de lignification (Bunzel *et al.*, 2004).

### **III. 2. Rôle des acides phénoliques dans les mécanismes de résistance du blé**

#### **III. 2. 1. La paroi : barrière physique à l'infection**

La paroi végétale constitue une véritable barrière physique de défense contre les pathogènes. En réponse à l'infection, les acides phénoliques seraient synthétisés rapidement par la plante et polymérisés dans les parois cellulaires (Matern et Kneusel, 1988). Les acides phénoliques estérifiés aux polysaccharides consolident et stabilisent les parois cellulaires. Plusieurs études ont suggéré une relation entre le contenu en acides phénoliques (acide férulique, acide *p*-coumarique) des grains et le niveau de résistance à la fusariose chez le blé (McKeehen *et al.*, 1999 ; Siranidou *et al.*, 2002) et chez le maïs (Assabgui *et al.*, 1993).

McKeehen *et al.* (1999) ont étudié le contenu en acides phénoliques de six variétés de blé présentant des niveaux de résistance à la fusariose différents au cours du développement de la plante, de l'anthèse à la maturité. Un jour après l'anthèse, les acides férulique et *p*-



coumarique sont les acides phénoliques les plus importants dans les grains pour toutes les variétés, présent à un ratio de 3:1 (férule: *p*-coumarique). A trois jours après l'anthèse, le ratio d'acide férulique par rapport à l'acide *p*-coumarique est de 18:1 dans la variété cv. 2375. A maturité, ce ratio est d'environ 62:1, et l'acide sinapique a remplacé l'acide *p*-coumarique en tant que deuxième acide phénolique majoritaire des grains. A maturité, la concentration en acide férulique des six variétés est identique. McKallum et Walker (1991) ont suggéré que deux pics de synthèse d'acide férulique existeraient et serait associés à la différenciation de différents tissus. Au cours des 10-12 premiers jours après l'anthèse, le testa se différencie du péricarpe puis, entre 12 et 24 jours après l'anthèse, la couche à aleurone se différencie (Simmonds et O'Brien, 1981). McKeehen *et al.* (1999) rapportent que la variété de blé résistante à la fusariose (cv. Sumaï) synthétise des concentrations plus élevées en acide férulique que la variété sensible (cv. Roblin) pendant 25 jours après l'anthèse. A sept jours après l'anthèse, la concentration en acide férulique est même deux fois plus importante dans les grains de la variété résistante par rapport à la variété sensible. McKeehen *et al.* (1999) observent également ces deux périodes de synthèse d'acide férulique au cours du développement des grains. Entre 0 et 10 jours après anthèse, la synthèse en acide férulique plus importante dans les grains de la variété Sumaï contribuerait à sa résistance en limitant la pénétration initiale du champignon par la différenciation des tissus externes du grain. Puis, entre 10 et 25 jours après anthèse, la synthèse en acide férulique plus importante dans les grains de la variété Sumaï contribuerait à sa résistance en limitant la prolifération du champignon par la différenciation de la couche à aleurone. Dans la variété sensible, l'endosperme est alors plus accessible au champignon et constitue un excellent milieu de croissance pour le champignon.

En réponse à l'infection par *Fusarium*, il a été observé que le contenu en acides phénoliques augmentaient dans les grains de variétés de maïs ou blé résistantes à la fusariose (Reid *et al.*, 1992 ; Siranidou *et al.*, 2002). Au contraire, dans les grains des variétés de maïs sensibles, Reid *et al.* (1992) ont observé que le contenu en acides phénoliques diminue en réponse à l'infection. Les auteurs suggèrent que cette diminution du contenu en acides phénoliques pourrait être due à une dégradation des acides phénoliques par le pathogène ou à une inhibition de leur biosynthèse. L'inhibition de leur biosynthèse pourrait être due aux trichothécènes produits par le champignon, connus pour être des inhibiteurs de la synthèse protéique.



En réponse à l'infection, une modification des parois cellulaires a lieu, c'est le processus de lignification. La lignine confère aux végétaux des propriétés d'imperméabilité et de résistance aux attaques microbiennes puisque c'est essentiellement un matériel inerte (Seyer, 2005). Ce processus permet d'établir des barrières mécaniques à l'invasion des pathogènes. Dans leur étude, Siranidou *et al.* (2002) rapportent qu'il existe une différence de contenu en lignine dans les parois cellulaires de l'hôte adjacentes au site de l'infection entre les variétés résistantes et les variétés sensibles de blé. De plus, la lignification diminue la diffusion des toxines sécrétées par le champignon dans les cellules hôtes et réduit les flux de nutriments des cellules hôtes vers le pathogène (Siranidou *et al.*, 2002).

Bily *et al.* (2003) ont montré pour la première fois l'existence d'une relation entre le contenu des grains en dimère d'acides férulique et la résistance à la fusariose du maïs. Les dimères d'acide férulique stabilisent et renforcent l'intégrité physique des parois cellulaires. Les parois deviennent plus résistantes aux enzymes fongiques de dégradation des parois. En effet, la présence des dimères d'acides phénoliques dans les parois cellulaires diminuent leurs dégradation *in vitro* par les hydrolases fongiques, comme par exemple les estérases produites par *Aspergillus* (Grabber *et al.*, 1998). Suite aux résultats de Bily (2003), d'autres études ont montré une relation entre le contenu en dimère d'acide férulique et la résistance à la pourriture par *F. graminearum* de la tige chez le maïs (Santiago *et al.*, 2007), la résistance à différents insectes du maïs (Garcia-Lara *et al.*, 2004 ; Santiago *et al.*, 2006a ; Santiago *et al.*, 2006b). Bily (2003) suggère une dimérisation induite des acides férulique de la paroi des couches externes de grains de maïs en réponse à l'infection par *F. graminearum*.

En tant que constituants des parois cellulaires, les acides phénoliques des grains semblent clairement impliqués dans les mécanismes de résistance à la pénétration du pathogène (résistance de type I) et à sa prolifération dans l'hôte (résistance de type II). La plupart des pathogènes doivent dégrader la paroi afin d'envahir les cellules hôtes. Les produits de dégradation des parois végétales sont souvent impliqués dans les mécanismes de reconnaissance du pathogène par la plante, au même titre que les éliciteurs fongiques (fragment de paroi fongique). La libération, sous contrôle enzymatique, de l'acide férulique des parois végétales est un phénomène largement étudié chez les champignons (Mathew et Abraham, 2004). L'activité feruloyl esterase d'*Aspergillus niger* permet la libération d'acide férulique des sons de blé (Faulds et Williamson, 1995). Topakas *et al.* (2003) ont purifié et caractérisé une feruloyl esterase chez *F. oxysporum* capable de libérer de l'acide férulique des





sons de blé. L'activité feruloyl esterase a également été trouvée chez *F. proliferatum* (Shin et Chen, 2006). La libération de dimères d'acide férulique, sous l'action de feruloyl esterase, des sons de blé a été rapportée (Bartolome *et al.*, 1997 ; Topakas et Christakopoulos, 2004). Les acides phénoliques ainsi libérés des parois cellulaires pourraient alors jouer un rôle en tant que molécules antifongiques.

### III. 2. 2. Les acides phénoliques : molécules antifongiques

Il est possible de classer les composés antimicrobiens des plantes en deux catégories (VanEtten *et al.*, 1994) :

- les phytoalexines : composés antimicrobiens synthétisés *de novo* qui s'accumulent sur le site de l'infection,
- les phytoanticipines : composés constitutifs des plantes qui interviennent sous forme native ou après transformation, généralement hydrolyse.

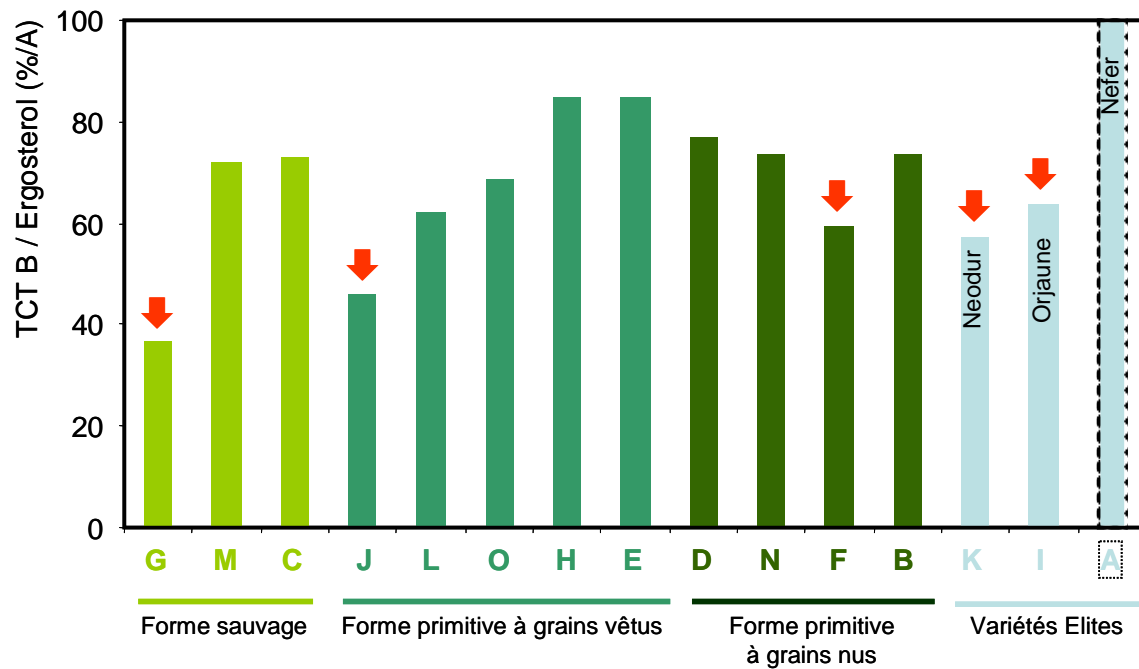
En réponse à l'infection, il a été observé une augmentation des teneurs en acides phénoliques dans les grains de blé ou de maïs résistant à la fusariose (Reid *et al.*, 1992 ; Siranidou *et al.*, 2002). Cette augmentation des teneurs en acides phénoliques pourrait provenir d'une synthèse (phytoalexine) ou d'une libération des acides phénoliques des parois (phytoanticipine). La présence des acides phénoliques dans les complexes des parois cellulaires suggère un rôle constitutif de ces composés. Les formes liées à la paroi de l'acide férulique peuvent subir une hydrolyse par des feruloyl esterase fongique et se retrouver disponibles pour l'interaction.

Les acides phénoliques sont fongitoxiques vis-à-vis de nombreux champignons, incluant *Fusarium* (Guiraud *et al.*, 1995). *In vitro*, Guiraud *et al.* (1995) ont déterminé une CI<sub>50</sub> (concentration inhibant 50% de la croissance fongique) d'environ 5 mM (soit 970 µg/g) pour l'acide férulique vis-à-vis de *Fusarium coeruleum*, *F. moniliforme* ou *F. solani*. Vis-à-vis de *F. graminearum* et *F. culmorum*, la CI<sub>50</sub> de l'acide férulique est respectivement de 668 µg/g et 329 µg/g (McKeehen *et al.*, 1999). Assabgui *et al.* (1993) rapportent des valeurs similaires de CI<sub>50</sub> de 647 µg/g vis-à-vis de *F. graminearum*. Au laboratoire, des valeurs similaires ont été obtenues concernant les CI<sub>50</sub> de divers acides phénoliques vis-à-vis de *F. graminearum* et ont permis de classer les acides phénoliques en fonction de leur CI<sub>50</sub>, du moins inhibiteur au plus inhibiteur : acide *p*-hydroxybenzoïque < acide gallique < acide protocatéchique < acide



sinapique < acide caféique < acide syringique < acide *p*-coumarique < acide férulique (Favre, 2004). Comme l'ont suggéré Guiraud *et al.* (1995), la toxicité des acides phénoliques vis-à-vis des champignons pourrait être liée à leurs propriétés lipophiles, c'est-à-dire leur aptitude à pénétrer dans les cellules. Cependant, il semble que la toxicité des acides phénoliques soit aussi liée à leur interaction avec diverses enzymes fongiques intra ou extracellulaires, incluant les phénol oxydases (Guiraud *et al.*, 1995). Les acides phénoliques sont décrits comme de puissants inhibiteurs d'activités hydrolytiques (Jecu, 1997 ; El Modafar *et al.*, 2000 ; Paul *et al.*, 2003). Les acides phénoliques possèdent des propriétés antioxydantes fortes (Rice-Evans *et al.*, 1996). De nombreuses études ont démontré un effet inhibiteur de divers composés antioxydants sur la croissance de divers champignons, incluant *Fusarium* (Thompson, 1992 ; Thompson *et al.*, 1993 ; Thompson, 1996a ; Etcheverry *et al.*, 2002 ; Reynoso *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2003). Il a été suggéré par Adams et Moss (1995) que les antioxydants pourraient agir au niveau de la membrane cellulaire, entraînant une altération de la perméabilité membranaire.

Les céréales contiennent des acides phénoliques solubles, en faibles quantités. Dans les sons de blé, le contenu en acides phénoliques solubles (libre et estérifié) est d'environ 80 µg/g (Kim *et al.*, 2006). Ces concentrations dans le grain de blé ne permettent pas d'attribuer un rôle fongitoxique significatif aux acides phénoliques solubles, rappelons que *in vitro* la CI<sub>50</sub> en acide férulique vis-à-vis de *F. graminearum* et de *F. culmorum* est de respectivement 668 et 329 µg/g (McKeehen *et al.*, 1999). Néanmoins, Bily (2003) a démontré que dix jours après l'inoculation par *F. graminearum*, l'acide férulique libre est présent en plus grande quantité dans les tissus de grains de maïs infectés. En réponse à l'infection, les formes estérifiées d'acides phénoliques peuvent subir une hydrolyse ou des acides phénoliques peuvent être synthétisés par la plante et se retrouver disponibles pour l'interaction. Il a été montré qu'à 50 µg/mL, l'acide férulique inhibe 57% de la production de trichothécènes B par *F. graminearum* (Bily, 2003). Cependant, ceci a été montré pour une souche et ce résultat est à confirmer. A 1 µg/mL, l'acide férulique inhibe la production de fumonisines B1 par *F. verticillioides* de 90% sans affecter la croissance (Beekrum *et al.*, 2003). Ceci suggère que les acides phénoliques pourraient avoir un rôle "anti mycotoxines", c'est-à-dire qu'ils seraient capables de limiter la biosynthèse des mycotoxines.



**Figure 21 : Niveaux de contamination des grains en TCT B de 15 variétés de blé dur inoculées artificiellement avec une souche de *F. culmorum* productrice de nivalenol (Favre *et al.*, 2004).**

Les niveaux de TCT B sont exprimés en niveau relatif par rapport aux teneurs des grains en ergostérol, puis, exprimés en % par rapport à la variété A (Nefer).

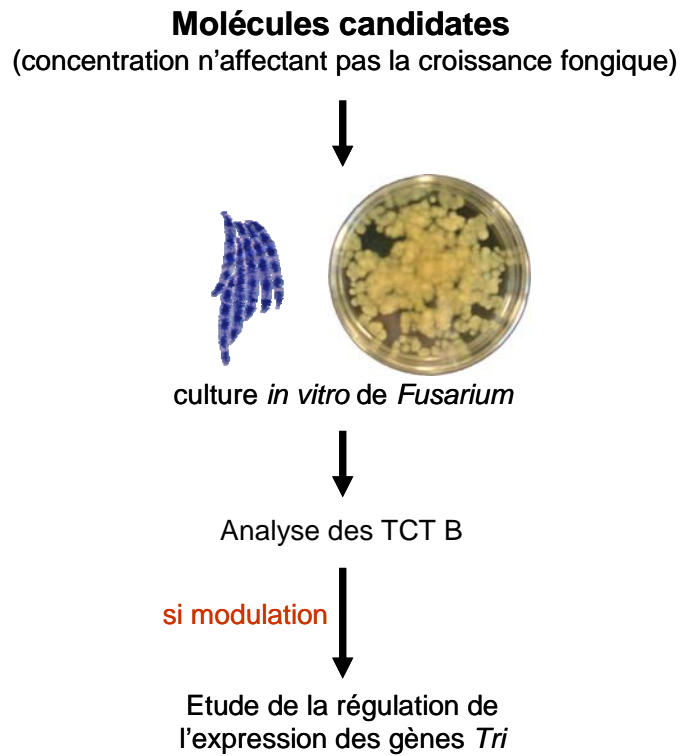
## **IV Présentation des objectifs et démarche expérimentale**

### **IV. 1. Présentation des objectifs**

Chez le blé dur (*Triticum turgidum* subsp.), il n'existe pas actuellement de variétés résistantes à la fusariose. Cependant, dans une étude antérieure, l'existence d'une gamme de sensibilité à l'accumulation des TCT B a été mise en évidence (Favre *et al.*, 2004). Quinze variétés de blé dur ont été inoculées par une souche de *Fusarium* productrice de nivalenol et les niveaux de contamination fongique et d'accumulation de TCT B des grains ont été analysés. Alors que de faibles différences étaient observées entre les différentes variétés au niveau du développement fongique, certaines variétés présentaient une contamination en TCT B limitée (figure 21). L'hypothèse est la présence de composés inhibiteurs ou l'absence d'inducteurs de la biosynthèse des mycotoxines de *Fusarium* dans certaines variétés de blé dur ou la présence d'activités biologiques qui pourraient métaboliser et par conséquent détoxifier les toxines (pour revue, voir Boutigny *et al.*, soumis). Ceci suggère que même pour des variétés pour lesquelles une résistance au développement fongique ne peut pas être sélectionnée, des variétés accumulant moins de mycotoxines pourraient être sélectionnées.

Au cours d'études précédentes, menées au laboratoire, deux souches de *Fusarium* ont été cultivées *in vitro* sur différents substrats : grains entier, semoule ou sons de blé dur (Pinson-Gadais *et al.*, 2007). Alors que la production de biomasse fongique (estimée par le contenu en ergostérol) était peu différente selon les conditions de culture, les niveaux de TCT B produits étaient moins importants lorsque la culture était réalisée sur les sons de blé que sur semoule ou grains entiers. Ces résultats suggéraient la présence de composés inhibiteurs ou l'absence d'inducteurs de la toxinogénèse dans les sons de blé dur. Dans des cultures liquides de *Fusarium* supplémenté avec des sons de blé dur, une inhibition de la biosynthèse des TCT B a ensuite été démontrée (Pinson-Gadais *et al.*, 2007). Il a alors été suggéré la présence de composés inhibiteurs de la biosynthèse des TCT B localisées dans les sons de blé dur.

**Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de rechercher, de purifier et de caractériser des composés modulateurs de la biosynthèse des TCT B présents dans les sons de blé dur et d'analyser les mécanismes impliqués dans ces modulations de la mycotoxinogénèse.**



**Figure 22 : Démarche expérimentale suivie au cours de l'étude *in vitro* de l'effet de molécules candidates sur la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*.**

Les molécules candidates sont additionnées aux cultures liquides de *Fusarium* à des concentrations n'affectant pas la croissance du mycélium. Après incubation, les milieux de culture sont analysés pour leur contenu en TCT B. Si une modulation des niveaux de TCT B produits est observée, alors les niveaux d'expression des gènes *Tri* sont analysés.

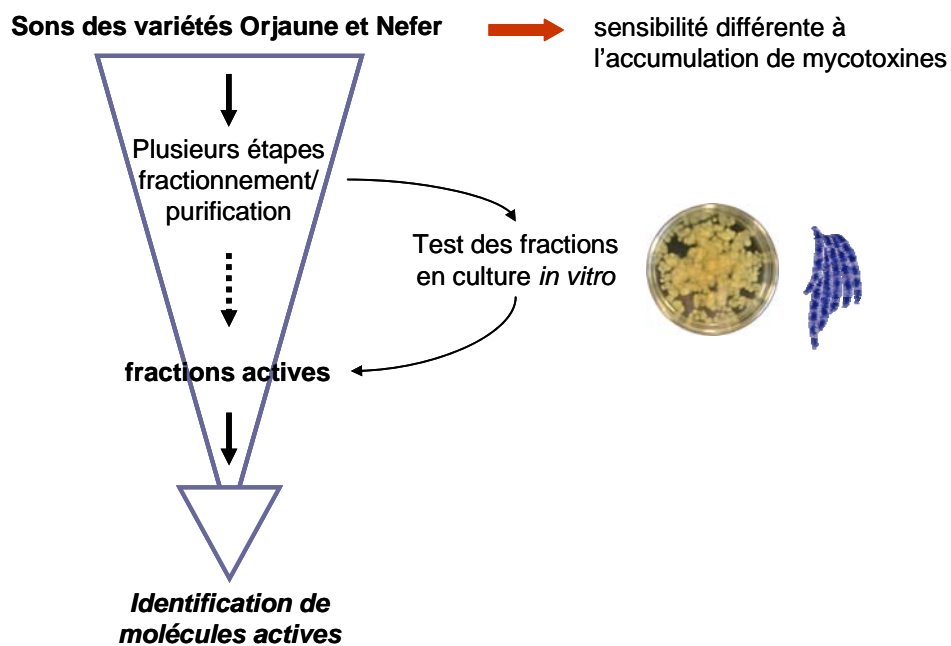
## IV. 2. Démarche expérimentale

Parmi les composés des sons de blé dur, des composés solubles et/ou des composés liés aux parois pourraient jouer un rôle dans la modulation de la mycotoxinogénèse. En effet, lors de l'interaction entre *Fusarium* et son hôte, les composés solubles des tissus externes des grains seraient les premiers composés à être en contact avec le champignon à la surface du grain de blé. Puis, au cours de la progression de *Fusarium* dans le grain, le champignon serait en contact avec des composés liés aux parois, libérés sous l'action du pathogène.

Afin de caractériser des composés modulateurs de la biosynthèse des TCT B présents dans les sons de blé dur, la démarche expérimentale s'est orientée autour de trois axes.

Une première partie très importante de notre étude a consisté en la mise en place de nouvelles conditions expérimentales pour l'étude *in vitro* de la régulation de la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. L'optimisation d'un nouveau système de culture était indispensable compte tenu des problèmes de fluctuations inter et intra expérimentations du potentiel toxigène de *Fusarium* dans le système de culture classiquement utilisé au laboratoire. Il était également important de miniaturiser et de faciliter la mise en place du système de culture afin d'augmenter le nombre des expérimentations et de pouvoir étudier l'effet de composés modulateurs sur de petites quantités.

Afin de caractériser l'effet modulateur de la biosynthèse des TCT B de composés présents dans les sons de blé dur, la première stratégie utilisée a été celle de cibler des molécules candidates pour étudier leur effet "anti mycotoxine". L'article précédent (Boutigny *et al.*, soumis) passe en revue les différentes molécules candidates ayant des effets modulateurs de la biosynthèse des mycotoxines de *Fusarium*, en particulier les composés phénoliques, les peptides, les caroténoïdes, le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes dérivés de l'acide linoléique. Les effets du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes sur la biosynthèse des TCT B par *F. graminearum* ont été largement étudiés par Ponts (2005), montrant que ces molécules pro oxydantes auraient un effet activateur de la toxinogénèse. Les acides phénoliques et les caroténoïdes constituent les molécules candidates de notre étude. Nous avons analysé leur effet "anti mycotoxine" et les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la biosynthèse des toxines par de tels composés. La démarche expérimentale est présentée sur la figure 22.



**Figure 23 : Démarche expérimentale suivie au cours du fractionnement des sons pour l'identification de molécules actives ayant un effet modulateur de la biosynthèse de toxines par *Fusarium*.**

Les composés extraits des sons de blé dur ont été fractionnés par différentes méthodes chromatographiques. A chaque étape du fractionnement, les fractions ont été testées *in vitro* pour leur effet sur la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. Les fractions actives sont alors re-fractionnées, jusqu'à la purification et la caractérisation d'une ou plusieurs molécules actives modulatrices de la biosynthèse des toxines.



Afin d'identifier des composés modulateurs de la biosynthèse des TCT B présents dans les sons de blé dur, la deuxième stratégie utilisée fait appel à une approche sans a priori sur les types de composés modulateurs recherchés dans les sons. Cette stratégie a consisté en la purification et la caractérisation de composés modulateurs de la biosynthèse des TCT B par fractionnement des sons de blé dur (figure 23). Pour cela, les composés extraits des sons de blé dur ont été fractionnés par différentes méthodes chromatographiques. A chaque étape du fractionnement, les fractions ont été testées *in vitro* pour leur effet sur la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. Les fractions actives sont alors re-fractionnées, jusqu'à la purification et la caractérisation d'un ou plusieurs composés modulateurs de la biosynthèse des toxines et l'effet inhibiteur sur la toxinogénèse a été analysé.

Les variétés de blé dur Orjaune et Nefer ont été choisies pour l'étude du fait de leur sensibilité différente à l'accumulation de mycotoxines (figure 21). La variété Nefer est une variété de blé dur sensible à l'accumulation de mycotoxines, la variété Orjaune semble limiter cette accumulation. Notre hypothèse est que cette différence de sensibilité à l'accumulation de mycotoxines serait liée à des compositions biochimiques différentes des sons en fonction des variétés, à l'existence de composés capables d'interférer avec la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. Selon les variétés, il pourrait exister un équilibre différent entre les composés inhibiteurs/activateurs présents dans les sons et ainsi une accumulation différente de mycotoxines dans les grains.



## **Matériel et Méthodes**

**Tableau 2 : Note de sensibilité à *Fusarium*, dates de floraison et dates de récolte des épis de blé tendre des variétés Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumai 3.**

Variété	Note sensibilité <i>Fusarium</i>		Date récolte			
	Note Geves inscription catalogue	Date floraison	Stade 10-12 jours après floraison	Stade 20 jours après floraison	Stade 30 jours après floraison Maturité	Stade 30 jours après floraison Maturité Inoculé R964
Charger	3	20-mai-06	02-juin-06	09-juin-06	14-juil-06	14-juil-06
Shango	4-	22-mai-06	03-juin-06	10-juin-06	14-juil-06	14-juil-06
Renan	6+	17-mai-06	28-mai-06	07-juin-06	14-juil-06	14-juil-06
Bizel	-8	21-mai-06	02-juin-06	09-juin-06	14-juil-06	14-juil-06
Sumai 3	(8-9)	X	X	X	14-juil-06	14-juil-06

X : épis non récoltés

## **I. Blé**

### **I. 1. Blé dur**

Les variétés de blé dur (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) Orjaune et Nefer ont été choisies pour l'étude du fait de leur différence de sensibilité à l'accumulation de mycotoxines. La variété Nefer est sensible à l'accumulation de mycotoxines alors que la variété Orjaune accumule peu de mycotoxines dans ses grains (Favre *et al.*, 2004). Des grains matures de blé de ces deux variétés nous ont été fournis par Pierre Roumet (INRA de Montpellier, France). Il a été vérifié que les lots utilisés ne contenaient aucune trace de TCT B. Les fractions sons de ces deux variétés ont été réalisées par la "Grande Semoulerie de l'Ouest" (GSO, Angoulême, France).

### **I. 2. Blé tendre**

Les épis de cinq variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*) Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumai 3 nous ont été fournis par Maxime Trottet (INRA de Rennes, France) (tableau 2). Ces variétés ont été choisies car elles présentent des niveaux différents de résistance à la fusariose et à l'accumulation de mycotoxines. Ces variétés ont été cultivées en tunnel sous conditions contrôlées à l'INRA de Rennes et les épis sont issus de la récolte 2006. Pour chaque variété (sauf Sumai 3), les épis ont été récoltés à différents stades de développement : 10-12 jours après floraison, 20 jours après floraison, et 30 jours après floraison (maturité). Pour chaque variété, on disposait également d'épis matures artificiellement contaminés à la floraison avec la souche de *F. graminearum* INRA 16 (R964).

## **II. Fractionnement des sons de blé dur**

### **II. 1. Extraction des composés polaires des sons**

Les sons des variétés Orjaune et Nefer ont été broyés pendant 4 min avec un broyeur "Waring Blender". Les composés apolaires ont été extraits de 500 g de sons broyés par 3 extractions de 30 min par de l'hexane (3 x 1,5 L) sous agitation. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min, les surnageants ont été éliminés. Les sons "défattés" ont été séchés à l'air

**Tableau 3 : Paramètres des chromatographies d'exclusion.**

Paramètres	Chromatographie d'exclusion	
Phase stationnaire	Fractogel Toyopearl (HW-40S)	Biogel P2
Domaine de fractionnement	100 - 10 000 Da	100 - 1 800 Da
Type de colonne	XK 26	XK 16
Dimensions de colonne	26 x 320 mm	16 x 120 mm
Volume total gel	130 mL	55 mL
Diamètre billes/diamètre pores	20-40 $\mu\text{m}$ / 50 $\text{\AA}$	45 $\mu\text{m}$ / 30 $\text{\AA}$
Volume extrait déposé	50 mL	5 mL
Phase mobile	eau (2,6 volumes de colonne) méthanol (1,2 volume de colonne)	tampon acétate (40 mM) pH 4,4 (2,5 volumes de colonne)
Débit phase mobile	1 mL/min	0,3 mL/min
Gradient	isocratique	isocratique
Détection de l'élution	280 nm	280 nm
Volume des fractions recueillies	7 mL	3 mL

libre pendant 24 h. Les composés polaires ont ensuite été extraits des sons "défattés" par 3 L d'une solution de méthanol/eau (70:30, v/v) acidifiée avec de l'acide formique à 0,1% (v/v). L'extraction a été réalisée sous agitation pendant 12 h à 4°C. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min, les surnageants ont été récoltés et concentrés par évaporation sous vide à 40°C à l'aide d'un rotavapor (BÜCHI Rotavapor R-200). L'extrait concentré a été ajusté à 230 mL avec de l'eau acidifiée avec de l'acide formique à 0,1% puis conservé à -20°C.

## **II. 2. Fractionnement des composés de l'extrait polaire des sons**

### **II. 2. 1. Chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel**

Les composés de l'extrait polaire des sons ont été séparés par chromatographie basse pression à l'aide d'un système chromatographique ÄKTA™ prime (Amersham Biosciences), sur un gel de Fractogel (Toyopearl HW-40S, Interchim). La limite d'exclusion du gel est comprise entre 100 et 10000 Da. La matrice est constituée de polymères vinyliques hydrophiles. Ce gel est généralement utilisé en chromatographie d'exclusion, séparant les molécules en fonction de leur poids moléculaires, les composés de plus haute masse n'étant pas retenus. Les groupements hydroxyles des composés phénoliques interagissent avec la matrice et la chromatographie de ces composés peut devenir une chromatographie d'adsorption.

Les paramètres du fractionnement sont détaillés dans le tableau 3. La chromatographie a été effectuée à température ambiante à l'aide d'une colonne de type XK26 contenant 130 mL de gel de Fractogel équilibré dans un premier temps avec de l'eau. Les extraits polaires (50 mL) ont été déposés en tête de colonne. L'élution était descendante, avec un débit fixé à 1 mL/min. L'élution a été réalisée en deux étapes, à l'aide de deux solvants différents :

\* Première étape : élution à l'eau qui élue les polysaccharides, les protéines, les peptides et une partie des composés phénoliques : chromatographie d'exclusion.

\* Deuxième étape : élution au méthanol qui élue les composés phénoliques retenus par la colonne : chromatographie d'adsorption.

L'élution a été suivie par mesure de l'absorbance de l'éluat à 280 nm. L'éluat a été recueillie à l'aide d'un collecteur rotatif par fractions de 7 mL sur lesquelles une mesure de l'absorbance à 230, 260, 280 et 320 nm a été réalisée à l'aide du spectrophotomètre Bio Photometer (Eppendorf).





### **II. 2. 2. Chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P2**

Les composés de la fraction active issue du premier fractionnement sur le gel de Fractogel ont à nouveau été séparés par chromatographie basse pression, sur un gel de Bio-Gel® P-2 (Bio-Rad). La limite d'exclusion de ce gel est comprise entre 100 et 1800 Da. Les paramètres du fractionnement sont détaillés dans le tableau 3. La chromatographie a été effectuée à température ambiante à l'aide d'une colonne de type XK16 contenant 55 mL de gel de Biogel P2 équilibré avec une solution de tampon acétate (40 mM) acidifié à pH 4,4 avec de l'acide acétique. Les fractions actives (20 mg dans 5 mL de solvant d'élution) ont été déposées en tête de colonne. L'élution était descendante, avec un débit fixé à 0,3 mL/min et a été suivie par mesure de l'absorbance de l'éluat à 280 nm. L'éluat a été recueillie à l'aide d'un collecteur rotatif par fractions de 3 mL sur lesquelles une mesure de l'absorbance à 230, 260, 280 et 320 nm a été réalisée à l'aide du spectrophotomètre Bio Photometer (Eppendorf).

### **II. 2. 3. Rassemblement des fractions**

Après analyse des profils chromatographiques obtenus à 230, 260, 280 et 320 nm, les fractions ont été réunies de façon à rassembler des groupes de molécules. Les fractions réunies ont ensuite été concentrées à l'aide d'un rotavapor, congelées à -80°C puis lyophilisées (FlexiDry™ Freeze Dryer, FTS Systems, Stone Ridge USA).

### **II. 2. 4. Calibration des gels**

Afin de calibrer les gels utilisés, des molécules standards de taille connue ont été déposées en tête de colonne : bleu dextran (MM : 2 MDa), cytochrome C (MM : 12 384 Da), vitamine B12 (MM : 1 355 Da), dCTP (MM : 487 Da), et tyrosine (MM : 187 Da). Le logarithme décimal de la masse molaire a été tracé en fonction du volume d'élution. La droite de calibration permet de calculer le coefficient de partage ( $K_{AV}$ ) de chacune des fractions.

### **II. 2. 5. Test à la ninhydrine**

La réaction à la ninhydrine caractérise la fonction  $\alpha$  amino-acide. Le test à la ninhydrine a été réalisé sur les fractions issues du premier fractionnement sur gel de fractogel. Quarante  $\mu$ L d'échantillon à analyser ont été ajoutés à 400  $\mu$ L de ninhydrine dissoute à 1% dans du

**Tableau 4 : Souches de *Fusarium* utilisées au cours de l'étude : code INRA, espèce, chémotype et potentiel toxigène défini sur grains.**

Code INRA	Espèce	Chémotype	Potentiel toxigène (µg de TCT B par g de grain sec infecté)
INRA 214	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	/
INRA 215	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	/
INRA 349	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	444
INRA 156	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	100
INRA 158	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	1
INRA 159	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	3492
INRA 155	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	860
INRA 169	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	15
INRA 162	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	143,3
INRA 183	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	13,5
INRA 186	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	8,2
INRA 194	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	56,7
INRA 150	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	20,9
INRA 91	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	114,6
INRA 117	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	500
INRA 305	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	112
INRA 134	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	1190
INRA 124	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	318
INRA 127	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	105
INRA 233	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	28
INRA 337	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	38
INRA 130	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	64
INRA 319	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	9
INRA 129	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	273
INRA 132	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	120
INRA 216	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	/

/ données non disponibles

méthanol (w/v). Après une incubation de 30 min à 60°C (bain-marie), l'apparition d'une coloration "violette" indique que le test à la ninhydrine est positif.

### **III. Culture *in vitro* de *Fusarium***

#### **III. 1. Souches de *Fusarium***

Différentes souches de *Fusarium* ont été utilisées au cours de cette étude (tableau 4). Les souches appartiennent aux espèces *Fusarium culmorum* et *F. graminearum*. Leurs spécifications ont été définies en utilisant des critères d'observation morphologiques (Nelson *et al.*, 1983) sur milieu PDA (Difco™ Potato Dextrose Agar : 39 g/L ; stérilisation 20 min à 121°C) et en utilisant des techniques moléculaires de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, polymorphisme dans la longueur des fragments de restriction) (données antérieures disponibles au laboratoire). Les souches utilisées pour l'étude ont été choisies dans la mycothèque du laboratoire MycSA pour leurs caractéristiques mycotoxinogènes différentes. En effet, elles sont de chémotype DON/ADON ou NIV/FX et ont des potentiels toxigènes différents. Le potentiel toxigène de chacune des souches a été défini par la teneur en toxines de grains stériles inoculés *in vitro* avec  $10^4$  spores/mL, et placés à 25°C pendant 21 jours (données antérieures disponibles au laboratoire). Ces souches ont été isolées de blé ou de maïs.

La souche modèle utilisée tout au long de cette étude est la souche de *F. culmorum* INRA 117, souche de chémotype DON/ADON. Il s'agit d'une souche de *F. culmorum* isolée en 1990 à Foggia (Apulia, Italie) sur Triticale (hybride *Triticum x Secale*). Cette souche nous a été donnée par Quirico Migheli (Sassari, Italie). Cette souche a été sélectionnée pour l'étude car elle possède un potentiel toxigène fort en culture liquide sur milieu MS.

#### **III. 2. Préparation de l'inoculum**

Toutes les souches sont conservées à 4°C en tubes inclinés de PDA dans la mycothèque du laboratoire. Lorsque nécessaire, la ou les souches choisies sont repiquées sur tubes inclinés de PDA puis placées à l'étuve à 25°C à l'obscurité. Après 8 jours d'incubation, les suspensions de spores sont fraîchement préparées par ajout de 6 mL d'eau distillée stérile

**Tableau 5 : Composition des milieux MS tamponnés à pH 6,5 et à pH 3.**

Constituants	Milieu MS tamponné pH 6,5	Constituants	Milieu MS tamponné pH 3
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7 g/L	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	5,5 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	8,4 g/L	acide citrique (0,1 M)	0,4 L/L
$\text{MgSO}_4$	0,017 g/L	$\text{MgSO}_4$	0,017 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g/L	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g/L
biotine	0,1 mg/L	biotine	0,1 mg/L
glucose	20 g/L	glucose	20 g/L
sels minéraux (50X)	0,1 mL/L	sels minéraux (50X)	0,1 mL/L

dans les tubes puis agitation modérée. La concentration en spores de la suspension ainsi préparée est déterminée par comptage sur cellule de Thomas. Les milieux de culture sont ensuite inoculés avec la suspension de spores de façon à obtenir une concentration finale de  $10^4$  spores/mL.

### **III. 3. Conditions de cultures *in vitro***

#### **III. 3. 1. Milieux de culture**

##### **III. 3. 1. 1. Milieu GYEP**

Le milieu liquide GYEP (glucose 50 g/L, extrait de levure 1 g/L, néopeptone 1 g/L, stérilisation 30 min à 105°C), est classiquement utilisé au laboratoire et a été utilisé pour quelques expérimentations de l'étude.

##### **III. 3. 1. 2. Milieu synthétique pour mycotoxines**

Un milieu de culture liquide synthétique a été mis au point pour l'étude (milieu MS : "Mycotoxin Synthetic medium"). Ce milieu contient du 0,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,6 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,017 g/L de  $\text{MgSO}_4$ , 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 mg/L de biotine, 20g/L de glucose, et 0,1 mL/L d'une solution de sels minéraux 50X (Vogel, 1956). Dans un premier temps, le glucose est dissout dans l'eau puis autoclavé 30 min à 105°C ; puis, les différentes solutions des autres constituants sont additionnés stérilement.

##### **III. 3. 1. 3. Milieu MS tamponné**

Pour l'étude de l'effet du pH du milieu de culture vis-à-vis de la biosynthèse des toxines, deux milieux MS tamponné à pH 6,5 et tamponné à pH 3 ont été préparés. Leur composition est présentée dans le tableau 5.

#### **III. 3. 2. Systèmes de culture**

##### **III. 3. 2. 1. Cultures standard**

Le système des "cultures standard" est classiquement utilisé au laboratoire et a été utilisé pour quelques expérimentations de l'étude. Les cultures standard sont réalisées en fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu de culture liquide inoculé avec la suspension de spores à une concentration finale de  $10^4$  spores/mL. Les cultures standard sont incubées à

**Tableau 6 : Paramètres des différentes méthodes chromatographiques utilisées au cours de l'étude.**

Paramètres	Composés analysés		
	Acides phénoliques	Ergostérol	TCT B
Appareil	chaîne HPLC Hewlett-Packard ChemStation Series 1100 couplée à un détecteur à barrette de diodes DAD		
Type de colonne	ZORBAX SB-C18	ZORBAX SB-C18	ZORBAX Eclipse® XDB-C8
Dimensions de colonne	5µm, 250 mm x 4,6 mm	5µm, 250 mm x 4,6 mm	5µm, 150 mm x 4,6 mm
Température four	30°C	30°C	40°C
Volume d'injection	5 µL	20 µL	5 µL
Débit phase mobile	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
Solvant A	eau MilliQ, acide formique 2%	méthanol	eau MilliQ, pH 2,6 (acide phosphorique)
Solvant B	acétonitrile	/	acétonitrile
Gradient	5-15% B (30 min), 15-50% B (10 min) 50-90% B (5 min), 90% B (3 min), 90-5% B (2 min), 5% B (10 min)	isocratique	5-30% B (14 min), 30-90% B (10 min) 90% B (5 min), 90-5% B (2 min) 5% B (14 min)
Détection UV-Vis	260 nm, 280 nm, 320 nm et 360 nm	282 nm	230 nm
Durée totale de l'analyse	60 min	18 min	45 min

Paramètres	Composés analysés		
	Caroténoïdes	Fractions des sons	Purification des molécules actives
Appareil	chaîne HPLC Hewlett-Packard ChemStation Series 1100 couplée à un détecteur à barrette de diodes DAD		
Type de colonne	ZORBAX SB-C18	ZORBAX SB-C18	Kromasil 100 Å C8
Dimensions de colonne	5µm, 250 mm x 4,6 mm	5µm, 250 mm x 4,6 mm	5µm, 250 mm x 10 mm
Température four	40°C	30°C	30°C
Volume d'injection	20 µL	10 µL	90 µL
Débit phase mobile	1 mL/min	1 mL/min	3 mL/min
Solvant A	eau MilliQ	eau MilliQ, acide formique 0,08%	eau MilliQ, acide formique 0,08%
Solvant B	acétonitrile	acétonitrile, acide formique 0,08%	acétonitrile, acide formique 0,08%
Gradient	95% B (3 min), 95-100% B (6 min) 100% B (3 min), 100-95% B (3 min)	2% B (5 min), 2-50% B (40 min), 50% B (5 min), 50-98% B (2 min), 98% B (5 min), 98-2% B (2 min), 2% B (10 min)	10-50% B (30 min), 50-98% B (2 min), 98% B (5 min), 98-10% B (2 min), 10% B (10 min)
Détection UV-Vis	450 nm	230 nm, 280 nm et 320 nm	230 nm, 280 nm et 320 nm
Durée totale de l'analyse	20 min	69 min	49 min

25°C et 150 rpm à l'obscurité dans un incubateur Multitron© (INFORS AG, Bottmingen, Suisse). Après incubation, les cultures sont arrêtées par filtration sous vide sur papier Whatman© n°4. Le milieu de culture est conservé à -20°C en attendant l'analyse des TCT B et le mycélium est placé à -80°C durant au moins 24 h pour être ensuite lyophilisé.

### **III. 3. 2. 2. Mini cultures statiques**

Un système de mini cultures statiques a été mis au point pour notre étude. Les mini cultures liquides sont réalisées en petite boîte de Pétri (Ø 55 mm) contenant 8 mL de milieu de culture liquide inoculé avec la suspension de spores à une concentration finale de  $10^4$  spores/mL. Après inoculation, les mini cultures sont placées dans des boîtes métalliques afin d'éviter l'évaporation et disposées à l'étuve à 25°C, à l'obscurité et sans agitation.

Après incubation, les mini cultures sont arrêtées par centrifugation (5 min, 3000 rpm). Le milieu de culture est conservé à -20°C en attendant l'analyse des TCT B et le mycélium est placé à -80°C durant au moins 24 h pour être ensuite lyophilisé. Les biomasses fongiques sont déterminées par la pesée de la masse sèche des mycéliums après 48 h de lyophilisation.

Une procédure particulière est menée lorsque les mycéliums sont utilisés pour une extraction d'ARN. Dans ce cas, après incubation au temps nécessaire, les mini cultures sont filtrées sous vide à l'aide d'un système VISIPREP™ DL (Supelco) sur des filtres en polyéthylène stériles (Supelco). Les mycéliums sont rincés deux fois avec de l'eau MilliQ stérile et congelés dans de l'azote liquide puis placés à -80°C.

## **IV. Méthodes analytiques**

### **IV. 1 Instrumentations et principes**

Les analyses ont été réalisées sur une chaîne HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Hewlett-Packard ChemStation Series 1100 couplée à un détecteur à barrette de diodes DAD (Diode Array Detector). L'identification et la quantification des composés ont été réalisées par une méthode d'étalonnage externe. La calibration externe est réalisée grâce à une gamme étalon pour chacun des composés analysés. Les paramètres des différentes méthodes chromatographiques utilisées sont présentés dans le tableau 6.





## **IV. 2. Extraction et dosage des acides phénoliques**

### **IV. 2. 1. Extraction des acides phénoliques solubles libres**

La méthode d'extraction des acides phénoliques solubles libres est adaptée de Sosulski *et al.* (1982), Labat *et al.* (2000) et Bily (2003) avec les modifications suivantes : les grains ou sons broyés sont tout d'abord extraits deux fois 10 min par cinq volumes d'hexane (1:5, w/v) de façon à éliminer les composés apolaires. Après évaporation de l'hexane sous la hotte, les grains ou sons broyés et "défattés" (500 mg) sont extraits deux fois par 10 mL d'un mélange méthanol/acétone/eau (7:7:6, v/v/v) pendant 30 min sous agitation. Après centrifugation 5 min à 5000 rpm, les surnageants sont collectés dans un ballon et évaporés à sec à l'aide d'un rotavapor à 35°C. Le ballon est rincé avec 2 mL de méthanol et 4 mL d'eau puis son contenu est transféré dans un corning. Le volume est alors ajusté à 10 mL avec de l'eau et le pH est ajusté à 2 avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique (1 M). Les acides phénoliques solubles libres sont alors extraits par 10 mL d'acétate d'éthyle. 8 mL de la phase organique sont évaporés à sec à 35°C sous flux d'azote. Les extraits secs sont alors stockés à -20°C en attendant l'analyse.

### **IV. 2. 2. Extraction des acides phénoliques insolubles liés aux parois**

La méthode d'extraction des acides phénoliques insolubles liés aux parois est adaptée de Bily (2003). Les sons ou grains issus de l'extraction des acides phénoliques solubles libres sont mis à sécher sous la hotte pendant une nuit et sont utilisés pour l'extraction des acides phénoliques insolubles liés aux parois. 100 mg de matériel sont hydrolysés par 4 mL de NaOH (2 M) pendant 2 h, sous agitation constante. Les échantillons sont ensuite acidifiés à pH 2 avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique (12 M) puis extraits trois fois par 5 mL d'acétate d'éthyle. Les fractions organiques collectées sont évaporés a sec à 35°C sous flux d'azote. Les extraits secs sont alors stockés à -20°C en attendant l'analyse.

### **IV. 2. 3. Analyse des acides phénoliques par HPLC-DAD**

Avant analyse, les extraits secs à doser ont été dissous dans 100 µL de méthanol. La procédure d'analyse par HPLC-DAD est adaptée de Kim *et al.* (2006) avec des modifications. Cette méthode a été mise au point pour l'étude et permet de séparer 14 composés phénoliques

**Tableau 7 : Caractéristiques des composés phénoliques séparés par la méthode d'analyse HPLC mise au point au cours de l'étude.**

Composés phénoliques	$\lambda$ max (nm)	temps de rétention (min)
<b>Acides phénoliques (dérivés acides benzoïques)</b>		
acide gallique	280	4,79
acide protocatéchuique	260	8,86
acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	260	14,35
acide vanillique	260	18,56
acide syringique	280	21,22
<b>Acides phénoliques (dérivés acides cinnamiques)</b>		
acide férulique	320	33,06
acide <i>p</i> -coumarique	320	27,89
acide caféique	320	18,89
acide sinapique	320	34,29
acide chlorogénique	320	16,29
<b>Flavanols</b>		
catéchine	280	15,35
épicatéchine	280	22,59
<b>Flavonols</b>		
kaempférol	360	41,9
quercétine	360	40,11

dont 10 acides phénoliques, deux flavanols et deux flavonols. Ces composés ainsi que certaines de leurs caractéristiques sont reportés dans le tableau 7. La séparation des composés phénoliques est réalisée sur une colonne ZORBAX SB-C18 (5 $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm) (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) maintenue à 30°C. La phase mobile est constituée d'eau MilliQ acidifié avec 2% d'acide formique (v/v) (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le débit est fixé à 1 mL/min pour une durée totale d'analyse de 60 min. Les conditions du gradient sont les suivantes : 5-15% B en 30 min, 15-50% B en 10 min, 50-90% B en 5 min, 90% B pendant 3 min, 90-5% B en 2 min puis 5% B pendant 10 min. Le volume d'injection est de 5  $\mu$ L. Les surfaces des pics sont mesurées simultanément à 260 nm, 280 nm, 320 nm et 360 nm. L'identification des différents composés phénoliques se fait sur la base de leur temps de rétention et de leurs spectres UV mesurés de 200 à 550 nm. La quantification est réalisée par étalonnage externe. L'étalonnage externe est réalisé avec des composés de référence achetés sous forme de poudre lyophilisée chez Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA).

#### **IV. 2. 4. Analyse par HPLC-MS/MS**

La séparation HPLC est réalisée à l'aide d'un système Agilent 1100 dans les conditions décrites dans le tableau 6. Les conditions du gradient sont les suivantes : 5-15% B en 30 min, 15-50% B en 20 min, 50-90% B en 8 min, 90% B pendant 5 min, 90-5% B en 2 min puis 5% B pendant 10 min. Le spectromètre de masse couplé à la chromatographie liquide est un Q Trap 2000 Applied Biosystems équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation (ESI) et d'un analyseur de masse trappe d'ions et/ou triple quadripôle. L'ensemble est contrôlé par le logiciel Analyst 1.4.2.. Les spectres de masse ont été enregistrés en mode d'ionisation négatif dans une gamme de m/z 50 à 1500 sous les conditions suivantes : tension de la source : 4200 V, tension du capillaire : 10 V, température du capillaire : 400°C, énergie de collision : 30.

#### **IV. 3. Extraction et dosage de l'ergostérol**

##### **IV. 3. 1. Extraction de l'ergostérol**

L'ergostérol est un stérol spécifique des membranes fongiques. Ce composé est utilisé comme marqueur précis d'infection fongique chez les plantes (Seitz *et al.*, 1977). La méthode d'extraction et de dosage de l'ergostérol a été mise au point au laboratoire et est adaptée de



Saraf *et al.* (1997) et de Marin *et al.* (2005). 30 mg de grains broyés et 2 ml de KOH/MeOH (1:10, w/v) sont placés pendant 1 h à 80°C puis refroidi rapidement dans de la glace. 40 µL d'étalon interne de 7-dehydrocholestérol (500 mg/L dans du méthanol) sont additionnés au tube puis 1 mL d'eau. Une extraction est effectuée par deux fois 2 mL d'hexane. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 3 min, les phases organiques sont collectées et évaporées à sec sous flux d'azote sans chauffer. Les extraits secs sont alors stockés à -20°C en attendant l'analyse.

#### **IV. 3. 2. Analyse de l'ergostérol par HPLC-DAD**

Les extraits secs sont repris dans 1 mL de méthanol puis filtrés sur un filtre de 0,45 µm avant l'analyse en HPLC. L'analyse de l'ergostérol est réalisée sur une colonne ZORBAX SB-C18 (5µm, 250 mm x 4,6 mm) (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) maintenue à 30°C. Le débit est fixé à 1 mL/min pour une durée totale d'analyse de 18 min. Un gradient isocratique de 100% de méthanol a été utilisé. Le volume d'injection est de 20 µL. La détection s'effectue à 282 nm. L'identification de l'ergostérol se fait grâce au temps de rétention et à son spectre UV mesuré de 190 à 400 nm. La quantification est réalisée par étalonnage externe et les teneurs en ergostérol sont corrigées par rapport à l'étalon interne.

#### **IV. 4. Extraction et dosage des TCT B**

##### **IV. 4. 1. Extraction des TCT B**

Un volume de 4 mL de milieu de culture est extrait par 8 mL d'acétate d'éthyle. Après décantation, 6 mL de la phase organique contenant les TCT B sont évaporés à sec à 70°C sous flux d'azote. Les extraits secs sont alors stockés à -20°C en attendant l'analyse.

##### **IV. 4. 2. Analyse des TCT B par HPLC-DAD**

Les extraits secs sont repris dans 200 µL d'un mélange méthanol/eau (1:1, v/v) avant l'analyse en HPLC. La procédure d'analyse utilisée est celle décrite par Bily *et al.* (2004). La séparation des cinq TCT B (NIV, DON, FX, 15-ADON et 3-ADON) est réalisée sur une colonne ZORBAX Eclipse® XDB-C8 (5µm, 150 mm x 4,6 mm) (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) maintenue à 40°C. La phase mobile est constituée d'eau MilliQ acidifié à pH 2,6



avec de l'acide phosphorique (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le débit est fixé à 1 mL/min pour une durée totale d'analyse de 45 min. Les conditions du gradient sont les suivantes : 5-30% B en 14 min, 30-90% B en 10 min, 90% B pendant 5 min, 90-5% B en 2 min puis 5% B pendant 14 min. Le volume d'injection est de 5  $\mu$ L. Les surfaces des pics sont mesurées à 230 nm. L'identification des différents TCT B se fait grâce à leur temps de rétention et leurs spectres UV mesuré de 190 à 360 nm. La quantification des 5 TCT B est réalisée par étalonnage externe. L'étalonnage externe utilise des composés de référence achetés sous forme de poudre lyophilisée chez Sigma-Aldrich Co (St Louis, USA).

### **IV. 5. Extraction et dosage des caroténoïdes**

#### **IV. 5. 1. Extraction des caroténoïdes**

La méthode d'extraction des caroténoïdes est adaptée de Hentschel *et al.* (2002). Les sons broyés (0,5 g) sont extraits trois fois 5 min à 75°C par 2 mL d'un mélange MeOH/THF (1:1, v/v) en présence de 0,06 g de MgCO<sub>3</sub>. Après centrifugation (5000 rpm, 5 min), les phases organiques sont récoltées et évaporées à sec à l'aide d'un rotavapor. Les extraits secs sont alors stockés à -20°C en attendant l'analyse.

#### **IV. 5. 2. Analyse des caroténoïdes par HPLC-DAD**

Les extraits secs sont repris dans 200  $\mu$ L d'acétonitrile avant l'analyse en HPLC. La séparation des caroténoïdes est réalisée sur une colonne ZORBAX SB-C18 (5 $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm) (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) maintenue à 40°C. La phase mobile est constituée d'eau MilliQ (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le débit est fixé à 1 mL/min pour une durée totale d'analyse de 20 min. Les conditions du gradient sont les suivantes : 95% B pendant 3 min, 95-100% B en 6 min, 100% B pendant 3 min, 100-95% B en 3 min puis 95% B pendant 5 min. Le volume d'injection est de 20  $\mu$ L. Les surfaces des pics sont mesurées à 450 nm. L'identification des différents caroténoïdes se fait grâce à leur temps de rétention et leurs spectres UV mesurés de 200 à 700 nm. La quantification de la lutéine et de la zéaxanthine (Sigma) est réalisée par étalonnage externe.





## **IV. 6. Analyse des fractions des sons**

### **IV. 6. 1. Analyse par HPLC-DAD**

Deux mg de la fraction lyophilisée d'intérêt sont dissous dans 100  $\mu$ L d'eau MilliQ avant l'analyse par HPLC-DAD. La séparation est réalisée sur une colonne ZORBAX SB-C18 (5 $\mu$ m, 250 mm x 4,6 mm) (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) maintenue à 30°C. La phase mobile est constituée d'eau MilliQ acidifié avec de l'acide formique à 0,08% (v/v) (solvant A) et d'acétonitrile à 0,08% d'acide formique (v/v) (solvant B). Le débit est fixé à 1 mL/min pour une durée totale d'analyse de 69 min. Les conditions du gradient sont les suivantes : 2% B pendant 5 min, 2-50% B en 40 min, 50% B pendant 5 min, 50-98% B en 2 min, 98% B pendant 5 min, 98-2% B en 2 min puis 2% B pendant 10 min. Le volume d'injection est de 10  $\mu$ L. Les surfaces des pics sont mesurées à 230 nm, 280 nm et 320 nm. Les spectres UV sont enregistrés de 200 à 400 nm.

### **IV. 6. 2. Séparation et purification des composés par HPLC semi préparative**

La fraction d'intérêt lyophilisée est dissoute dans de l'eau. Les composés qu'elle contient sont séparés par HPLC semi préparative en phase inverse. La séparation est réalisée sur une colonne Kromasil 100Å C8 (5 $\mu$ m, 250 mm x 10 mm) (Bios analytique) maintenue à 30°C. La phase mobile est constituée d'eau MilliQ acidifiée avec de l'acide formique à 0,08% (solvant A) et d'acétonitrile à 0,08% d'acide formique (v/v) (solvant B). Le débit est fixé à 3 mL/min pour une durée totale d'analyse de 49 min. Les conditions du gradient sont les suivantes : 10-50% B en 30 min, 50-98% B en 2 min, 98% B pendant 5 min, 98-10% B en 2 min, 10% B pendant 10 min. Le volume d'injection est de 90  $\mu$ L. Les surfaces des pics sont mesurées à 230 nm, 280 nm et 320 nm.

### **IV. 6. 3. Analyse des molécules candidates par HPLC-MS/MS**

La séparation HPLC est réalisée à l'aide d'un système Agilent 1100 dans les conditions décrites dans le tableau 6. L'appareillage utilisé a été décrit précédemment (cf. § IV. 2. 4.). Les spectres de masse ont été enregistrés en mode d'ionisation positif et négatif selon les composés analysés dans une gamme de m/z 50 à 1500 sous les conditions suivantes : tension



de la source : 4200 V, tension du capillaire : 10 V, température du capillaire : 400°C, énergie de collision : 30.

## **V Supplémentation des cultures de *Fusarium***

### **V. 1. Supplémentation des cultures par les acides phénoliques**

#### **V. 1. 1. Acides phénoliques individuels**

Les poudres commerciales d'acides phénoliques (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) ont été directement solubilisées dans le milieu MS (après autoclavage des milieux) à la concentration finale voulue.

Une procédure particulière a été menée lorsque la supplémentation en acides phénoliques a lieu à un temps particulier après l'inoculation. Dans ce cas, une solution aqueuse concentrée d'acides phénoliques a été préparée le jour de la supplémentation. Le volume de cette solution à ajouter à chaque mini culture est ajusté de façon à obtenir la concentration finale voulue. Dans la culture témoin, un même volume d'eau a été supplémenté.

#### **V. 1. 2. Acides phénoliques combinés**

##### **V. 1. 2. 1. Extraits naturels d'acides phénoliques**

Les extraits naturels d'acides phénoliques sont issus de l'extraction des acides phénoliques insolubles liés aux parois des sons. L'extraction est réalisée sur 15 g de sons. 15 g de sons broyés ont été hydrolysés avec 600 mL de NaOH (2 M) pendant 4 h, sous agitation constante. Les échantillons ont ensuite été acidifiés à pH 2 avec de l'acide chlorhydrique (12 M) puis extraits une fois par 600 mL d'acétate d'éthyle. Après centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min, les fractions organiques ont été collectées et évaporées à sec à 35°C à l'aide d'un rotavapor. Les extraits secs ont été repris par 400 µL de MeOH puis analysés par HPLC-DAD. Un volume adéquat de cet extrait méthanolique a été additionné aux milieux de culture (après autoclavage des milieux) de façon à obtenir la concentration finale en acide férulique voulue (0,5 ou 0,1 mM). En parallèle, une extraction a été réalisée sur 15 mL d'eau dans les mêmes conditions. Cet extrait a alors été supplémenté aux cultures témoin.



### **V. 1. 2. 2. Mélanges reconstitués d'acides phénoliques**

Après analyse des extraits naturels d'acides phénoliques par HPLC-DAD, les poudres commerciales d'acides phénoliques ont été pesées et directement solubilisées dans le milieu MS (après autoclavage des milieux) de façon à obtenir la même composition que l'extrait naturel et à la concentration finale en acide férulique voulue.

## **V. 2. Supplémentation des cultures par les caroténoïdes**

### **V. 2. 1. $\beta$ -carotène**

5 mg de poudre commerciale de  $\beta$ -carotène (Sigma Aldrich) ont été solubilisées dans 4,8 mL de chloroforme et 0,2 mL de Tween 80. Après évaporation du chloroforme, un volume de  $\beta$ -carotène dissout dans le Tween 80 a été supplémenté aux milieux de culture MS (après autoclavage des milieux) à la concentration finale voulue. Les cultures témoins ont été supplémentées avec du Tween 80.

### **V. 2. 2. Extraits naturels de caroténoïdes**

Afin de comparer l'efficacité modulatrice des extraits naturels de caroténoïdes des sons et les extraits naturels d'acides phénoliques des sons, les extraits naturels de caroténoïdes ont été réalisés sur une même quantité de sons que les extraits naturels d'acides phénoliques, c'est-à-dire sur 15 g de sons broyés. Les sons broyés (15 g) ont été extraits trois fois 5 min à 75°C par 60 mL d'un mélange MeOH/THF (1:1, v/v) en présence de 1,8 g de MgCO<sub>3</sub>. Après centrifugation (5000 rpm, 5 min), les phases organiques ont été collectées et évaporées à sec à l'aide d'un rotavapor. L'extrait sec a été repris par 9,6 mL de chloroforme et 0,4 mL de Tween 80. Après évaporation du chloroforme sous flux d'azote, un volume équivalent au volume d'extrait naturel d'acides phénoliques, a été additionné aux milieux de culture (après autoclavage des milieux). En parallèle, une extraction a été réalisée sur 15 mL d'eau dans les mêmes conditions. Cet extrait a alors été supplémenté aux cultures témoin.

## **V. 3. Supplémentation des cultures par le tryptophane**

La poudre commerciale de tryptophane (Merck) a directement été solubilisée dans le milieu de culture MS (après autoclavage des milieux) à la concentration finale voulue.

**Tableau 8 : Composition du tampon de charge à ARN.**

---

Tampon de charge pour ARN (Vf = 1,5 mL)	
Formamide déionisé	750 µL
Formaldéhyde	240 µL
Tampon MOPS/EDTA 10X	150 µL
Glycérol 50%	200 µL
Bromure d'éthidium 10 mg/mL	10 µL
Bleu de bromophénol	0,5 mg

---

Tampon MOPS/EDTA 10X	
Acide 3-N-morpholinopropanesulfonique (MOPS)	0,2 M
Acétate de sodium	50 mM
EDTA	10 mM
(ajuster à pH 7 et conserver à l'abri de la lumière)	

---

#### **V. 4. Supplémentation des milieux avec les fractions des sons**

Les fractions lyophilisées ont directement été solubilisées dans le milieu de culture MS (après autoclavage des milieux). Dans la partie résultat, les concentrations supplémentées de chaque fraction sont précisées.

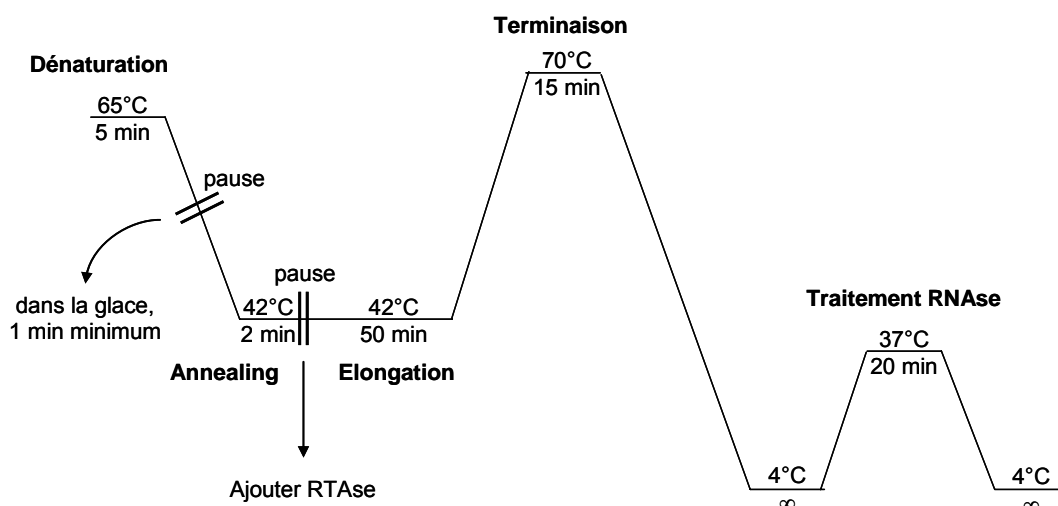
### **VI. Expression des résultats et analyses statistiques**

Pour chaque expérimentation, trois répétitions ont été réalisées par condition. Les niveaux de TCT B produits mesurés dans les milieux de culture sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de TCT B par g de biomasse sèche. Afin de comparer certaines données issues de différentes expérimentations ou possédant des témoins différents, les teneurs en TCT B dans les cultures supplémentées sont normalisées par les teneurs dans les cultures témoins correspondantes de l'expérimentation. Les valeurs présentées sont des moyennes arithmétiques  $\pm$  l'écart type de trois répétitions. La significativité des différences de niveaux de TCT B observées est évaluée par un test de Student dont le seuil de significativité est fixé à  $p = 0,05$ .

### **VII. Analyse de l'expression des gènes**

#### **VII. 1. Extraction des ARN totaux**

Les mycélium congelés (50 mg) ont été broyés dans 1 mL de réactif TRIzol® (Invitrogen) à l'aide du TissueLyser System® (Qiagen) pendant 1 min 30 s à une fréquence de 30 mouvements/s. Les ARN totaux ont été extraits selon la méthode au TRIzol® en suivant le protocole du fournisseur (Invitrogen). Les solutions finales d'ARN totaux ont été quantifiées par spectrophotométrie à 260 nm (1 unité d'absorbance = 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ARN) à l'aide du spectrophotomètre Bio Photometer (Eppendorf). Les ratios  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  et  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$  ont été utilisés comme indicateurs de pureté des extraits. La qualité des ARN extraits a été visualisée après migration de 1  $\mu\text{L}$  d'échantillon sur gel d'agarose à 1,2% (w/v) en conditions dénaturantes (dénaturation 5 min à 65°C avec 5  $\mu\text{L}$  de tampon de charge pour ARN, composition tableau 8). Les ARN ont été utilisés le jour même pour réaliser la réaction de transcription inverse afin de limiter les étapes de congélation/décongélation auxquelles ces molécules sont sensibles. Les fractions d'ARN non utilisées ont été conservées à -80°C.



**Figure 24 : Etapes de transcription inverse.**

**Tableau 9 : Amorces utilisées pour amplifier les gènes *Ef2*, *βtub*, *Gapdh*, *L15*, *Tri4*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* et *Fpps* par RT-PCR.**

Gene	Sequence forwards (5'-3')	Sequence reverse (5'-3')	Tm (°C)	Accession No.
<i>Ef2</i>	Ef2-F CTGTGTTCTTACCATGAC	Ef2-R CAACAGGTTAGCACCA	58	FG12849
<i>βtub</i>	βtub-F** GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	βtub-R* GATTGACCGAAAACGAAGTTG	59	FG09530
<i>βtub (PCR Q)</i>	βtub-F ACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGC	βtub-R CCATACCGCGCCGGTACCACCACC	63	FG09530
<i>Gapdh</i>	Gapdh-F CCTTTCATTGAGCCTCAC	Gapdh-R CGTACATGGGAGCGTC	60	FG06257
<i>L15</i>	L15-F GGGTGCCCTCAAGTACGTCG	L15-R GGCCGACACGCTCCTCGGCG	59	FG00845
<i>Tri4</i>	Tri4-F* TATTGTTGGCTACCCCAAGG	Tri4-R* TGTCAGATGCGCCTTACAAA	58	FG03535
<i>Tri5</i>	Tri5-F GACCCTAAGCGACTACAG	Tri5-R GTGCTACGGATAAAGTTTC	58	FG03537
<i>Tri11</i>	Tri11-F AGCCGTCTACTTCCTATG	Tri11-R ACTACTGAAACGCGCA	60	FG03540
<i>Tri12</i>	Tri12-F ATTCGGTACATGGGCT	Tri12-R GCAGTGCTGTTCTGTC	57	FG12013
<i>Tri101</i>	Tri101-F* AGGGCATTAGCGAGGAAACACA	Tri101-R* ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC	59	AB011417
<i>Tri6</i>	Tri6-F* AGCGCCTTGCCCTCTTTG	Tri6-R* AGCCTTTGTTGCCGACTTCTTG	58	FG03536
<i>Tri10</i>	Tri10-F* TCTGAACAGGCGATGGTATGGA	Tri10-R* CTGCGGCGAGTGAGTTTGACA	58	FG03538
<i>Fpps</i>	Fpps-F CATGATCGCCATTAACGAC	Fpps-R CAATGTGTTCCGGGCTT	57	FG06784

Les amorces utilisées pour amplifier *Ef2*, *βtub*, *Gapdh*, *L15*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri12* et *Fpps* ont été dessinées à l'aide du logiciel LightCycler Probe Design Version 1.0 (Roche).

\* Ponts (2005), \*\* Doohan *et al.* (1999)



## **VII. 2. Transcription inverse des ARN en ADNc**

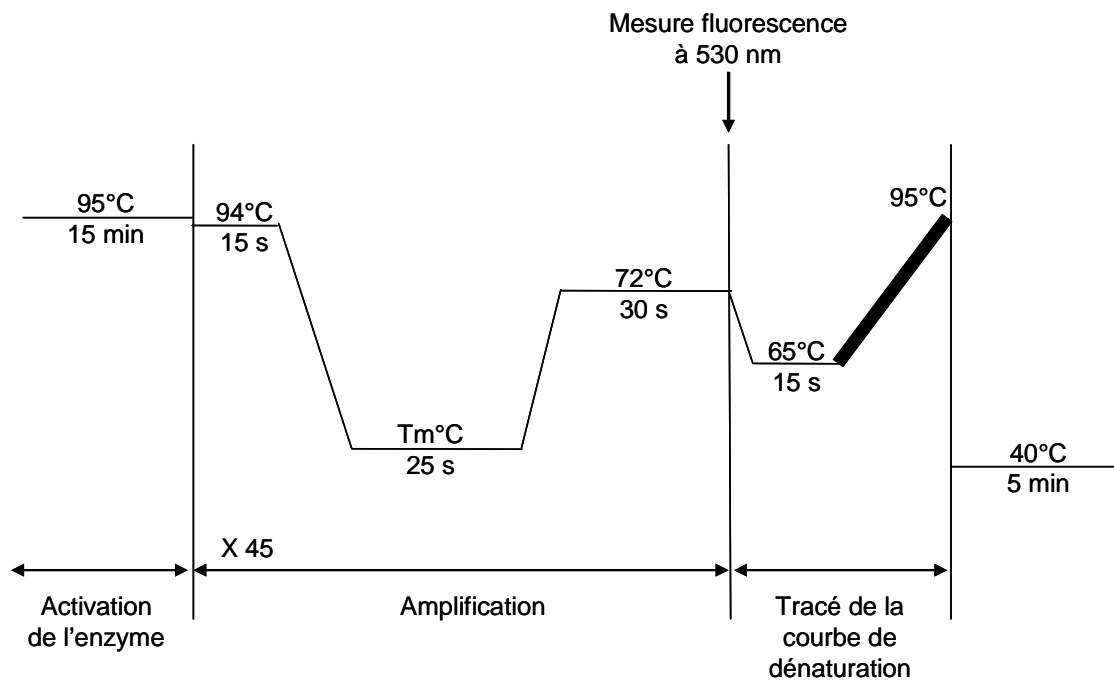
Les ARN totaux (2 µg ou 5 µg) ont été rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit SuperScript™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR selon le protocole du fournisseur (Invitrogen). Les transcriptions inverses ont été réalisées à l'aide du thermocycleur iCycler™ (Bio-Rad) programmé selon le protocole du fournisseur (Invitrogen) (figure 24). Les échantillons d'ADNc ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation pour les analyses par PCR.

## **VII. 3. Analyse par PCR classique**

Les analyses par PCR classiques ont été réalisées à l'aide du thermocycleur iCycler™ thermal cycling (Bio-Rad). Les réactions de PCR ont été réalisées dans des mélanges réactionnels de 25 µL contenant 1 µL de chaque échantillon d'ADNc (correspondant à 8 ou 10 ng d'ARN), 2,5 U de GoTaq® DNA polymérase (Promega), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de chaque dNTP, et 0,5 µM de chaque amorce. Les amorces utilisées et leur température d'hybridation sont présentées dans le tableau 9. Les amplifications de PCR ont été réalisées pendant 28 cycles. Les conditions de la PCR étaient : 94°C pendant 2 min, 28 x (95°C pendant 15 s, T<sub>m</sub>°C pendant 30 s, 72°C pendant 30 s), 4°C pendant ∞. Les produits d'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (w/v).

## **VII. 4. Analyse par PCR quantitative**

Les analyses par PCR quantitative avec détection de fluorescence (SYBR® Green) ont été réalisées à l'aide du système LightCycler® 2.0 et du logiciel LightCycler 3.5.3 (Roche). L'abondance des transcrits des gènes d'intérêt a été évaluée dans 2 µL de chaque échantillon d'ADNc (correspondant à 8 ou 10 ng d'ARN) dans un volume réactionnel final de 10 µL en utilisant le kit QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Qiagen). Du MgCl<sub>2</sub> a été supplémenté au mélange réactionnel PCR à une concentration finale de 4 mM. Les amorces ont été utilisées à une concentration finale de 1 µM. Les amorces utilisées et leur température d'hybridation sont présentées dans le tableau 9. Les analyses ont été réalisées en triplicats. Les amplifications de PCR quantitative ont été réalisées pendant 45 cycles. Les conditions de la PCR sont présentées sur la figure 25, selon les conditions recommandées par le fournisseur (Qiagen).



**Figure 25 : Etapes des amplifications de PCR quantitative.**

La Taq polymérase est activée après 15 min à 95°C. L'amplification des gènes cibles est réalisée en 45 cycles et la fluorescence est mesurée à chaque fin de cycle. Après 45 cycles d'amplification, la courbe de dénaturation est tracée en faisant varier la température de 65°C à 95°C par paliers de 0,1°C/s avec mesure de la fluorescence à la fin de chaque palier.

De façon à déterminer l'efficacité moyenne de la PCR, un mélange standard a été réalisé en rassemblant un même volume de chaque échantillon d'ADNc. Une gamme de dilution a été préparée à partir du mélange standard. Pour chaque gène, l'efficacité de la PCR ( $E$ ) a été déterminée grâce à la gamme de dilutions comme décrit par Ponts *et al.* (2007).

Les échantillons d'ADNc ont été testés pour leur contamination en ADN génomique comme l'a décrit Ponts *et al.* (2007). L'absence de produits d'amplification de PCR non spécifique ou de la formation de dimères d'amorces ont été vérifiés par l'analyse des courbes de dénaturation et par l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR.

### VII. 5. Analyse des résultats après PCR quantitative

Les valeurs des "crossing point" ( $Cp$ ) expérimentalement mesurées (valeur moyenne de trios répétitions) obtenues pour le gène de référence et les gènes cibles ont été comparés dans les cultures témoins et dans les cultures traitées, puis, normalisées par rapport aux valeurs de  $Cp$  obtenues pour le gène de référence en utilisant le logiciel REST<sup>®</sup> REST-384 (Relative Expression Software Tool). Ce modèle mathématique prend en compte des différences d'efficacité entre le gène de référence et les gènes cibles et les différences des valeurs moyennes de  $Cp$  entre la condition témoin et la condition traitée (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

Les niveaux d'expression des gènes cibles, normalisés par le niveau d'expression du gène de référence, sont exprimés en tant que facteurs de régulation dans la condition traitée par rapport à la condition témoin : avec le facteur =  $(E_{\text{cible}})^{\Delta C_p \text{ cible (témoin-traité)}} / (E_{\text{réf}})^{\Delta C_p \text{ réf (témoin-traité)}}$ . Les facteurs de régulation sont testés pour leur significativité par le test "Pair Wise Reallocation Randomisation Test<sup>©</sup>" avec  $p = 0.001$  à l'aide du logiciel REST<sup>®</sup> REST-384 (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).



## Résultats et Discussion





## **CHAPITRE I :**

### **Recherche de conditions expérimentales adaptées pour l'étude *in vitro* de la régulation de la mycotoxinogenèse de *Fusarium***





Le potentiel toxigène peut être considéré comme une caractéristique d'une souche de *Fusarium*. Il est défini par la capacité du champignon à produire des mycotoxines, de façon qualitative (chénotype DON/ADON ou NIV/FX) et quantitative (Ponts, 2005). Le potentiel toxigène d'une souche a été arbitrairement défini au laboratoire par le type et la teneur en mycotoxines de grains stériles inoculés et placés à 25°C pendant 21 jours ( $a_w \approx 1$ ). En effet, la production de mycotoxines par *Fusarium* serait induite sur certains substrats solides naturels (Megalla *et al.*, 1987 ; Bily, 2003). Cependant, ces types de milieux sont très complexes tant par leurs structures que par leurs compositions biochimiques et ne facilitent donc pas l'étude de l'influence de composés individuels sur la biosynthèse des mycotoxines (Bakan, 1998 ; Bily, 2003), ce qui est en grande partie l'objet de notre étude. Les milieux de culture liquides sont généralement mieux adaptés pour ces types de travaux. L'étude de la production de mycotoxines par *Fusarium* en culture liquide peut s'effectuer à l'aide de différents types de milieux. Nous avons alors défini la notion de potentiel toxigène "en cultures liquides" qui, comme le potentiel toxigène "sur grains" est défini par la capacité des souches, qualitative (chénotype DON/ADON ou NIV/FX) et quantitative, à produire des mycotoxines en cultures liquides. La production de mycotoxines par *Fusarium* est également induite sur certains milieux de culture liquide. Dans le premier chapitre de cette thèse, nous avons étudié les variations du potentiel toxigène "en cultures liquides" en fonction des souches de *Fusarium*, du dispositif de culture mis en oeuvre, du milieu de culture utilisé et du temps. Nous avons également comparé les potentiels toxigènes "en cultures liquides" de souches de *Fusarium* à leurs potentiels toxigènes "sur grains".

**L'objectif de cette étude sera de définir des conditions expérimentales adaptées permettant l'étude *in vitro* de la mycotoxinogénèse de *Fusarium* en cultures liquides afin d'étudier par la suite l'influence de composés individuels sur la biosynthèse des mycotoxines.**

**Tableau 10 : Illustration des fluctuations inter expérimentation du potentiel toxigène en cultures standard.**

Les niveaux de production en TCT B de la souche de *F. graminearum* INRA 349 cultivée pendant 21 jours en cultures standard ont été collectés au cours de plusieurs expérimentations.

Date de la culture	TCT B ( $\mu\text{g/g}$ )
Octobre 2003	NQ
Novembre 2003	16515
Février 2004	NQ
Mai 2004	NQ
Mai 2004	NQ
Août 2004	6724
Novembre 2004	1263
Février 2005	40
Mai 2005	2915
Juin 2005	2

*NQ : niveaux non quantifiables*

## **I. 1. Préambule : non reproductibilité et non répétabilité des niveaux de productions de toxines en culture liquide sur milieu GYEP**

Le milieu de culture liquide GYEP est préconisé dans la littérature comme le plus adapté pour la production *in vitro* de mycotoxines par *Fusarium* (Ueno *et al.*, 1975 ; Miller *et al.*, 1983 ; Miller et Greenhalgh, 1985 ; Bakan, 1998). Au laboratoire, l'étude de la mycotoxinogénèse de *Fusarium* est réalisée classiquement en cultures agitées, dans des fioles Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu de culture liquide GYEP ("cultures standard") (cf. Matériel et Méthodes). De nombreux problèmes de non reproductibilité et de non répétabilité (fluctuations inter et intra expérimentations) des niveaux de TCT B produits par *Fusarium* en cultures standard sont couramment rencontrés.

### **I. 1. 1. Fluctuations inter expérimentations du potentiel toxigène de *Fusarium* en cultures standard**

Dans les conditions de cultures standard, il est courant d'observer des problèmes de fluctuations du niveau d'expression du potentiel toxigène au cours du temps (fluctuations inter expérimentations) de certaines souches de *Fusarium*.

A titre d'illustration, les niveaux de production en TCT B de la souche de *F. graminearum* INRA 349 cultivée pendant 21 jours en cultures standard ont été collectés au cours de plusieurs expérimentations et sont présentées dans le tableau 10. Ainsi, au cours du temps, d'une expérimentation à une autre, les niveaux de TCT B produits par une même souche cultivée dans des conditions identiques s'avèrent extrêmement variables, pouvant fluctuer de valeurs non quantifiables en HPLC ( $< 1\mu\text{g/mL}$ ) à des valeurs très fortes, alors que les productions de biomasses fongiques étaient peu différentes (données non représentées).

Cette variabilité inter expérimentations de l'expression du potentiel toxigène de *Fusarium* en cultures liquides standard n'est pas une constatation spécifique au laboratoire. Il semble que d'autres laboratoires travaillant sur les mycotoxines de *Fusarium* rencontrent également les "déboires" d'expérimentation où *Fusarium* exprime un potentiel toxigène variable au cours du temps alors que la souche est habituellement forte productrice. Cependant, peu d'articles scientifiques font mention de ce sujet ; ce phénomène est tout de même rapporté et parfois discuté dans quelques travaux (Bakan, 1998 ; Covarelli *et al.*, 2004 ; Ponts, 2005). Selon Miller *et al.* (1983), les principaux facteurs influençant la biosynthèse de

**Tableau 11 : Illustration des fluctuations intra expérimentation du potentiel toxigène en cultures standard.**

Pour chaque répétition, les niveaux de production en TCT B de la souche de *F. graminearum* INRA 349 cultivée pendant 14 jours (expérimentation 1) ou 26 jours (expérimentation 2) en cultures standard ont été collectés.

Répétition	TCT B ( $\mu\text{g/g}$ )	
	Expérimentation 1	Expérimentation 2
1	372	898
2	321	3604
3	26264	340

TCT B par *F. graminearum* sont la teneur en oxygène, la teneur et la source de carbone du milieu, le pH (et sa variation) et l'existence d'une faible concentration d'une source d'azote organique. L'extrait de levure contenu dans le milieu de culture GYEP constituerait une source d'azote organique et contiendrait des facteurs de croissance inconnus, qui influenceraient grandement la croissance et la toxinogénèse du champignon (Miller et Greenhalgh, 1985 ; Bakan, 1998). La composition chimique du milieu GYEP, et notamment la variabilité de la composition de l'extrait de levure qu'il contient, pourrait être impliqué dans la variabilité du potentiel toxinogène de *Fusarium* en cultures liquides GYEP. En effet, des travaux ont montré qu'en fonction du lot d'extrait de levure utilisé, les niveaux de production de toxines peuvent varier de façon importante (Miller et Young, 1985 ; Miller et Greenhalgh, 1985). La composition du milieu GYEP est certainement soumise à fluctuations au cours du temps, du fait de l'état d'oxydation de l'extrait de levure, mais également du fait du lot d'extrait de levure utilisé. Cependant, au cours de ses travaux, Ponts (2005) a utilisé le même lot d'extrait de levure pour ses expériences et a quand même observé des fluctuations inter expérimentations du potentiel toxinogène de la souche de *F. graminearum* INRA 349. Ponts (2005) a observé plusieurs fois que de façon aléatoire, la souche de *F. graminearum* INRA 349 habituellement forte productrice de TCT B en cultures standard n'exprimait pas son potentiel toxinogène et ne synthétisait que des niveaux minima en TCT B. Par conséquent, les fluctuations inter expérimentation du potentiel toxinogène de *Fusarium* en cultures standard restent de cause inconnue.

### **I. 1. 2. Fluctuations intra expérimentations du potentiel toxinogène de *Fusarium* en cultures standard**

Dans les conditions de cultures standard, il est également courant d'observer une fluctuation importante dans les niveaux de production de toxines entre les répétitions d'une même expérimentation (fluctuations intra expérimentations). L'existence de fluctuations intra expérimentations a pour conséquence d'affaiblir la significativité d'éventuelles modulations par divers traitements, ce qui est justement l'objet d'une grande partie de cette étude.

A titre d'illustration, les niveaux de production en TCT B obtenus pour trois répétitions de la souche de *F. graminearum* INRA 349 au cours de deux expérimentations indépendantes en cultures standard GYEP sont présentés dans le tableau 11. Au sein de la même expérimentation, d'une fiole Erlenmeyer à une autre, les niveaux de TCT B produits par la



même souche cultivée dans des conditions identiques s'avèrent extrêmement variables, pouvant fluctuer de 321 à 26264 µg/g de biomasse sèche dans l'expérimentation 1 et de 340 à 3604 µg/g de biomasse sèche dans l'expérimentation 2.

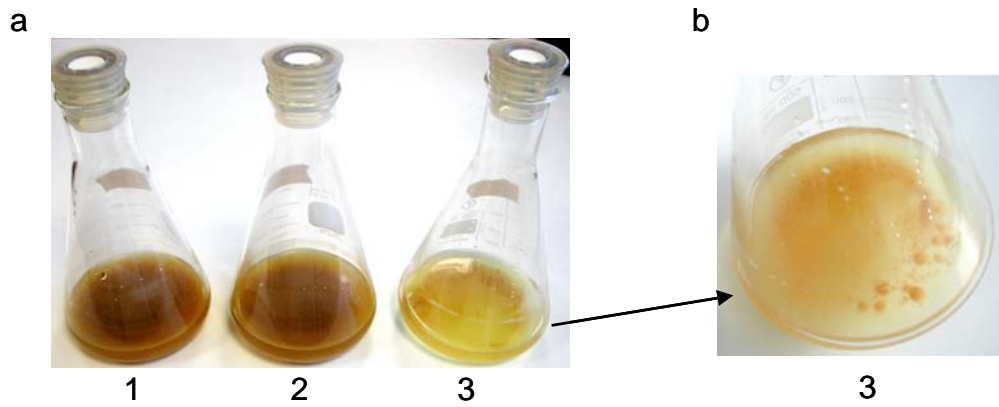
Plusieurs hypothèses peuvent être proposées afin d'expliquer ces fluctuations intra expérimentations du potentiel toxigène de *Fusarium* en cultures standard. Ces hypothèses sont discutées ci-après.

#### **a- Conditions d'aération différentes selon les fioles**

Dans les cultures standard, les conditions de température, d'agitation et d'aération ont été optimisées par Bakan (1998). Les conditions d'aération (teneur en O<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub>) ont une influence sur la biosynthèse de mycotoxines (Greenhalgh *et al.*, 1983 ; Miller *et al.*, 1983). La nature des bouchons module les échanges gazeux dans les fioles Erlenmeyer utilisées pour les cultures. Selon les recommandations de Ponts (2005), des bouchons commerciaux Bugstopper® sont utilisés pour fermer les fioles Erlenmeyer au lieu des traditionnels bouchons en coton cardé enveloppés de gaze fabriqués manuellement. Il est probable que les bouchons standardisés permettent une aération identique entre les différentes fioles contrairement aux bouchons fabriqués manuellement de taille et de densité variable (Ponts, 2005). Cependant, nous avons observé que malgré l'utilisation des bouchons Bugstopper®, des fluctuations intra expérimentations existent toujours. Il semble donc que les conditions d'aération des fioles ne soient pas la seule cause des fluctuations intra expérimentations.

#### **b- Développements morphologiques différents du mycélium selon les fioles**

Au cours de notre étude, nous avons remarqué au sein des répétitions d'une même expérimentation des développements morphologiques différents du mycélium en fonction des fioles Erlenmeyer. Ces différences de développement morphologique du champignon sont de causes inconnues et semblent aléatoires selon les fioles car ils sont observés pour une même souche cultivée dans des conditions identiques. Nous avons constaté que ces différences de développements morphologiques du mycélium peuvent être reliées aux différences de niveaux de TCT B produits intra expérimentations. Notre hypothèse est que les variations du niveau



**Figure 26 : Illustration des développements morphologiques différents du mycélium en fonction des fioles Erlenmeyer.**

Les photos présentent les trois répétitions de la souche de *F. graminearum* INRA 349 après 14 jours en cultures standard.

a : photos des fioles 1, 2 et 3, correspondant à trois répétitions

b : photo de la fiole 3 où le mycélium se développe en formant des "billes"



de production de TCT B intra expérimentations pourraient être lié à l'état de développement du mycélium de *Fusarium* selon les fioles Erlenmeyer.

Après inoculation, les fioles sont incubées à 25°C, à l'obscurité et agitées à 150 rpm dans un incubateur Multitron<sup>®</sup>. Cette agitation assez intense pourrait entraîner un développement hétérogène du mycélium selon les fioles. Il a été observé que le mycélium pouvait se développer soit de façon homogène dans le milieu de culture, soit de façon hétérogène en formant des "billes" ou des filaments. La figure 26 illustre le développement hétérogène de la souche de *F. graminearum* INRA 349 après 14 jours en cultures liquides standard. Alors que dans les fioles 1 et 2, le développement du champignon est homogène, dans la fiole 3, le mycélium se développe de façon hétérogène en formant des "billes". Les niveaux de TCT B produits sont de 321 et 372 µg/g de biomasse sèche respectivement dans les fioles 1 et 2 et 26264 µg/g de biomasse sèche dans la fiole 3.

D'autres expérimentations nous ont amené à la même conclusion, il semble que les fluctuations intra expérimentations du potentiel toxigène de *Fusarium* en cultures standard soient liées aux différences de développement morphologique du champignon. Il semblerait que si le mycélium se développe de façon homogène et dispersé dans le milieu de culture, les niveaux de TCT B produits par une souche donnée soient moins importants que lorsqu'il se développe en formant des "billes". Dans certaines fioles, le mycélium réussit à adhérer aux parois de la fiole pour se développer et, il semble que dans ce cas la production de TCT B soit plus importante dans ces fioles (Pinson-Gadais L., communication personnelle).

A l'état naturel, le champignon *Fusarium* se développe sur un substrat statique qu'est le grain. Par conséquent, une incubation des fioles avec une agitation permanente de 150 rpm ne mime pas du tout les conditions naturelles dans lesquelles se développe *Fusarium*. Nous pensons que ces différences de développement morphologiques du mycélium de *Fusarium* selon les fioles pourraient expliquer les variations aléatoires intra expérimentations des niveaux de production de TCT B souvent importantes. De plus, les couleurs de ces trois fioles Erlenmeyer sont différentes, ce qui suggère l'accumulation de composés (métabolites ou pigments) dans les fioles 1 et 2.

### **c- Accumulation d'intermédiaires de la biosynthèse des TCT B dans certaines fioles**

Dans des conditions où la production de TCT B n'est pas observée ou reste très faible, Ponts (2005) a mis en évidence l'accumulation d'intermédiaires de la voie de biosynthèse des

**Tableau 12 : Surface des pics de DON, de 15-ADON et de l'extrapic X1 en fonction des fioles Erlenmeyer.**

Les résultats présentent les trois répétitions de la souche de *F. graminearum* INRA 349 après 14 jours en cultures standard.

Répétition	DON	15-ADON	$\Sigma$ DON+15-ADON	extrapic X1	$\Sigma$ DON+15-ADON+X1
1	25	123	148	1863	2011
2	21	111	132	1439	1571
3	224	7364	7588	431	8019



**Figure 27 : Illustration du nombre d'essai limité en cultures standard.**

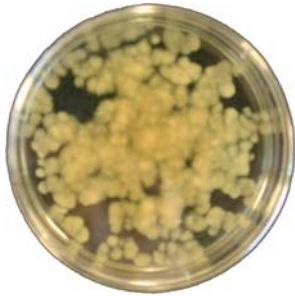
TCT B dans les milieux de culture, notamment d'un composé avec un temps de rétention de 15,9 min (extrapic X1). Après analyse par HPLC-MS/MS, deux composés ont été identifiés correspondant à cet extrapic X1, il s'agit de l'isotrichodermol et de l'isotrichotriol et/ou le trichotriol, qui sont des intermédiaires de la voie de biosynthèse des trichothécènes (Atanassova-Pénichon *et al.*, 2006).

Dans notre exemple précédent (cf § I. 1. 2.) où les niveaux de TCT B produits par la même souche cultivée dans des conditions identiques étaient extrêmement variables d'une fiole Erlenmeyer à une autre (figure 26), nous avons recherché dans les profils chromatographiques la présence de l'extrapic X1. Et, effectivement, cet extrapic a été identifié. Le tableau 12 présente pour chaque répétition les surfaces des pics correspondant au DON, au 15-ADON et à l'extrapic X1. Dans les fioles 1 et 2, les niveaux de TCT B produits sont faibles et l'extrapic X1 s'accumule dans les milieux de culture. Dans la fiole 3, les niveaux de TCT B produits sont très importants, l'extrapic X1 est présent mais sa surface est beaucoup plus modeste que dans les fioles 1 et 2. Il semblerait que dans les fioles 1 et 2, pour une raison inconnue, la voie de biosynthèse des TCT B soit interrompue entraînant l'accumulation d'intermédiaires de la voie de biosynthèse des TCT B.

En conclusion, il semble que les fluctuations intra expérimentations du potentiel toxigène de *Fusarium* en cultures standard pourraient, au moins en grande partie, être reliées à une interruption de la voie de biosynthèse des trichothécènes dans certaines fioles. Cette interruption de la voie de biosynthèse entraînerait l'accumulation d'intermédiaires de la voie, ceci pourrait être relié à un développement morphologique différent du mycélium selon les fioles.

### **I. 1. 3. Nombre d'essai limité**

Les cultures standard dans des fioles Erlenmeyer de 500 mL sont relativement fastidieuses à mettre en œuvre (figure 27). Chaque fiole Erlenmeyer doit être autoclavée deux fois à 110°C pendant 20 min avant toute utilisation pour une culture. Après la culture, les fioles Erlenmeyer doivent être désinfectées puis lavées. De plus, réduire les volumes de culture permettrait d'augmenter le nombre d'essai mais également d'abaisser les volumes de produits utilisés.



**Figure 28 : Mini culture de 14 jours de la souche de *F. graminearum* INRA 349.**

Les mini cultures statiques sont réalisées en petite boîte de Pétri contenant 8 mL de milieu de culture GYEP liquide.

#### **I. 1. 4. Objectif et solutions proposées**

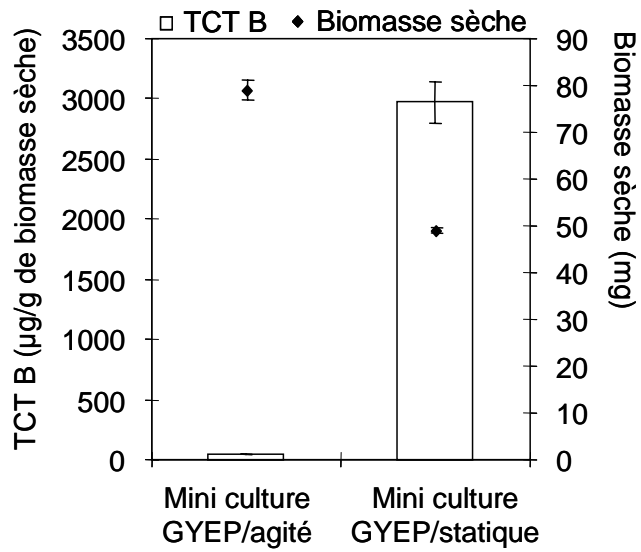
L'objectif du premier chapitre de cette étude est de développer un nouveau dispositif de cultures liquides adaptées à l'étude *in vitro* de la régulation de la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. Compte tenu des problèmes rencontrés au laboratoire cités précédemment, les "pistes de progression" proposées et testées par la suite sont les suivantes :

- pallier les problèmes de fluctuation au cours du temps (inter expérimentations) du potentiel toxigène en cultures liquides par l'utilisation d'un milieu dont la composition chimique est complètement maîtrisée que l'on nommera milieu synthétique,
- pallier les problèmes de fluctuation au sein des répétitions d'une même expérimentation (intra expérimentations) du potentiel toxigène en cultures liquides par la mise en place d'un système de culture statique, permettant un développement morphologique homogène du mycélium,
- miniaturiser le système de culture afin d'augmenter le nombre d'essais et de limiter les quantités de composés du grain de blé à supplémenter aux cultures par la mise en place d'un système de culture en petite boîte de Pétri.

#### **I. 2. Choix d'un dispositif de culture : mini cultures statiques**

Nous avons décidé d'utiliser un système de culture statique en petite boîte de Pétri (mini cultures) contenant 8 mL de milieu de culture liquide. Ce dispositif de culture permet un développement morphologique homogène du mycélium du champignon à la surface du milieu de culture (figure 28). Le mycélium se développe également en profondeur dans le milieu de culture et, après 10 jours d'incubation, le mycélium est pratiquement en contact avec la totalité du milieu de culture. Ainsi, lors des études concernant l'influence de composés individuels sur la biosynthèse des mycotoxines, le mycélium sera en contact avec les composés étudiés dissous dans le milieu de culture.

Au cours de notre étude, avec ce dispositif de culture, il n'a jamais été observé de différences de développement morphologique du mycélium intra expérimentations. Nous avons observé qu'il y avait peu de variation entre les niveaux de production de TCT B intra expérimentations. A titre d'illustration, la variation intra expérimentations des niveaux de TCT B produits est en moyenne de 11,5% si l'on considère neuf expérimentations indépendantes menées avec la souche INRA 349 cultivées pendant 10 jours en mini culture



**Figure 29 : Comparaison des conditions agitée et statique en mini cultures GYEP.**

Les niveaux de biomasse sèche et de TCT B produits par la souche de *F. graminearum* INRA 349 sont évalués après 14 jours de mini culture.

statiques GYEP. Ainsi, les cultures *in vitro* en mini cultures statiques permettent réellement de minimiser la variabilité des niveaux de TCT B produits par *Fusarium* entre les répétitions d'une même expérimentation. De plus, il est clair que cette méthode de culture statique reflète mieux l'état naturel de développement de *Fusarium* sur le grain que la méthode agitée où le mycélium est complètement immergé.

La figure 29 présente les biomasses sèches et les niveaux de TCT B produits par la souche de *F. graminearum* INRA 349 cultivée en mini culture GYEP pendant 14 jours en condition agitée ou statique. La biomasse sèche produite moyenne est de 79 mg en mini culture agitée et 49 mg en mini culture statique. Il semble que l'agitation des cultures favorise la croissance du mycélium. Concernant la biosynthèse des toxines, les niveaux de TCT B produits sont très supérieurs lorsque les cultures sont statiques.

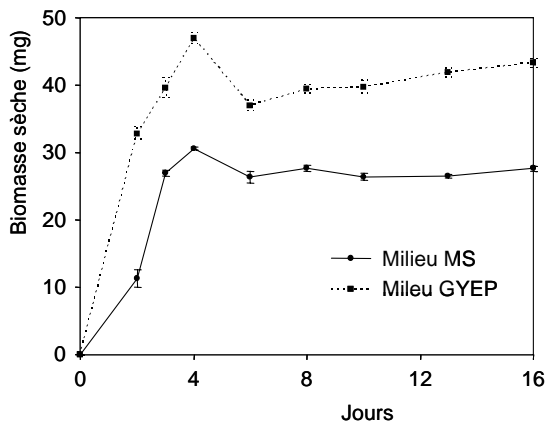
Indépendamment de ces considérations, les mini cultures statiques qui sont rapides à mettre en œuvre permettent d'augmenter considérablement le nombre d'essai, de minimiser les volumes de produits utilisés et de réduire les temps d'incubation.

**Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser le dispositif des mini cultures statiques pour la suite de notre étude.**

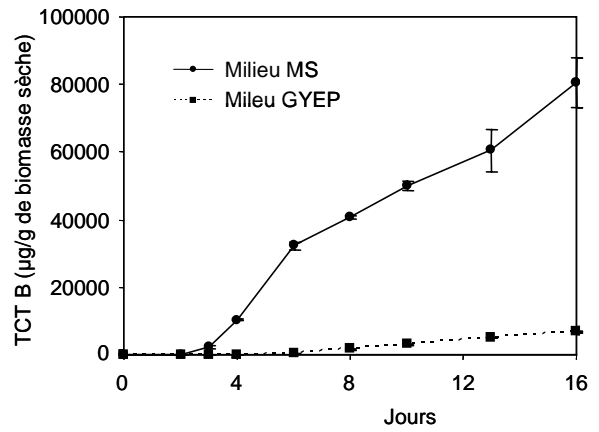
### **I. 3. Choix d'un milieu de culture : milieu synthétique pour mycotoxines**

Nous avons décidé d'utiliser pour l'étude un milieu synthétique pour mycotoxines appelé milieu MS (cf. Matériel et Méthodes, p. 62). Ce milieu de culture est pauvre et peu tamponné, la source d'azote est l'ammonium et la source de carbone est le glucose à 20 g/L. Il contient des éléments traces et les vitamines nécessaires. Le milieu MS est un milieu minimum permettant la production de mycotoxines par *Fusarium*. Un milieu synthétique, dont on connaît exactement tous les constituants, présente un avantage par rapport au milieu GYEP dont la composition chimique n'est pas totalement maîtrisable par la présence d'extrait de levure. Dans cette partie de l'étude, nous avons comparé les potentiels toxigènes en mini cultures liquides en milieu GYEP et en milieu MS de plusieurs souches de *Fusarium*, d'espèces et de chémotypes différents.

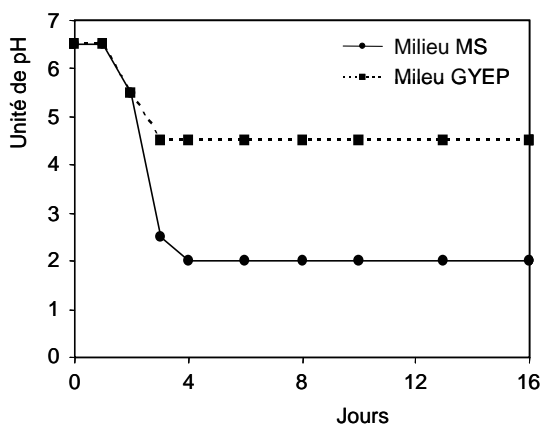
a



b



**Figure 30 : Cinétique de croissance du mycélium (a) et de production de TCT B (b) par la souche INRA 349 cultivée sur milieu GYEP et sur milieu MS.**



**Figure 31 : Evolution du pH au cours des mini culture statique de la souche INRA 349 sur milieu GYEP et sur milieu MS.**



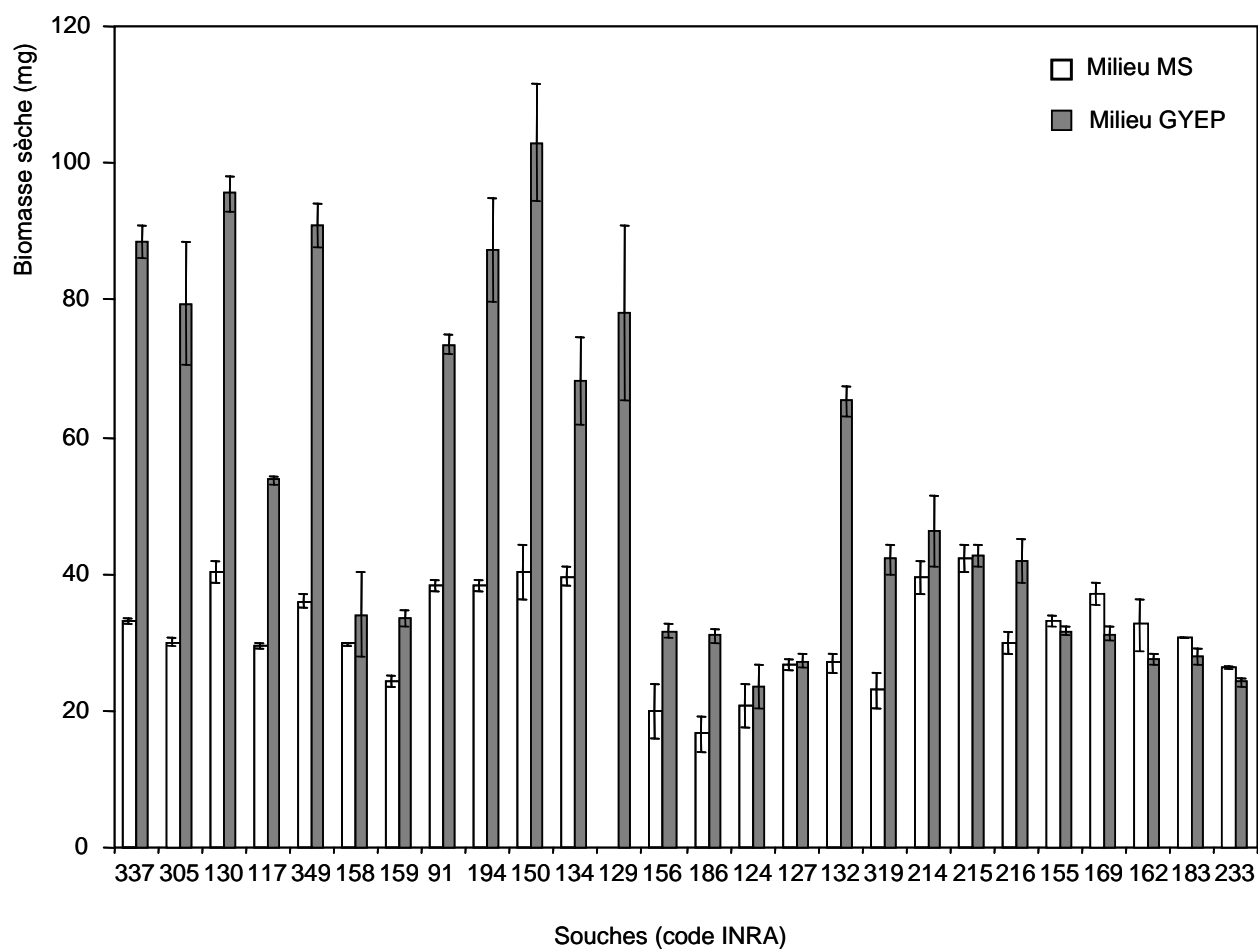
### **I. 3. 1. Comparaison du potentiel toxigène de la souche INRA 349 en mini cultures liquides sur milieu MS et sur milieu GYEP**

Les figures 30a et 30b présentent respectivement la cinétique de croissance du mycélium et la cinétique de production de TCT B par la souche de *F. graminearum* INRA 349 cultivée pendant 16 jours en mini culture statique sur milieu GYEP et sur milieu MS.

Les cinétiques de croissance du mycélium sont d'allure semblable sur les deux milieux de cultures considérés. La croissance du mycélium commence dès les premières 48 h de culture, atteint un maximum après quatre jours de culture puis se stabilise jusqu'à 16 jours de culture. Dans nos conditions expérimentales, la croissance du mycélium est plus importante sur milieu GYEP que sur milieu MS pendant toute la durée de la culture. En effet, après quatre jours de culture, la biomasse sèche est de 47 mg sur milieu GYEP et 31 mg sur milieu MS. En moyenne, considérant les 16 jours de culture, la croissance du mycélium est près de 37% plus importante sur milieu GYEP que sur milieu MS.

En ce qui concerne les niveaux de production de TCT B, l'allure générale des cinétiques est également identique quelque soit le milieu de culture considéré. La cinétique de production de TCT B présente une phase de latence de 48 h, puis la production de TCT B s'initie dans les deux milieux à partir de trois jours et l'accumulation continue jusqu'à 16 jours. Pendant toute la durée de la culture, les rendements en TCT B produits en milieu MS sont largement supérieurs à ceux produits en milieu GYEP (plus de 10 fois supérieurs à 16 jours). Ceci confirme l'absence de lien entre la mycotoxinogénèse et la croissance du mycélium. La croissance fongique est plus importante en milieu GYEP qu'en milieu MS alors que la production de toxines y est nettement inférieure.

Selon Bakan (1998), la toxigenèse pourrait être induite en l'absence de stress nutritif, mais, elle serait fortement activée lorsqu'un élément du milieu deviendrait limitant. Ainsi, dans notre cas, la toxigenèse de la souche étudiée est induite en même temps sur milieu GYEP et sur milieu MS. Puis, un ou plusieurs éléments pourraient devenir limitant dans le milieu MS, et seraient ainsi un facteur déclenchant conduisant à une activation de la toxigenèse aux dépens de la croissance du champignon (Miller *et al.*, 1983). Le glucose constitue la source de carbone du milieu MS et du milieu GYEP. La concentration en glucose est de 20 g/L dans le milieu MS et 50 g/L dans le milieu GYEP. Nos résultats sont en accord avec ceux de Miller *et al.* (1983) qui ont montré que les niveaux de TCT B produits par *F. graminearum* étaient moins importants sur un milieu GYEP contenant 50 g/L de glucose que



**Figure 32 : Croissance de 26 souches de *Fusarium* cultivées pendant 10 jours en mini culture statique sur milieu GYEP et sur milieu MS.**

sur un milieu GYEP contenant 20 g/L de glucose. Pestka *et al.* (1985) observent également chez *F. graminearum* que l'augmentation de la concentration en sucres du milieu de culture permet d'augmenter la biomasse fongique sèche mais diminue les niveaux de DON produits.

Au cours de cette expérimentation, nous avons également suivi l'évolution du pH dans les milieux de culture au cours de la cinétique d'accumulation des TCT B par la souche INRA 349 (figure 31). En début de culture, le pH a une valeur de 6,5 pour les deux milieux. Puis, le pH s'acidifie très rapidement et atteint une valeur de 4,5 en milieu GYEP puis se stabilise. Cette acidification est beaucoup plus prononcée en milieu MS puisque le pH atteint une valeur de 2. Ce niveau d'acidification fort en milieu MS pourrait limiter la croissance du champignon à partir de quatre jours. Quel que soit le milieu, l'acidification du pH est concomitante avec l'initiation de la production de TCT B. Ceci a également été observé par Bily (2003) pour des cultures de *F. graminearum*. Un lien entre la différence d'acidification des milieux au cours de la culture et la différence des niveaux de TCT B produits est possible.

Considérant les résultats ci-dessus obtenus avec la souche INRA 349, il apparaît que, dans nos conditions expérimentales, le milieu GYEP favoriserait la croissance du mycélium et que le milieu MS favoriserait la mycotoxinogénèse aux dépens de la croissance du champignon.

### **I. 3. 2. Comparaison du potentiel toxigène de 26 souches de *Fusarium* en mini cultures liquides sur milieu MS et sur milieu GYEP**

Nous avons voulu confirmer le résultat précédent obtenu avec la souche de *F. graminearum* INRA 349 (chénotype DON/ADON) en élargissant l'étude à un plus grand nombre de souches de *Fusarium*, d'espèces et de chénotypes différents. Parmi les 26 souches de *Fusarium* testées, 12 appartiennent à l'espèce *F. culmorum* et 14 à l'espèce *F. graminearum*. Les chénotypes DON/ADON et NIV/FX sont également représentés pour chaque espèce. Nous avons comparé les croissances et les niveaux de TCT B produits de 26 souches de *Fusarium* cultivées pendant 10 jours en mini cultures liquides statiques sur milieu GYEP et sur milieu MS (figure 32 et tableau 13).

Concernant les croissances du mycélium (figure 32), nous constatons que de façon générale, les croissances sont plus faibles mais plus homogènes en milieu MS qu'en milieu GYEP. En effet, la croissance moyenne de 25 des 26 souches de *Fusarium* (la souche INRA 129 ne se développe pas sur le milieu MS alors qu'en milieu GYEP elle a une croissance

**Tableau 13 : Potentiel toxigène en mini cultures liquides sur milieu MS et GYEP et potentiel toxigène sur grains de 26 souches de *Fusarium*.**

Les potentiels toxigènes définis sur grains sont exprimés en µg/g de grains sec infectés. Les potentiels toxigènes en mini cultures liquides sont exprimés en µg/g de biomasse sèche et ont été évalués après 10 jours de culture.

Code INRA	Espèce	Chémotype	Mini cultures liquides		Cultures sur grains
			Milieu MS	Milieu GYEP	
INRA 349	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	23437 ± 1557	1052 ± 33	444
INRA 124	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	11320 ± 725	0	318
INRA 215	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	3851 ± 2	0	/
INRA 117	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	1849 ± 56	74 ± 2	500
INRA 159	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	976 ± 217	0	3492
INRA 155	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	628 ± 32	2011 ± 341	860
INRA 156	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	435 ± 12	336 ± 4	100
INRA 233	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	168 ± 83	679 ± 85	28
INRA 169	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	128 ± 23	0	15
INRA 305	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	93 ± 6	20 ± 4	112
INRA 214	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	76 ± 10	271 ± 75	/
INRA 158	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON	34 ± 11	0	1
INRA 134	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	31 ± 0,3	185 ± 4	1190
INRA 127	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	0	0	105
INRA 319	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	4547 ± 485	6333 ± 464	9
INRA 91	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	436 ± 23	123 ± 13	115
INRA 130	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	425 ± 42	497 ± 38	64
INRA 186	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	205 ± 17	0	8
INRA 132	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	157 ± 39	2032 ± 106	120
INRA 183	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	111 ± 21	0	14
INRA 162	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	75 ± 10	647 ± 55	143
INRA 337	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	16 ± 2	91 ± 5	38
INRA 129	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	0	720 ± 12	273
INRA 194	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	0	23 ± 3	57
INRA 150	<i>F. graminearum</i>	NIV/FX	0	0	21
INRA 216	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	0	0	/

/ données non disponibles

comparable aux autres souches) est de  $31 \pm 7$  mg en milieu MS alors que la croissance moyenne des 26 souches de *Fusarium* est de  $53 \pm 26$  mg en milieu GYEP. Parmi les 26 souches de *Fusarium* testées, seulement quatre souches ont une croissance légèrement plus importantes (jusqu'à 6 mg) en milieu MS qu'en milieu GYEP. Seize souches ont une croissance plus importantes (de 9 à 78 mg) en milieu GYEP qu'en milieu MS. Six souches ont une croissance équivalente quel que soit le milieu de culture. Le milieu GYEP semble donc être un milieu de culture plus favorable à la croissance du mycélium que le milieu MS, ce qui confirme ce que nous avons déjà observé pour la souche INRA 349.

Le tableau 13 présente les potentiels toxigènes définis en mini cultures liquides en milieu MS et GYEP des 26 souches de *Fusarium*. Les résultats obtenus mettent en évidence une grande variation des niveaux de TCT B produits selon le milieu de culture et selon les souches considérées. Parmi les 26 souches de l'étude, cinq souches ne produisent pas de toxines en milieu MS (INRA 127, INRA 129, INRA 194, INRA 150 et INRA 216), 10 souches n'en produisent pas en milieu GYEP (INRA 124, INRA 215, INRA 159, INRA 169, INRA 158, INRA 127, INRA 186, INRA 183, INRA 150, et INRA 216) et trois souches ne produisent pas de toxines quel que soit le milieu considéré (INRA 127, INRA 150 et INRA 216). Parmi les souches qui produisent des TCT B, 12 souches produisent plus de mycotoxines en milieu MS qu'en milieu GYEP et 11 souches ont des niveaux de TCT B produits plus importants en milieu GYEP qu'en milieu MS. Dans le milieu MS, les niveaux maxima de TCT B produits sont obtenus avec la souche INRA 349 et sont de  $23437 \mu\text{g/g}$  de biomasse sèche. En milieu GYEP, la souche INRA 319 est la plus forte productrice avec des niveaux de  $6333 \mu\text{g/g}$  de biomasse sèche. Peu de souches produisent des niveaux équivalents de toxines sur les deux milieux testés. Pour des raisons inconnues, certaines souches semblent produire plus de mycotoxines lorsqu'elles sont cultivées sur l'un ou l'autre des milieux de culture.

Compte tenu des résultats obtenus, il n'est donc pas possible d'affirmer qu'un milieu "est mieux qu'un autre" en terme de mycotoxinogénèse. Selon la souche, la biosynthèse de toxines sera plus importante sur l'un ou l'autre des deux milieux. Cependant, l'utilisation de ce milieu synthétique a permis de mettre en évidence que sept souches que l'on pensait non productrices de TCT B au cours d'expérimentations menées en milieu GYEP sont en fait tout à fait capable de produire des mycotoxines lorsqu'elles sont cultivées sur le milieu MS alors que seulement deux souches ne produisent pas de toxines en milieu MS et en produisent en



milieu GYEP. Par conséquent, le milieu de culture liquide GYEP préconisé dans la littérature comme le plus adapté pour la production *in vitro* de mycotoxines par *Fusarium* ne serait pas le plus adapté. Nous avons mis ici en évidence l'utilisation d'un autre milieu de culture liquide apparemment "aussi adapté" que le milieu GYEP en terme de détermination de la production *in vitro* de mycotoxines par *Fusarium*.

### **I. 3. 3. Relation entre potentiel toxigène défini sur grains et potentiel toxigène défini en cultures liquides**

En plus des niveaux de TCT B produits par les 26 souches de *Fusarium* cultivées sur milieu MS et sur milieu GYEP, le tableau 13 présente aussi les potentiels toxigènes définis sur grains (données antérieures disponibles au laboratoire). Les résultats présentés mettent en évidence une absence totale de relation entre potentiel toxigène défini sur grains et potentiel toxigène défini en cultures liquides quel que soit le milieu de culture considéré. Nos résultats sont en accord avec ceux de Ponts (2005) qui avaient également constaté l'absence de cohérence entre potentiel toxigène défini sur grains de 12 souches de *Fusarium* et production de toxines *in vitro* en cultures standards GYEP. A titre d'exemple, la souche INRA 349 produit 12 et 14 fois plus de toxines respectivement en milieu MS et GYEP que la souche INRA 117, pour des potentiels toxigènes sur grains semblables (de l'ordre de 500 µg/g de grains secs infectés). Un autre exemple concerne la souche INRA 159 qui possède le potentiel toxigène sur grains le plus fort parmi les 26 souches de notre étude mais, n'est pas pour autant la souche qui produit le plus de toxines en mini cultures liquides quel que soit le milieu.

Par conséquent, nous ne pouvons pas nous baser sur les potentiels toxigènes définis sur grains afin de sélectionner des souches plus ou moins productrices de TCT B pour une étude en cultures liquides. Cette démarche était généralement pratiquée au laboratoire. Il conviendrait maintenant de tester les souches de *Fusarium* de la mycothèque du laboratoire pour leurs potentiels toxigènes en mini cultures liquides avant de les sélectionner pour des études pour leur capacité à produire ou pas des TCT B.

**Tableau 14 : Fluctuations inter expérimentations des niveaux de TCT B produits par la souche INRA 349 en mini cultures statiques sur milieu GYEP et MS.**

Les niveaux de TCT B produits sont analysés après 10 jours de culture. Les résultats de 9 expérimentations indépendantes sont présentés.

Expérimentation	TCT B ( $\mu\text{g/g}$ de biomasse sèche)	
	Milieu GYEP	Milieu MS
1	1962	29178
2	7871	29389
3	1052	42881
4	7251	23437
5	3591	21810
6	6143	38951
7	3130	49878
8	2878	34277
9	5960	20346



### **I. 3. 4. Comparaison en milieu MS et en milieu GYEP des fluctuations du potentiel toxigène en mini culture liquides**

#### **I. 3. 4. 1. Souche INRA 349 : fluctuations sur neuf expérimentations**

Nous avons voulu comparer les fluctuations inter et intra expérimentations du potentiel toxigène en milieu MS et en milieu GYEP. Pour cela, nous avons collecté au cours de neuf expérimentations indépendantes les niveaux de TCT B produits par la souche de *F. graminearum* INRA 349 cultivée pendant 10 jours en mini cultures liquides en milieu GYEP et en milieu MS (tableau 14). Les niveaux de TCT B produits en milieu MS sont en moyenne de 32238 µg/g de biomasse sèche et sont supérieurs à ceux produits en milieu GYEP qui sont en moyenne de 7351 µg/g de biomasse sèche. La fluctuation inter expérimentation (sur neuf expérimentations indépendantes) des niveaux moyens de TCT B produits est de 31% en milieu MS et 55% en milieu GYEP. Au vu de ces résultats, les fluctuations inter expérimentations du potentiel toxigène en culture liquide semblent moins importantes lorsque la souche est cultivée en milieu MS, pour la souche considérée. Si l'on se réfère aux fluctuations inter expérimentations du potentiel toxigène en cultures standard présenté précédemment (cf § I. 1. 1., tableau 10), la souche INRA 349 pouvait de façon aléatoire ne pas produire de TCT B. Ceci n'a jamais été observé au cours de notre étude en mini cultures statiques quel que soit le milieu (GYEP ou MS) (tableau 14). Par conséquent, il est clair que nous avons considérablement amélioré, au moins pour cette souche, le problème des fluctuations inter expérimentations du potentiel toxigène par l'utilisation des mini cultures statiques.

Les fluctuations intra expérimentation moyenne (définie sur neuf expérimentations indépendantes) des niveaux de TCT B produits sont de 8,1% en milieu MS et 11,5% en milieu GYEP.

#### **I. 3. 4. 2. Fluctuations sur deux ou trois expérimentations du potentiel toxigène de 17 souches de *Fusarium***

Nous avons voulu vérifier si le potentiel toxigène en mini cultures statiques sur milieu MS et sur milieu GYEP de différentes souches de *Fusarium* variait au cours du temps. Nous avons collecté les différents résultats obtenus au cours d'expérimentations indépendantes

**Tableau 15 : Fluctuations inter expérimentations des niveaux de TCT B produits par 17 souches de *Fusarium* en mini cultures statiques sur milieu GYEP et MS.**

Les niveaux de TCT B produits sont analysés après 10 jours de culture. Les résultats de 2 ou 3 expérimentations indépendantes sont présentés.

Code INRA	TCT B (µg/g) en milieu MS			TCT B (µg/g) en milieu GYEP		
	1	2	3	1	2	3
INRA 91	615	436	37	91	123	32
INRA 194	146	0	/	0	23	/
INRA 150	0	0	/	36	0	/
INRA 349	42881	23437	34277	1684	1052	2878
INRA159	1079	976	/	2947	0	/
INRA 158	37	34	/	0	0	/
INRA 337	0	16	/	113	91	/
INRA 130	1274	425	195	847	486	61
INRA 117	6425	1849	4542	211	74	0
INRA 305	4581	93	/	0	20	/
INRA 134	0	31	/	51	185	/
INRA 155	280	725	/	143	2011	/
INRA 214	663	76	259	428	271	136
INRA 162	24	75	/	7	647	/
INRA 233	270	167	8732	324	679	88
INRA 132	120	157	2456	1054	2032	1094
INRA 319	5395	4547	6087	4917	6333	0

/ données non disponibles

concernant les niveaux de TCT B produits *in vitro* par 17 souches de *Fusarium*. Ces résultats sont présentés dans le tableau 15. Pour neuf souches de *Fusarium*, nous présentons les résultats de deux expérimentations indépendantes et pour huit souches, les résultats de trois expérimentations. Ces résultats montrent la grande variabilité des niveaux de TCT B produits inter expérimentations quel que soit le milieu de culture considéré. On observe tous les cas de figures : des souches sont faibles productrices de TCT B et ce, quel que soit le milieu de culture (INRA 150, INRA 158, INRA 337) ; des souches sont faibles productrices sur seulement un des milieux de culture, des souches faibles productrices dans une expérimentation deviennent fortes productrices dans une autre expérimentation quelque soit le milieu (INRA 233, INRA 132, INRA 162) et *vice versa* (INRA 305, INRA 319).

### **I. 3. 5. Conclusion sur le choix d'un milieu de culture**

Dans nos conditions expérimentales, si l'on considère uniquement la souche INRA 349, les résultats obtenus montrent que le milieu GYEP serait favorable à la croissance du mycélium et que le milieu MS favoriserait la production de TCT B aux dépens de la croissance du champignon. Si l'on considère un plus grand nombre de souches de *Fusarium*, les conclusions sont moins évidentes. Il semble que le milieu favorisant la mycotoxinogénèse soit souche dépendant. Des fluctuations inter expérimentations du potentiel toxigène en cultures liquides sont malheureusement toujours observables et non négligeables en milieu GYEP mais aussi en milieu MS. Cependant, certaines souches semblent exprimer un potentiel toxigène en cultures liquides constant entre les différentes expérimentations menées. Quatre souches (INRA 132, INRA 349, INRA 117 et INRA 319) semblent avoir un potentiel toxigène en cultures liquides fort et homogène pour trois expérimentations indépendantes en milieu MS pour les souches INRA 117 et INRA 319, en milieu GYEP pour la souche INRA 132 et dans les deux milieux de culture pour la souche INRA 349 (tableau 15).

Cependant, le milieu GYEP est un milieu "complexe" par la présence de l'extrait de levure. Or, par la suite, les travaux vont s'orienter vers l'étude de l'influence de composés individuels sur la biosynthèse des mycotoxines. Afin d'éviter des interférences entre les composés individuels à tester et des composés organiques contenus dans l'extrait de levure, nous avons décidé de ne pas sélectionner le milieu GYEP pour notre étude. Par conséquent, le milieu MS est le milieu de culture liquide que nous avons décidé d'utiliser pour toute la suite de nos travaux.



**Dorénavant, toutes les cultures seront réalisées en mini culture statique et en milieu liquide MS. Les souches modèles choisies pour la suite de l'étude sont les souches INRA 349, INRA 117 et INRA 319 qui semblent exprimer un potentiel toxigène fort et homogène en mini cultures sur milieu MS.**

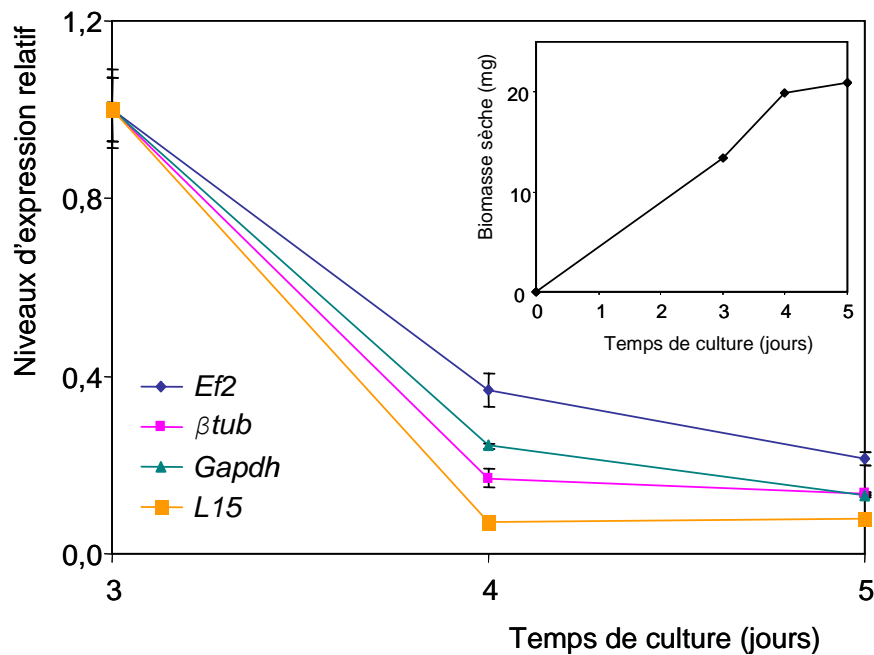
#### **I. 4. Expression de gènes clés impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes B dans nos conditions de culture**

Après avoir défini de nouvelles conditions expérimentales et choisi des souches modèles pour l'étude *in vitro* de la mycotoxinogenèse de *Fusarium*, le profil d'expression de certains gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B a été étudié au cours de la cinétique de production de TCT B par la souche de *F. culmorum* INRA 117. Le profil d'expression des gènes a été réalisée par une technique de RT-PCR en temps réel permettant une analyse fine des variations au cours du temps des niveaux d'expression des gènes candidats.

Les niveaux d'expression de quatre gènes de la voie de biosynthèse (*Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*), du gène impliqué dans l'excrétion des trichothécènes (*Tri12*) et de deux régulateurs positifs de la voie (*Tri6* et *Tri10*) ont été suivis. Le gène *Fpps* qui code la farnesyl pyrophosphate synthétase, enzyme catalysant la formation de farnésyl pyrophosphate, composé à la jonction de la voie des stérols et de la voie des TCT B a également été étudié.

##### **I. 4. 1. Choix d'un gène de référence**

Au laboratoire, l'expression constitutive du gène  $\beta$ -*tub* codant la  $\beta$ -tubuline était classiquement utilisée comme référence interne pour la normalisation des niveaux d'expression des autres gènes étudiés (Ponts, 2003). La  $\beta$ -tubuline est une protéine constituante des microtubules du cytosquelette des cellules. Doohan *et al.* (1999) ont observé que l'expression de la  $\beta$ -tubuline *in vitro* était constitutive et constante au cours du temps. Ponts (2005) a étudié par PCR en temps réel l'expression du gène  $\beta$ -*tub* au cours des cinq premiers jours de croissance en cultures standard GYEP de la souche de *F. graminearum* INRA 349 et a observé que  $\beta$ -*tub* était fortement exprimée au 2<sup>ème</sup> jour de culture et que ce niveau d'expression était fortement réduit (environ 100 fois) au 3<sup>ème</sup> jour puis remontait lentement (variations non significatives) jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour de culture.



**Figure 33 : Niveaux d'expression relatif des gènes *Ef2*, *βtub*, *Gapdh* et *L15* à 3, 4 et 5 jours de culture de la souche de *F. culmorum* INRA 117 et niveaux de biomasse sèche produite.**

Les niveaux d'expression relatifs des gènes *Ef2*, *βtub*, *Gapdh* et *L15* à 4 et 5 jours sont normalisés par rapport à leurs niveaux d'expression respectifs à 3 jours.

Les variations des niveaux d'expression observées pour les gènes *Ef2*, *βtub*, *Gapdh* et *L15* sont significatives entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour. Entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, les variations observées pour *Ef2*, *βtub* et *L15* ne sont pas significatives ( $p = 0,1$ ). Entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, les variations observées pour *Gapdh* sont significatives.

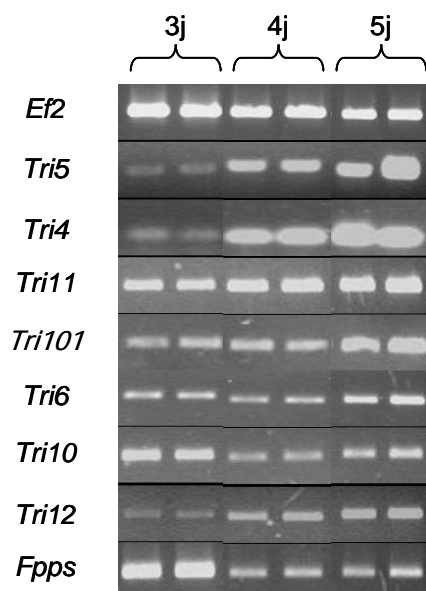
Dans ce contexte, nous avons voulu vérifier l'expression constitutive du gène  $\beta$ -*tub* dans nos conditions expérimentales (mini culture statique / milieu MS) et pour une de nos souches modèles (*F. culmorum* INRA 117). Nous avons également décidé d'étudier l'expression d'autres gènes de référence : *Gapdh* codant la glyceraldéhyde 3-phosphate deshydrogenase, enzyme importante de la voie de la glycolyse qui intervient dans le métabolisme énergétique ; *Ef2* codant un facteur d'élongation qui intervient dans la synthèse protéique et *L15* codant une protéine ribosomique de la sous unité 60S.

Nous avons donc suivi l'expression de  $\beta$ -*tub*, *Gapdh*, *Ef2* et *L15* au 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour de croissance de la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée *in vitro* en mini cultures statiques en milieu MS (figure 33). Les gènes  $\beta$ -*tub*, *Gapdh*, *Ef2* et *L15* ont un maximum d'expression au 3<sup>ème</sup> jour de culture. Ce niveau d'expression diminue fortement au 4<sup>ème</sup> jour de culture de 64% pour *Ef2*, 83% pour  $\beta$ -*tub*, 76% pour *Gapdh* et 93% pour *L15*. Entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, le niveau d'expression de *Ef2*,  $\beta$ -*tub* et *L15* ne varie pas significativement alors que le niveau d'expression de *Gapdh* est légèrement affecté. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Ponts (2005). Cependant, dans nos conditions expérimentales, un décalage de un jour pour les maxima et la chute d'expression des gènes de référence est observé par rapport aux résultats de Ponts (2005). Ceci peut être attribué aux conditions différentes de culture et à l'utilisation de souches différentes.

La cinétique de production de biomasse fongique à trois, quatre et cinq jours montre une accumulation de biomasse entre trois et quatre jours puis une stabilisation entre quatre et cinq jours. Il semble que la diminution de l'expression des gènes de référence, impliqués dans la croissance cellulaire, a lieu avant l'arrêt d'augmentation de biomasse, quel que soit le gène de référence de notre étude.

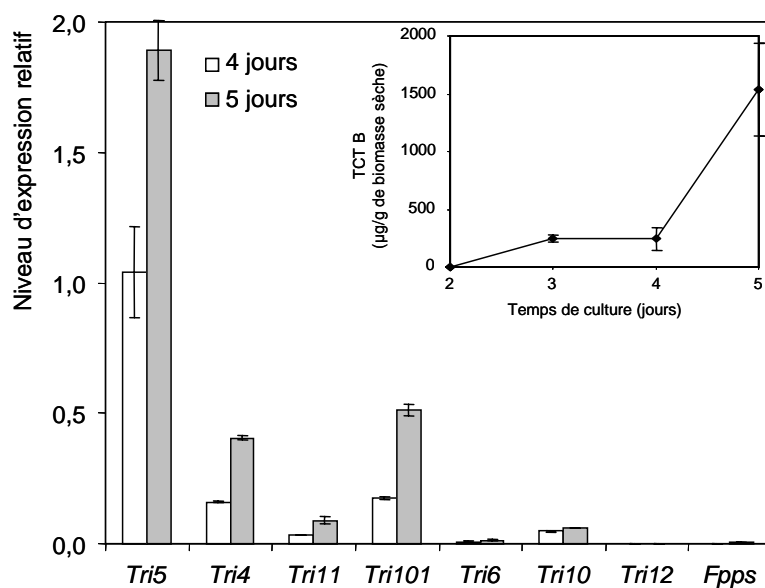
La diminution d'expression des gènes de référence au cours de la culture pourrait également être expliquée par l'accumulation d'inhibiteurs de RT et/ou de PCR. Ces inhibiteurs ne seraient pas ou peu présents on non effectifs dans les cultures âgées de trois jours et le seraient dans les cultures plus âgées. La chute de l'expression des gènes de référence observée à quatre jours serait alors une conséquence de la baisse d'efficacité des RT et/ou des PCR. Cette chute d'expression serait alors un artefact. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait possible d'intégrer un ARN de contrôle à nos échantillons avant de réaliser les réactions de RT et de PCR.

Une autre explication pourrait être que la mesure de l'accumulation de biomasse fongique est un indicateur de la croissance mais pas forcément de l'état physiologique des



**Figure 34 : Evaluation sur gel d'agarose des produits obtenus après PCR pour les gènes *Ef2*, *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Fpps* à 3, 4 et 5 jours de culture de la souche de *F. culmorum* INRA 117.**

La figure présente les résultats obtenus pour 2 répétitions indépendantes.



**Figure 35 : Niveaux d'expression relatif des gènes *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Fpps* et niveaux de TCT B produits.**

Ces résultats ont été obtenus avec la souche de *F. culmorum* INRA 117 après 4 et 5 jours de culture. Les niveaux d'expression relatif des gènes *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Fpps* à 4 jours et 5 jours sont normalisés par rapport au niveau d'expression de *βtub* à 4 jours. Les variations des niveaux d'expression observées pour le gène *Tri6* ne sont pas significatives ( $p = 0,05$ ).



cellules (Barreau C., communication personnelle). Par conséquent, la chute de l'expression des gènes de référence observée à quatre jours serait la conséquence d'une baisse quantitative de la proportion de cellules en division par rapport à la biomasse fongique totale.

En conclusion, l'expression des quatre gènes de référence n'est pas constante au cours du temps. Il ne sera donc pas possible de comparer l'expression des gènes *Tri* et du gène *Fpps* en utilisant ces gènes comme référence entre trois et quatre jours de culture. Nous pourrions seulement comparer les niveaux d'expression entre quatre et cinq jours de culture.

#### **I. 4. 2. Expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B au cours de la cinétique de production de TCT B par la *F. culmorum***

Après PCR classique de 28 cycles, les produits d'amplification obtenus pour les gènes *Ef2*, *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Fpps* ont été évalués sur gel d'agarose à 1,5% (figure 34). Les extractions d'ARN ont été réalisées sur des mycéliums âgés de trois, quatre et cinq jours. Après trois jours de culture, tous les gènes de notre étude sont exprimés. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Ponts *et al.* (2007) qui a observé pour *F. graminearum* que l'expression de divers gènes *Tri* commençait après trois jours de culture. Dans notre étude, les gènes *Tri5*, *Tri4*, *Tri11* et *Tri12* semblent avoir des cinétiques d'expression similaires. Ces gènes sont exprimés faiblement après trois jours de culture puis, leurs niveaux d'expression semblent augmenter au jour quatre et au jour cinq, en même temps que les niveaux de toxines s'accumulent dans les milieux de culture. Au contraire, Ponts *et al.* (2007) avait observé que l'expression de *Tri4* et *Tri5* était maximale à trois jours puis diminuait. Dans notre étude, le gène *Tri101* semble faiblement exprimé à trois jours et quatre jours puis son expression augmente après cinq jours de culture. L'expression du gène *Tri6* semble constante à trois, quatre et cinq jours. Le gène *Tri10* semble être exprimé plus fortement après trois jours de culture, puis son expression diminue à quatre jours et est constante à cinq jours. Le gène *Fpps* semble avoir la même cinétique d'expression que les gènes de référence.

Après analyse par PCR quantitative, les niveaux d'expression relatifs de *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Fpps* ont été comparés à quatre et cinq jours de culture, temps pour lesquels l'expression de  *$\beta$ tub* est constante (figure 35). La cinétique d'accumulation des TCT B dans ces mêmes cultures est également représentée.

**1- Mini culture classique:**

croissance en milieu MS peu tamponné et acidification pendant la croissance

J0 : pH 6.5

J3 : pH 3

**2- Mini culture sans acidification:**

croissance pendant 3 jours en milieu MS tamponné à pH 6.5 puis transfert dans un milieu MS frais tamponné à 6.5

J0 : pH 6.5  $\xrightarrow{\text{transfert}}$  J3 : pH 6.5

**3- Mini culture avec acidification brutale:**

croissance pendant 3 jours en milieu MS tamponné à pH 6.5 puis transfert dans un milieu MS frais tamponné à 3

J0 : pH 6.5  $\xrightarrow{\text{transfert}}$  J3 : pH 3

**Figure 36 : Principe de l'expérience menée au cours de l'étude de l'effet du changement de pH sur la biosynthèse de TCT B.**

1- La souche INRA 349 est cultivée en mini culture sur milieu MS. L'acidification du pH est naturelle pendant la croissance. Le pH évolue de 6,5 à 3 en 3 jours de culture.

2- La souche INRA 349 est cultivée pendant 3 jours en milieu MS tamponné à pH 6,5 puis le mycélium est transféré sur un milieu MS frais tamponné à pH 6,5. Le pH n'évolue pas, il n'y a pas d'acidification du milieu.

3- La souche INRA 349 est cultivée pendant 3 jours en milieu MS tamponné à pH 6,5 puis le mycélium est transféré sur un milieu MS frais tamponné à pH 3. Le pH évolue donc de 6,5 à 3, l'acidification du milieu est brutale.

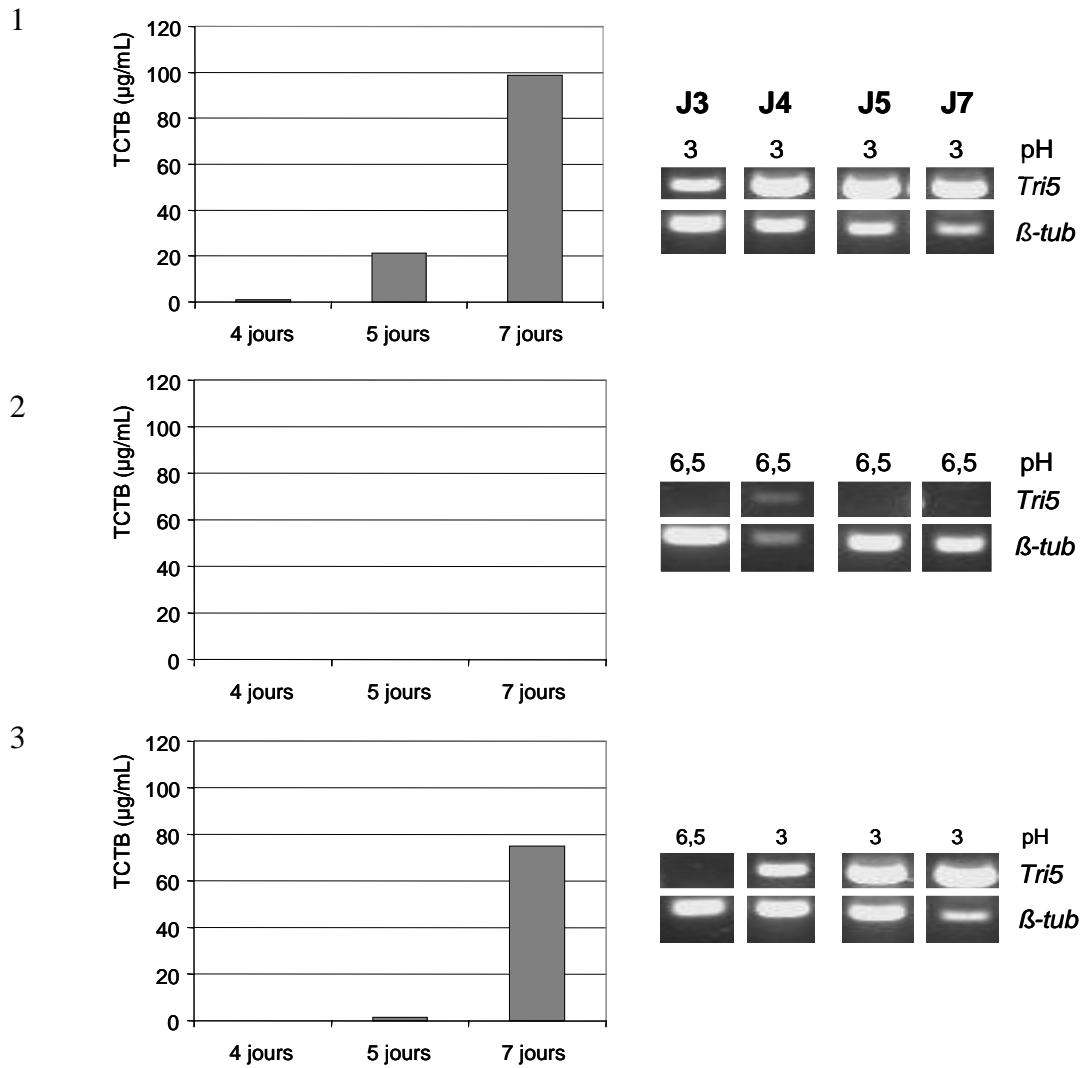
Parmi les gènes étudiés, le gène *Tri5* est le gène le plus exprimé à quatre et cinq jours de culture. Puis, les gènes *Tri101* et *Tri4* sont moins exprimés que *Tri5* mais plus exprimés que les autres gènes de l'étude à quatre et cinq jours de culture. Ponts *et al.* (2007) avait trouvé que *Tri4* était plus exprimé que *Tri5* à trois, quatre et cinq jours de culture de *F. graminearum*. Nos résultats montrent qu'il existerait des différences d'expression des niveaux relatifs entre les gènes de la voie de biosynthèse. Cependant, ces différences ne sont pas forcément représentatives de l'activité des enzymes correspondantes à ces gènes. De plus, nous analysons les niveaux de transcrits et il ne faut pas exclure une possibilité de régulation post transcriptionnelle. A l'exception de *Tri6*, l'expression de tous les gènes étudiés augmente significativement entre quatre et cinq jours de culture d'un facteur 0,81 pour *Tri5*, 1,52 pour *Tri4*, 1,56 pour *Tri11*, 1,9 pour *Tri101*, 0,26 pour *Tri10*, 1,54 pour *Tri12* et 0,56 pour *Fpps*.

Dans nos conditions expérimentales, l'augmentation de la production de TCT B entre quatre et cinq jours de culture semble être reliée à une augmentation de l'expression des gènes considérés.

## **I. 5. Effet du pH du milieu MS sur la biosynthèse de TCT B**

(Etude réalisée dans le cadre d'un Master Recherche, Bernarde Cédric, 2005).

Nous avons montré que lorsque la souche de *F. graminearum* INRA 349 se développe en mini culture statique sur milieu MS et sur milieu GYEP, les cinétiques d'évolution du pH étaient différentes (figure 31). En effet, en milieu MS, le pH évolue de 6,5 à 2 après quatre jours de culture alors qu'en milieu GYEP, le pH évolue de 6,5 à 4,5. Après quatre jours de culture, le pH n'évolue plus. Quelque soit le milieu, il semble que l'acidification du pH soit concomitante avec le démarrage de la production de TCT B (entre deux et quatre jours). Ceci a également été observé par Bily (2003) pour des cultures de *F. graminearum*. Bily (2003) suggère même que la baisse de pH provoquerait ou résulterait d'un stress du mycélium qui serait un des facteurs déclenchant la production de métabolites secondaires dont les mycotoxines. Nous avons voulu tester cette hypothèse : Est-ce que l'acidification du pH du milieu de culture peut induire la synthèse des TCT B ?



**Figure 37 : Effet du changement de pH sur la production de TCT B et sur l'expression des gènes  $\beta$ -tub et *Tri5*.**

Ces résultats ont été obtenus avec la souche de *F. graminearum* INRA 349 après 3, 4, 5 et 7 jours de culture dans les 3 conditions de culture.

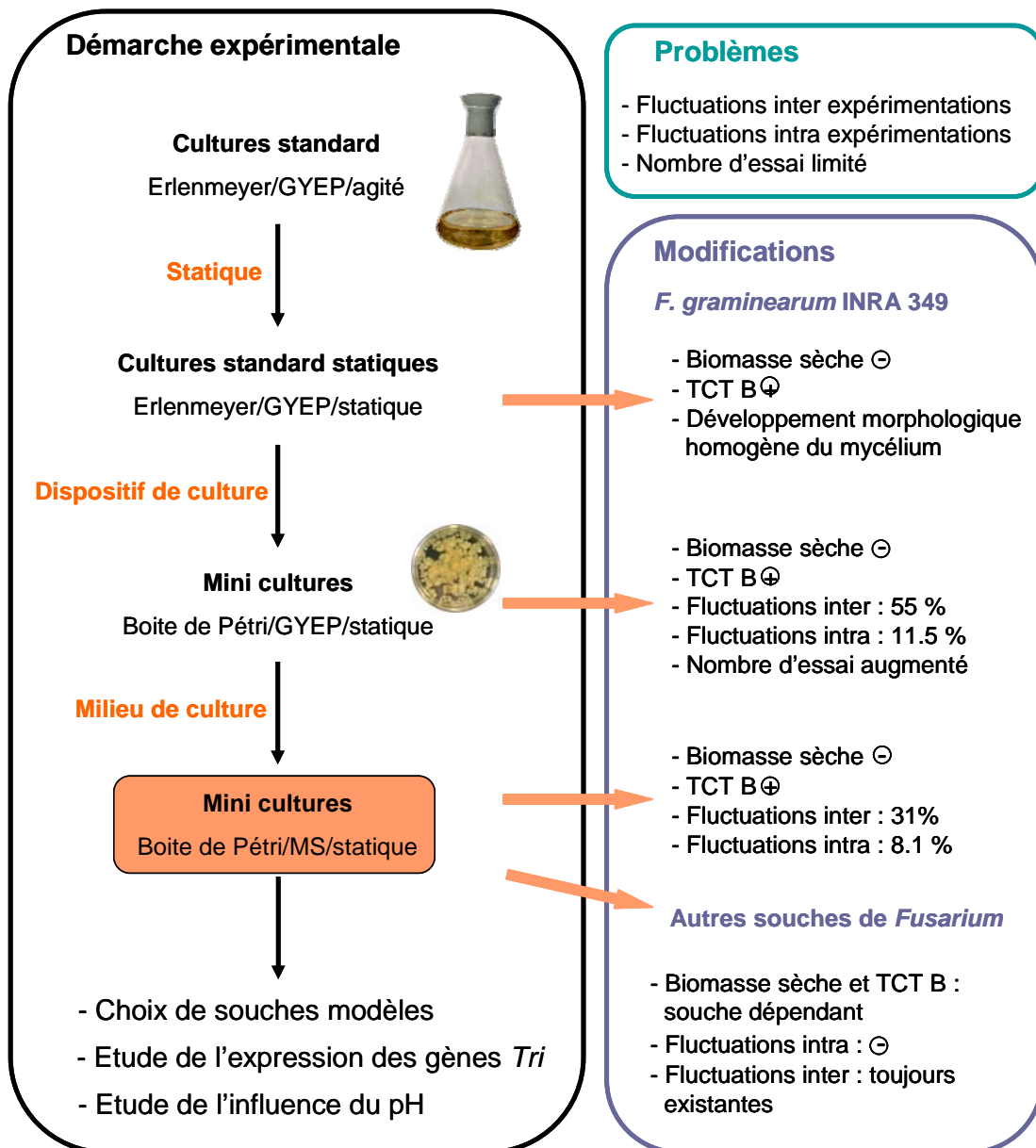
### **I. 5. 1. Principe de l'expérience**

Nous avons entrepris l'étude de l'effet du changement de pH du milieu MS sur la biosynthèse de TCT B par la souche de *F. graminearum* INRA 349. Le principe de l'expérience est rappelé sur la figure 36, trois conditions expérimentales sont comparées. Dans la condition 1, l'acidification du pH est naturelle pendant la croissance ; dans la condition 2, le pH n'évolue pas et dans la condition 3, l'acidification du milieu est brutale.

### **I. 5. 2. Effet du changement de pH sur la production de TCT B et sur l'expression du gène *Tri5***

Nous avons suivi les niveaux de TCT B produits ainsi que l'expression du gène *Tri5* dans les trois conditions de culture décrites ci-dessus (figure 37). Dans la condition de culture 1, c'est-à-dire en mini culture classique, les TCT B s'accumulent à partir de trois jours et le gène *Tri5* est exprimé. Dans la condition de culture 2, en milieu MS tamponné à pH 6,5, l'expression du gène *Tri5* et la production de toxines ne sont jamais induits. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Miller *et al.* (1983) qui ont observé une faible production de DON/ADON par *F. graminearum* cultivée sur un milieu GYEP tamponné à pH 6,5. Dans la condition de culture 3, après le transfert du mycélium du milieu MS tamponné à pH 6,5 au milieu MS tamponné à pH 3, l'expression de *Tri5* est rapidement induite et la toxine s'accumule.

Il semble que si l'on tamponne suffisamment le milieu de culture pour empêcher l'acidification, il n'y a pas de production de toxines, ni expression du gène *Tri5*. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie puisqu'il a été montré que le pH pouvait réguler la biosynthèse de mycotoxines par *Aspergillus* (Keller *et al.*, 1997 ; O'Callaghan *et al.*, 2006) ou par *F. verticillioides* (Flaherty *et al.*, 2003). Dans notre étude, lorsque le mycélium est transféré sur un milieu tamponné à pH 3, la biosynthèse des TCT B est induite et l'expression du gène *Tri5* est détectable 24 h après le transfert. Ceci suggère qu'il pourrait exister une relation entre le changement du pH du milieu de culture, l'induction de l'expression du gène *Tri5* et la production de TCT B.



**Figure 38 : Démarche expérimentale suivie au cours de l'étude sur "la recherche de conditions expérimentales adaptées pour l'étude *in vitro* de la régulation de la mycotoxinogénèse de *Fusarium*".**

Les modifications observées pour la souche INRA 349 puis sur un plus grand nombre de souche de *Fusarium* au niveau des productions de biomasse sèche, des TCT B produits, des développements morphologiques du mycélium, du nombre d'essai, des fluctuations intra expérimentation et des fluctuations inter expérimentation sont présentées.

## I. 6. Optimisation des conditions expérimentales : Conclusions

Au laboratoire, l'étude de la mycotoxinogénèse de *Fusarium* était classiquement réalisée en "cultures standard" (cultures agitées/fioles Erlenmeyer/milieu liquide GYEP). Mais, des problèmes de variabilité (inter et intra expérimentations) des niveaux de TCT B produits par *Fusarium* en cultures standard étaient couramment rencontrés. L'objectif du premier chapitre de cette thèse était donc de définir de nouvelles conditions expérimentales adaptées pour l'étude *in vitro* de la régulation de la mycotoxinogénèse de *Fusarium* en cultures liquides, en minimisant les fluctuations inter et intra expérimentations. La démarche expérimentale suivie est résumée dans la figure 38.

Tout d'abord, nous avons mis en place un système de culture statique en petite boîte de Pétri. Ce dispositif de culture statique devait améliorer les problèmes de fluctuations intra expérimentations du potentiel toxigène par un développement morphologique homogène du mycélium. De plus, ce système de culture en petite boîte de Pétri devait permettre d'obtenir des conditions expérimentales pratiques et rapides à mettre en œuvre afin de réaliser un grand nombre d'essais par la suite. Les résultats de notre étude montrent que les fluctuations intra expérimentations sont clairement minimisées avec ce dispositif de culture et que le nombre d'essai peut être considérablement augmenté par rapport aux cultures standard.

Puis, nous avons utilisé un autre milieu de culture liquide, un milieu synthétique afin de pallier les problèmes de fluctuations inter expérimentations du potentiel toxigène de *Fusarium*. Nous avons comparé les potentiels toxigènes d'un grand nombre de souches de *Fusarium*, d'espèce et de chémotype différents, en mini cultures statiques sur les milieux liquides GYEP et MS. Nos conclusions semblent montrer que le milieu GYEP serait plus favorable à la croissance du mycélium. Concernant la biosynthèse des TCT B, le milieu favorisant la mycotoxinogénèse semble être souche dépendant. Nous avons également mis en évidence que les problèmes de fluctuations inter expérimentations du potentiel toxigène existaient toujours malgré l'utilisation du milieu synthétique.

De nouvelles conditions de culture ayant été définies, l'expression de divers gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B a été étudiée dans des cultures témoins de *Fusarium* par PCR en temps réel. Nous avons mis en évidence une augmentation globale de l'expression des gènes étudiés en relation avec l'accumulation forte des TCT B dans le milieu de culture.





Notre étude préliminaire sur l'effet du pH du milieu MS suggère qu'il pourrait exister une relation entre le changement du pH du milieu de culture, l'induction de l'expression de gènes *Tri* et la production de TCT B. Par conséquent, le pH des milieux de culture sera suivi dans toutes les expérimentations au cours de cette thèse.

Ce premier chapitre montre la difficulté de l'étude *in vitro* de la régulation de la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. De nombreux facteurs semblent avoir une grande influence sur la biosynthèse des TCT B, notamment les conditions de culture de *Fusarium*, le milieu de culture, les souches ainsi que des paramètres de nature inconnue. L'optimisation des conditions expérimentales était nécessaire. Nous avons ainsi défini des conditions de culture adéquates qui nous permettront de réaliser la suite de l'étude, à savoir un grand nombre d'essais sur "la modulation de la biosynthèse des TCT B par des composés du grain de blé".



## **CHAPITRE II :**

### **Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium***



Des études précédentes, menées au laboratoire, ont démontré la présence de composés inhibiteurs de la biosynthèse des TCT B dans les sons de blé dur (Pinson-Gadais *et al.*, 2007). L'objectif du deuxième chapitre de cette thèse est de cibler des molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, pour leur effet modulateur *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*.

Les acides phénoliques, majoritairement concentrés dans les sons, pourraient constituer de bons candidats. En effet, plusieurs études antérieures ont suggéré *in vitro* un effet inhibiteur de ces composés sur la biosynthèse de diverses mycotoxines, incluant les aflatoxines (Hua *et al.*, 1999 ; Mahoney et Molyneux, 2004), les fumonisines (Beekrum *et al.*, 2003) et les trichothécènes B (Bakan *et al.*, 2003 ; Bily, 2003). Par ailleurs, il a été montré que les compositions en acides phénoliques des grains varient selon les variétés de blé (Regnier et Macheix, 1996; Lempereur *et al.*, 1997; Lempereur *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2006; Mporfu *et al.*, 2006).

Dans ce chapitre, l'effet des acides phénoliques testés individuellement, et notamment de l'acide férulique qui constitue l'acide phénolique majoritaire des sons, sera étudié vis-à-vis de la biosynthèse des toxines. Nous initierons également l'analyse des mécanismes impliqués dans la modulation de la biosynthèse des TCT B par l'acide férulique en étudiant les variations des niveaux d'expression de divers gènes *Tri*, impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B.

Parallèlement, des variétés de blé tendre, présentant des niveaux différents de résistance à la fusariose, seront analysées pour leur composition en acides phénoliques au cours de la cinétique de remplissage des grains et en réponse à l'infection par *Fusarium*.

Les données bibliographiques concernant l'effet des caroténoïdes sur la biosynthèse des mycotoxines sont peu abondantes. A notre connaissance, seulement deux études décrivent un effet inhibiteur des caroténoïdes sur la biosynthèse des aflatoxines par *Aspergillus* (Norton, 1997; Wicklow *et al.*, 1998). Les caroténoïdes sont présents dans les grains et le contenu et le type de caroténoïdes varient selon les espèces de céréales, les variétés et les conditions environnementales (Hentschel *et al.*, 2002; Konopka *et al.*, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007). Dans ce chapitre, une étude préliminaire sera entreprise sur l'effet d'un caroténoïde, le  $\beta$ -carotène, vis à vis la mycotoxinogénèse de *Fusarium*.



## II. 1. Effet des acides phénoliques individuels sur la mycotoxinogénèse

### II. 1. 1. Effet de l'acide férulique

Article soumis à *International Journal of Food Microbiology* (Août 2007)

## Ferulic acid, an efficient inhibitor of trichothecenes B biosynthesis and *Tri* genes expression in *Fusarium* liquid cultures

Anne-Laure Boutigny <sup>a, b, \*</sup>, Christian Barreau <sup>b, \*</sup>, Vessela Atanassova-Pénichon <sup>b</sup>, Marie-Noëlle Verdal-Bonnin <sup>b</sup>, Laëtitia Pinson-Gadais <sup>b</sup>, Florence Richard-Forget <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales (IRTAC),  
66 rue La Boétie, 75008 Paris, France

<sup>b</sup> Unité de Mycologie et Sécurité des Aliments,  
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, UPR1264 MycSA),  
71 avenue Edouard Bourleaux BP81, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France

**Résumé :** L'effet de l'acide férulique a été étudié sur l'accumulation de trichothécènes par *Fusarium* cultivé sur un milieu liquide synthétique. En fonction de la concentration initiale et du temps de supplémentation, l'acide férulique réduit fortement la production de trichothécènes B par la souche de *F. culmorum* INRA 117. Le pourcentage d'inhibition des niveaux de trichothécènes B semble augmenter en fonction de la concentration initiale en acide férulique supplémentée aux cultures. L'addition d'acide férulique avant l'étape de germination des spores ou sur du mycélium a le même effet inhibiteur final sur l'accumulation des TCT B. Deux supplémentations successives d'acide férulique conduisent à un effet inhibiteur cumulatif de la biosynthèse des TCT B. L'effet inhibiteur de l'acide férulique sur la biosynthèse des TCT B a été confirmé sur plusieurs souches de *Fusarium*, d'espèces et de chémotypes différents. De façon à analyser les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la biosynthèse des toxines par l'acide férulique, l'expression de divers gènes *Tri* impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B a été étudiée. Les résultats suggèrent





que la diminution de la production de toxines résulterait d'un plus faible niveau d'induction de l'expression des gènes *Tri*.

**Abstract:** Effect of ferulic acid supplementation of a synthetic liquid culture medium on the accumulation of trichothecenes B by *Fusarium* strains was monitored. According to initial amount and time of supplementation, ferulic acid leads to a strong decrease of trichothecenes B production by the *Fusarium culmorum* INRA 117 strain. Toxin accumulation was reduced proportionally to initial amount of ferulic acid supplied. Addition of ferulic acid either before the spores germination step or on mycelium leads to the same final inhibitory effect on mycotoxins accumulation. Successive supplementation with ferulic acid has a cumulative inhibitory effect on trichothecenes B biosynthesis. The inhibitory effect of ferulic acid on toxin production was confirmed using various strains of *Fusarium*, including different chemotypes and different species. In order to analyse mechanisms involved in toxin biosynthesis inhibition by ferulic acid, the expression of various representative *Tri* genes involved in the trichothecenes biosynthesis pathway was monitored. The results suggest that the decrease of toxin production may directly results from a decrease in the level of *Tri* genes expression.

*Keywords:* Mycotoxin; *Fusarium*; Phenolic acid; *Tri* genes, Regulation

## 1. Introduction

Among *Fusarium* mycotoxins, trichothecenes are frequently encountered on cereal crops. As they are very potent inhibitors of eukaryotic protein synthesis (Rocha *et al.*, 2005), they constitute a toxin family of considerable concern to human and animal health (Bennett and Klich, 2003). In Europe, the type B trichothecenes group (TCT B) produced mainly by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* species are predominant (Bottalico and Perrone, 2002). They include deoxynivalenol (DON) and its acetylated forms 3-acetyl-4-deoxynivalenol and 15-acetyl-4-deoxynivalenol (3- and 15-ADON) and nivalenol (NIV) and its acetylated form 4-acetylnivalenol or fusarenone X (FX). In June 2005, maximum contamination levels acceptable for cereals and corn food have been set by the European Community for DON, the most frequently observed mycotoxin (EC No856/2005). Therefore, reducing DON occurrence in cereals and derived products generated in Europe is of great concern.



TCT B are heat-stable molecules and are not eliminated during the processes currently used in food manufacture (Hazel and Patel, 2004). Today, the best way to prevent trichothecenes occurrence in food is to restrict their accumulation during the cultivation of the crop. In *durum* wheat, no varieties resistant to *Fusarium* Head Blight (FHB) exist yet. In a recent study, the occurrence of different sensitivities to TCT B accumulation was demonstrated for a collection of *Triticum turgidum subsp.* lines inoculated by a nivalenol *Fusarium* producing strain (Favre *et al.*, 2004). Meanwhile only slight differences in the level of fungal development were observed for the different lines, four of the lines exhibited limited TCT B contamination. The current hypothesis is that some wheat lines may contain either endogenous compounds able to inhibit *Fusarium* mycotoxins biosynthesis or biological activities able to degrade or to modify the toxins. The occurrence of some biochemical compounds able to reduce TCT B biosynthesis was demonstrated in bran fractions of durum wheat varieties resistant to TCT B accumulation (Pinson-Gadais *et al.*, 2007). According to literature and to biochemical composition of wheat, phenolic acids which are mainly concentrated in bran could be good candidates. In fact, differences in phenolic acids composition in wheat varieties have been reported (Lempereur *et al.*, 1997; Lempereur *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2006; Mpofu *et al.*, 2006) and some *in vitro* experiments have described an inhibitory effect of phenolic acids on mycotoxins production (Chipley and Uraih, 1980; Beekrum *et al.*, 2003; Bily, 2003). Ferulic acid is the predominant phenolic acid of wheat bran (Zhou *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006) and therefore could play an important role in modulating the TCT B biosynthesis by *Fusarium*.

The biosynthesis of trichothecenes involves a complex pathway that proceeds from farnesyl pyrophosphate (FPP) and consists of multiple oxygenation, isomerization, cyclisation and esterification steps (Desjardins *et al.*, 1993). FPP is synthesised from geranyl pyrophosphate by the *Fpps* gene encoding a FPP synthetase. FPP is a common precursor of the sterol pathway and of the TCT B pathway. Most of the genes involved in the TCT B biosynthesis (*Tri* genes) have been identified, allowing studies of their transcriptional expression in relation to the level of toxin production. Most *Tri* genes are clustered within a 26-kb region of DNA (Brown *et al.*, 2004). *Tri5* gene encodes the key enzyme trichodiene synthase, that catalyses the first step of the TCT B biosynthesis pathway (Hohn and Desjardins, 1992). *Tri4* gene encodes a key multifunctional cytochrome P450 mono-oxygenase involved in four oxygenation steps of the pathway (Hohn *et al.*, 1995; McCormick *et al.*, 2006; Tokai *et al.*, 2007). *Tri11* gene encodes a C-15 hydroxylase that converts isotrichodermin to 15-decalonectrin (Alexander *et al.*, 1998). *Tri101*, that encodes an

Table 1

Strains, species and chemotypes of *Fusarium* used in the study

Strains	Species	Chemotype
INRA 117	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON
INRA 233	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON
INRA 124	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON
INRA 319	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX
INRA 130	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX
INRA 132	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX
INRA 349 <sup>a</sup>	<i>F. graminearum</i>	DON/ADON

<sup>a</sup> The INRA 349 strain corresponds to the *F. graminearum* strain CBS185.32 (Centraal Bureau voor Schimmelcultuur, The Netherlands).

## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

acetyltransferase, is a noncluster gene and catalyses trichothecenes acetylation (Kimura *et al.*, 1998). *Tri12* gene encodes a trichothecene efflux pump (Alexander *et al.*, 1999). A regulatory model of the pathway has been previously proposed (Tag *et al.*, 2001; Peplow *et al.*, 2003). In this model, *Tri6* and *Tri10* genes were described as positive regulatory genes of the pathway. They encode important transcription factors that regulate the expression of other *Tri* genes. It appears that *Tri10* regulates the transcription of *Tri6* (Tag *et al.*, 2001; Peplow *et al.*, 2003) while *Tri6* positively regulates all other identified *Tri* genes (Proctor *et al.*, 1995; Hohn *et al.*, 1999).

This study aims at defining more precisely ferulic acid effect on *in vitro* TCT B biosynthesis by *Fusarium*. Dose effect, timing of supplementation and sensitivity of various *Fusarium* strains have been studied. Effect of ferulic acid on the transcription of various *Tri* genes involved in the TCT B biosynthesis pathway has been analysed. A significant regulation of *Tri* genes expression by ferulic acid is reported for the first time.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Fusarium* strains

The *F. culmorum* INRA 117 strain was used throughout the study. This strain was provided by Quirico Migheli (University of Sassari, Italy). In liquid cultures, it predominantly produces 3-ADON, and to a lesser extent DON. Other strains of *Fusarium* used in this study were from the INRA-MycSA laboratory collection (Table 1). Stock cultures were maintained at 4 °C on Potato Dextrose Agar (PDA) slants. When inoculums were required, the *Fusarium* strain was grown on PDA slants at 25 °C for eight days and spore suspensions were prepared by adding 6 mL of sterile distilled water to the PDA slants with gentle shaking.

### 2.2. Medium and culture conditions

Liquid-culture experiments were performed in a Mycotoxin Synthetic medium (MS medium) (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 g/L; MgSO<sub>4</sub>, 0.017 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L; glucose, 20 g/L; biotine, 0.1 mg/L and 0.1 mL/L Vogel mineral salts solution (Vogel, 1956)). This is a minimal poor medium specifically adapted for mycotoxins production by *Fusarium*. Cultures were done in triplicate. Sterile Petri dishes (Ø 55 mm) containing 8 mL of MS medium supplemented or not with ferulic acid were inoculated with spore suspensions to achieve a



final concentration of  $10^4$  spores/mL. Fungal liquid cultures were incubated at 25 °C in the dark. Following incubation, the culture medium was removed by centrifugation and stored at -20 °C until analysis of TCT B content while the mycelium was stored at -80 °C. Mycelia were used either for RNA extractions or were lyophilised in order to quantify the fungal biomass production.

### 2.3. Cultures supplementation with ferulic acid

Ferulic acid, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), was directly dissolved in the MS medium to obtain a final concentration ranging from 0 to 5 mM. Its effect on TCT B accumulation by the *F. culmorum* INRA 117 strain was analysed after ten days of culture. It was previously checked that initial pH of the culture medium was not affected by addition of such concentrations of ferulic acid compared to control.

Ferulic acid was also tested for its *in vitro* effect on the kinetic of TCT B accumulation by the *F. culmorum* INRA 117 strain. The cultures were supplemented either with H<sub>2</sub>O (control) or with a concentrated water solution of ferulic acid (FA) to achieve a final concentration of 0.5 mM. Three addition times were chosen: synchronised with inoculation (FA<sub>t<sub>0</sub></sub>), three days after inoculation (FA<sub>t<sub>3</sub></sub>) and two successive additions at t<sub>0</sub> and t<sub>3</sub> (FA<sub>t<sub>0+3</sub></sub>).

Effect of addition of 0.5 mM ferulic acid at t<sub>0</sub> on TCT B accumulation by several *Fusarium* strains (Table 1) was analysed after ten days of culture.

### 2.4. HPLC analysis of TCT B

A 4 mL sample of culture medium was extracted with 8 mL of ethyl acetate. Six mL of the organic phase were evaporated to dryness at 70 °C under a nitrogen flux. Dried samples were dissolved in 200 µL of methanol/water (1:1, v/v) before analysis using high performance liquid chromatography (HPLC) as described by Bily *et al.* (2004). Quantification was performed with reference to external calibration using TCT B standards solution (NIV, DON, FX, 15-ADON and 3-ADON) prepared from commercial pure powders, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), dissolved in methanol/water (1:1, v/v).

Data were reported as mean values ± SD of three biological replications. TCT B yields were expressed as µg/g of dry fungal biomass. The data were then normalized against a given yield obtained from the control sample. Values were compared at the 5% significance level using a standard Student's *t*-test (control vs. treated).

Table 2

Primer pairs used to amplify *Ef2*, *Tri4*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* and *Fpps* genes by Real-Time RT-PCR

Gene	Sequence forwards (5'-3')	Sequence reverse (5'-3')	Tm (°C)	Accession No.
<i>Ef2</i>	Ef2-F CTGTGTTCTTACCATGAC	Ef2-R CAACAGGTTAGCACCA	58	FG12849
<i>Tri4</i>	Tri4-F* TATTGTTGGCTACCCCAAGG	Tri4-R* TGTCAGATGCGCCTTACAAA	58	FG03535
<i>Tri5</i>	Tri5-F GACCCTAAGCGACTACAG	Tri5-R GTGCTACGGATAAGGTTC	58	FG03537
<i>Tri11</i>	Tri11-F AGCCGTCTACTTCTATG	Tri11-R ACTACTGAAACGCGCA	60	FG03540
<i>Tri12</i>	Tri12-F ATTCGGTACATGGGCT	Tri12-R GCAGTGCTGTTCGTCA	57	FG12013
<i>Tri101</i>	Tri101-F <sup>a</sup> AGGGCATTAGCGAGGGAAACACA	Tri101-R <sup>a</sup> ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC	59	AB011417
<i>Tri6</i>	Tri6-F <sup>a</sup> AGCGCCTTGCCCTCTTTG	Tri6-R <sup>a</sup> AGCCTTTGGTGCCGACTTCTTG	58	FG03536
<i>Tri10</i>	Tri10-F <sup>a</sup> TCTGAACAGGCGATGGTATGGA	Tri10-R <sup>a</sup> CTGCGGCGAGTGAGTTTGACA	58	FG03538
<i>Fpps</i>	Fpps-F CATGATCGCCATTAACGAC	Fpps-R CAATGTGTTCGGGCTT	57	FG06784

Primer pairs used to amplify *Ef2*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri12* and *Fpps* were designed in our laboratory using the LightCycler Probe Design Software Version 1.0 (Roche).

<sup>a</sup> Ponts (2005)

Table 3

Real-Time RT-PCR efficiencies and associated regression coefficients obtained after linear regression of the Cp values for a range of four log dilutions prepared from the standard cDNA mixture for *Ef2*, *Tri4*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* and *Fpps* genes

Gene	PCR efficiency value	Regression coefficient value
<i>Ef2</i>	1,93	-1,00
<i>Tri4</i>	2,00	-1,00
<i>Tri5</i>	1,99	-1,00
<i>Tri11</i>	2,05	-0,99
<i>Tri12</i>	2,01	-1,00
<i>Tri101</i>	1,95	-1,00
<i>Tri6</i>	1,86	-0,99
<i>Tri10</i>	2,00	-0,99
<i>Fpps</i>	2,08	-0,99



### 2.5. Extraction of total RNA and preparation of cDNA

Extraction of total RNA was achieved on three days old mycelium from the *F. culmorum* INRA 117 strain issued from cultures supplemented or not at  $t_0$  with 0.5 mM ferulic acid. Frozen mycelium (50 mg) was ground in 1 mL of TRIzol® Reagent (Invitrogen) with the TissueLyser System® (Qiagen). Total RNA was extracted following the TRIzol® Reagent manufacturer's instructions. Quality of the prepared RNA was assessed by agarose gel electrophoresis. The RNA samples were quantified by absorbance measurements at 260 nm. Total RNA (2 µg) was reverse-transcribed using the SuperScript™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Reverse transcription was performed using the iCycler™ (Bio-Rad) programmed according to the thermal cycling conditions recommended by the manufacturer's instructions (Invitrogen). The cDNA samples were stored at -20 °C until used for PCR analysis.

### 2.6. Real-time RT-PCR analysis

Real time RT-PCR analyses were performed using a LightCycler® 2.0 system and the LightCycler Software 3.5.3 (Roche). Abundance of the transcripts of the genes *Ef2*, *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* and *Fpps* was evaluated in 2 µL of each cDNA sample (corresponding to 8 ng of RNA) in a final reaction volume of 10 µL, using the QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). MgCl<sub>2</sub> was supplemented to the PCR mix to achieve a final concentration of 4 mM. The primers were used at the final concentration of 1 µM. The primer pairs used to amplify these genes and annealing temperatures are given in Table 2. Analyses were performed in triplicate. The expression of the *Ef2* elongation factor was used as endogenous reference. Real time RT-PCR amplification was realized on 45 cycles according to the thermal cycling conditions recommended by the manufacturer (Qiagen).

In order to determine PCR efficiencies, a standard cDNA mixture was prepared by mixing a fraction of each cDNA sample. A range of four log dilutions was prepared from the standard mixture. For each gene, PCR efficiency (*E*) was determined with the serial dilutions as described by Ponts *et al.* (2007). The PCR efficiencies (*E*) and the correlation coefficients ( $R^2$ ) obtained for the reference gene *Ef2*, the target *Tri* genes and *Fpps* gene are given in Table 3.

Table 4

*In vitro* effect of ferulic acid, at concentrations ranging from 0 to 5 mM, on fungal biomass production and TCT B accumulation by the *F. culmorum* INRA 117 strain. Ferulic acid was supplemented at  $t_0$  and TCT B yields were analysed after ten days of culture

Ferulic acid (mM)	TCT B relative yields <sup>a</sup>	Dry fungal biomass relative yields <sup>b</sup>
0	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,01
0,1	0,32 ± 0,03	0,95 ± 0,02
0,25	0,13 ± 0,04	0,96 ± 0,04
0,5	0,10 ± 0,02	0,85 ± 0,02
1	0,01 ± 0,00	0,93 ± 0,04
2,5	Nd	0,61 ± 0,02
5	Nd	0,15 ± 0,01

<sup>a</sup> TCT B yields in ferulic acid treated cultures are expressed relative to their level in control culture (547 µg/g of dry biomass). <sup>b</sup> Dry fungal biomass productions in ferulic acid treated cultures are expressed relative to their level in control culture (36 mg). Nd: not detected.

All our cDNA samples were tested for residual genomic DNA as recommended by Ponts *et al.* (2007). The absence of non-specific PCR amplification products or primer dimers formation was checked by running both melting curves and agarose gel analyses on the final PCR products.

### 2.7. Real-time RT-PCR data analysis

The crossing point values ( $C_p$ ) experimentally measured (mean value of three replicates) obtained for *Ef2* were compared in order to verify the stability of *Ef2* expression under the treatment (ferulic acid supplementation). The  $C_p$  values experimentally measured for our target *Tri* genes and *Fpps* gene were compared in control and treated conditions and normalized relative to the  $C_p$  values obtained for the reference gene *Ef2* using the REST<sup>®</sup> software REST-384 (Relative Expression Software Tool). The mathematical model used takes into account differences for efficiencies between the reference gene and the target gene and the mean crossing point deviation between the control and the treated condition (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

The expression levels of the target genes, normalized by the reference gene expression, were expressed as regulation factor in the treated condition relative to the control condition, with the ratio =  $(E_{\text{target}})^{\Delta C_p \text{ target (control-treated)}} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_p \text{ ref (control-treated)}}$ . The expression ratio results are tested for significance by running Pair Wise Reallocation Randomisation Test<sup>®</sup> with a p value of 0.001 using the REST<sup>®</sup> software REST-384 (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

## 3. Results

### 3.1. Dose effect of ferulic acid on TCT B production by *F. culmorum* *in vitro*

The effect of ferulic acid, at increasing concentrations ranging from 0 to 5 mM, on TCT B yields and fungal biomass production was analysed after ten days of culture using the *F. culmorum* INRA 117 strain (Table 4). Cultures supplementation with ferulic acid at concentration higher than 1 mM strongly inhibits fungal biomass production with an inhibition by 39% and 85% at 2.5 mM and 5 mM respectively. Moreover, at such concentrations, biosynthesis of DON and 3-ADON seems to be fully inhibited. Cultures supplementation with ferulic acid at concentration lower than 1 mM has little measurable

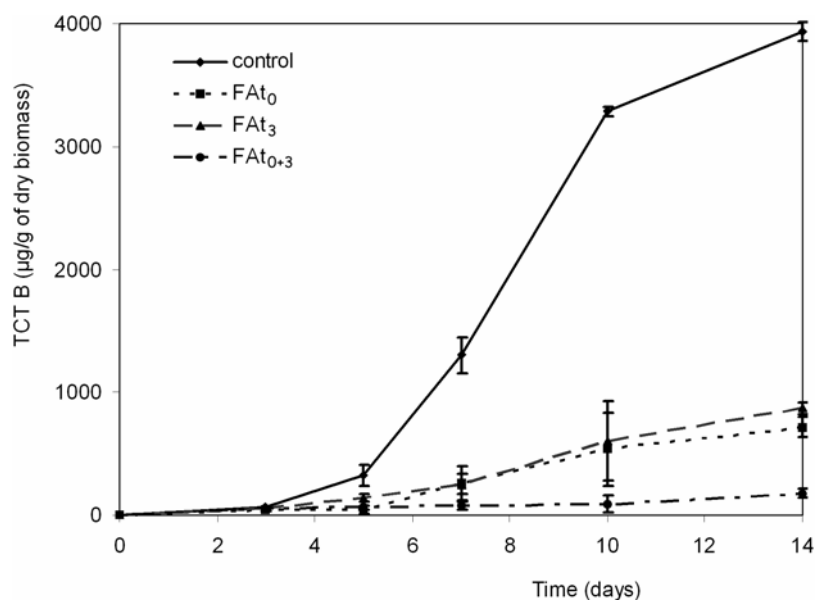


Fig. 1. TCT B biosynthesis by the *F. culmorum* INRA 117 strain in liquid cultures supplemented or not with 0.5 mM ferulic acid at different addition times during the culture experiment. The cultures were supplemented either with H<sub>2</sub>O (control) or with ferulic acid at three addition times: synchronised with inoculation (FAt<sub>0</sub>), three days after inoculation (FAt<sub>3</sub>) and two successive additions at t<sub>0</sub> and t<sub>3</sub> (FAt<sub>0+3</sub>).

effect on fungal biomass production but has a strong inhibitory effect on TCT B yields. Toxin accumulation was decreased by 68%, 87%, 90% and 99% at 0.1, 0.25, 0.5 and 1 mM ferulic acid respectively. At concentrations ranging from 0 to 1 mM, a correlation was observed between initial ferulic acid amount and percentage of inhibition of TCT B yields ( $R^2=0.92$ ). Although an effect on the mode of growth of the fungus cannot be excluded, the fact that fungal biomass is weakly affected by the treatment with ferulic acid at concentrations up to 1 mM suggests that this phenolic acid has a specific effect on fungal secondary metabolism, leading to an inhibition of TCT B accumulation.

### 3.2. Effect of the timing of ferulic acid supplementation on TCT B production by *F. culmorum* *in vitro*

Liquid cultures were supplemented with 0.5 mM ferulic acid at the inoculation time (FA<sub>t<sub>0</sub></sub>), at three days after inoculation (FA<sub>t<sub>3</sub></sub>) and at two successive addition times (FA<sub>t<sub>0+3</sub></sub>) in order to analyse the effect on reduction of the toxin biosynthesis. HPLC analysis of ferulic acid content in the culture media revealed that ferulic acid disappeared from the medium in the first 48 h in inoculated cultures while it was stable until 14 days in non inoculated medium incubated in the same conditions (data not shown). TCT B accumulation in the culture media was monitored for 14 days and compared to accumulation in the control culture supplemented with water (Fig. 1). These three times of supplementation do not affect fungal biomass production (data not shown).

In control cultures, TCT B started to accumulate in the medium three days after inoculation and still accumulated until 14 days of culture. TCT B accumulation was nearly linear between five and ten days and followed to increase until day 14. Ferulic acid supplementation of the culture medium at t<sub>0</sub>, t<sub>3</sub> and t<sub>0+3</sub> strongly reduced TCT B accumulation. After 14 days of culture, TCT B levels were reduced by 82% and 78% when the culture medium was supplemented at t<sub>0</sub> and t<sub>3</sub> respectively. When the culture medium was supplemented with ferulic acid at t<sub>0+3</sub>, reduction of toxin was even more efficient and attained 96% at day 14.

After seven and ten days of culture, the TCT B biosynthesis inhibition was not significantly different when ferulic acid was added to the culture medium at t<sub>0</sub> or at t<sub>3</sub>. At 14 days of culture, a very slight difference is observed. Strikingly, our result suggests that applying ferulic acid at the spore germination step (FA<sub>t<sub>0</sub></sub>) or during mycelium development (FA<sub>t<sub>3</sub></sub>) leads to the same final effect on TCT B biosynthesis. In addition, when ferulic acid

Table 5

*In vitro* effect of ferulic acid on TCT B accumulation by the six *Fusarium* strains. Ferulic acid was supplemented at 0.5 mM at  $t_0$  and TCT B yields were analysed after ten days of culture.

Strains	TCT B in control cultures ( $\mu\text{g/g}$ of dry biomass)	TCT B in ferulic acid treated cultures (% of inhibition <sup>a</sup> )
INRA 233	8147,1 $\pm$ 477,6	17
INRA 124	1042,5 $\pm$ 104,0	78
INRA 319	9393,8 $\pm$ 367,5	18
INRA 130	1292,7 $\pm$ 94,0	29
INRA 132	2149,9 $\pm$ 96,5	37
INRA 349	28431,2 $\pm$ 562,7	27

<sup>a</sup> TCT B yields in ferulic acid treated cultures are expressed as percentage of inhibition, compared to TCT B levels in control cultures (0 mM ferulic acid).

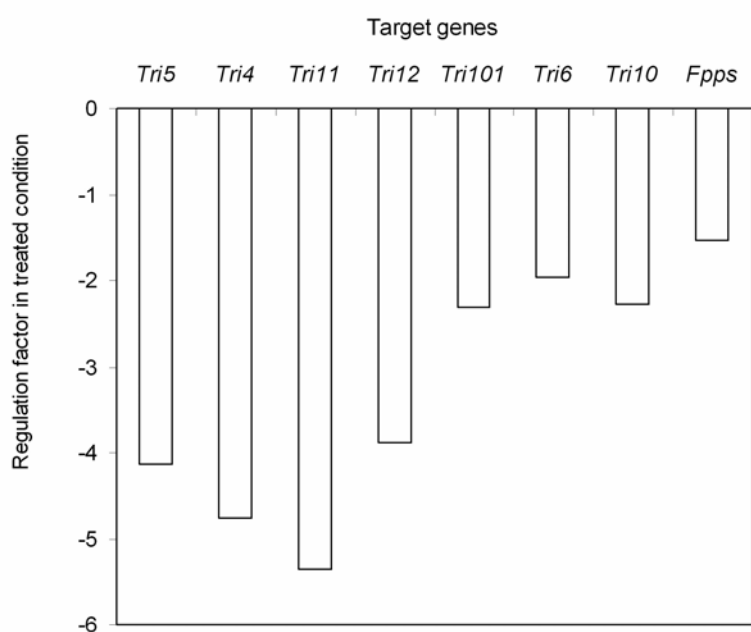


Fig. 2. Regulation factor obtained for the target gene in the ferulic acid supplemented culture relative to the control culture. Values were calculated using the REST software (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

was added at two successive addition times during the culture (FAt<sub>0+3</sub>), the TCT B biosynthesis inhibition was significantly more important than a unique treatment at t<sub>0</sub> or at t<sub>3</sub>.

### 3.3. Effect of ferulic acid on TCT B biosynthesis by various *Fusarium* strains *in vitro*

The effect of ferulic acid on TCT B production by the six other *Fusarium* strains was investigated. Ferulic acid was supplemented at 0.5 mM at the beginning of the cultures (FAt<sub>0</sub>) and TCT B yields were analysed after ten days of culture (Table 5). INRA 233 and INRA 124 are two other *F. culmorum* strains with a DON/ADON chemotype while the strains INRA 319, INRA 130 and INRA 132 are *F. culmorum* having a NIV/FX chemotype. INRA 349 is a *F. graminearum* strain with a DON/ADON chemotype. Whatever the considered strains, ferulic acid supplementation does not affect fungal biomass production (data not shown). Ferulic acid supplementation leads to a decrease of TCT B biosynthesis for the six *Fusarium* strains tested. The inhibitory effect was significant for all strains but heterogeneous, ranging from strong effect for the strain INRA 124 (78%), middle effect for the strains INRA 349, INRA 130 and INRA 132 (27%, 29% and 37% respectively) and finally, mild effect for the strains INRA 233 and INRA 319 (17% and 18% respectively). Ferulic acid seems to be an effective inhibitor whatever the species or the chemotype considered. However some strains of *Fusarium* seem to be less sensitive to the effect of ferulic acid than others, at least, at the concentration tested.

### 3.4. Ferulic acid reduces *Tri* genes and *Fpps* gene expression of *F. culmorum* *in vitro*

In order to investigate a possible effect at transcriptional level involved in TCT B biosynthesis inhibition by ferulic acid, we analysed the expression of several genes involved in the TCT B biosynthesis pathway (*Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* and *Fpps*) comparing cultures supplemented or not with 0.5 mM ferulic acid (FAt<sub>0</sub>). Experiments were performed by quantitative RT-PCR using RNA extracted from three days old mycelium from the *F. culmorum* INRA 117 strain. Expression of elongation factor *Ef2* gene was used as a reference gene. Analysis of the *Ef2* Cp values indicated that levels of *Ef2* in ferulic acid supplemented cultures were not significantly different from the one in control cultures. The expression values of the target *Tri* genes and the *Fpps* gene, normalized by the reference gene expression value, were expressed as up or down regulation factor in the treated condition relative to the control condition. Expression of all the studied *Tri* genes and *Fpps* gene is





significantly lower in ferulic acid supplemented culture (Fig. 2). The biosynthesis genes *Tri5*, *Tri4* and *Tri11* are expressed 4.1, 4.8 and 5.4 times less respectively in ferulic acid treated cultures. Expression of the transporter *Tri12* is reduced 3.9 times. Expression of the acetyl transferase gene *Tri101* is decreased 2.3 times. Expression of the two transcription factors *Tri6* and *Tri10* is reduced 2 and 2.3 times respectively in ferulic acid treated cultures. Expression of the *Fpps* gene controlling the synthesis of the farnesyl pyrophosphate used as substrate by trichodiene synthase encoded by *Tri5* gene is also decreased 1.5 times. This suggests that, in ferulic acid supplemented cultures, the decrease of toxin production may directly results from a decrease in the level of *Tri* genes and *Fpps* gene expression.

#### 4. Discussion

This study demonstrates a clear inhibitory effect of ferulic acid on TCT B biosynthesis by *Fusarium* in liquid cultures and suggests that inhibition of toxin synthesis is regulated at the transcriptional level.

Ferulic acid is known to have strong antioxidant properties (Rice-Evans *et al.*, 1996). The trichothecene toxins are synthesized from trichodiene by a series of oxygenations (Desjardins *et al.*, 1993). Therefore, changes in the oxidative parameters of the medium could interfere with the fungal secondary metabolism and modulate the levels of trichothecenes production (Ponts, 2005). Recent *in vitro* experiments have shown that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supplementation leads to enhance DON/ADON production by *F. graminearum* (Ponts *et al.*, 2006; Ponts *et al.*, 2007). This suggested that plant metabolites with pro-oxidant properties may have a strong activating effect on TCT B biosynthesis. It was then tempting to raise the hypothesis that secondary metabolites of plant with antioxidant properties may have an inhibitory effect on mycotoxin biosynthesis. In this study, we observed a strong inhibitory effect of ferulic acid on the biosynthesis of TCT B by the *Fusarium* strain INRA 117 grown in MS medium. This inhibitory effect was confirmed for strains of different chemotypes although the intensity of the effect appears to be strain dependent, at least at the concentration tested. The *in vitro* inhibitory effect of ferulic acid we observed is in agreement with the effect observed on TCT B production by *F. graminearum* (Bily, 2003). An inhibitory effect of ferulic acid was also reported for the production of fumonisin B1 by *F. verticillioides* (Beekrum *et al.*, 2003) and aflatoxin by *Aspergillus* (Chipley and Uraih, 1980; Sinha and Premlata, 1981). Moreover, several others studies showed inhibitory effects of antioxidants compounds, including butylated hydroxyanisole or hydroxytoluene (BHA, BHT), trihydroxybutyrophenone (THB)



or propylparaben (PP), on fumonisin production by *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (Etcheverry *et al.*, 2002; Reynoso *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003) or on aflatoxin production by *Aspergillus* (Thompson, 1996; Passone *et al.*, 2005). It has been suggested by Adams and Moss (1995) that antioxidant may act at the cell membrane level, by eliminating the pH component of the proton active force and affecting energy transduction and substrate transport by alteration of cell membrane permeability. By perturbing the membrane function, antioxidant compounds could indirectly interfere with the secondary metabolism of the fungus and thus modulate mycotoxins production.

We observed that addition of ferulic acid at the spore germination step has a lasting effect on induction of the toxin biosynthesis three to five days latter, although the added ferulic acid completely disappeared from the medium at the time biosynthesis initiates. Addition of ferulic acid on mycelium at  $t_3$ , when induction of the TCT B biosynthesis generally takes place, leads to the same result that supplementation at  $t_0$ . In addition, successive supplementations at  $t_0$  and  $t_3$  showed a cumulative effect. This result is consistent with the data of Ponts *et al.* (2006) who reported that a daily  $H_2O_2$  supplementation has much more drastic activating effect on TCT B accumulation by *F. graminearum* than a treatment at a single time point. Successive addition of an antioxidant molecule was expected to have the reverse inhibitory cumulative effect.

From our results, it seems that ferulic acid can have a lasting effect but can also act quite directly on TCT B biosynthesis pathway. This led us to analyse if ferulic acid addition had effect or not on the level of *Tri* genes expression. For the first time, our results clearly show that in ferulic acid supplemented cultures of *Fusarium*, the decrease of toxin production could result from a general lower expression of the *Fpps* gene and the *Tri* genes studied. According to the schematic regulatory model of the trichothecenes biosynthesis pathway proposed by Tag *et al.* (2001), we hypothesize that ferulic acid may possibly act either on *Tri10* expression or on a more general regulator of *Tri10*. Thus, we suppose that the lower expression of *Tri10* leads to a cascade regulation with the reduction of *Tri6* expression that leads to the decrease of expression of *Fpps*, *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri12* and *Tri101*. This hypothesis is in agreement with the observation of Tag *et al.* (2001) that disruption of *Tri10* in *F. sporotrichioides* abolished T-2 toxin production and dramatically decreased the transcript accumulation for *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri101* and also *Fpps* and with the works of Peplow *et al.* (2003) who showed that six more trichothecene genes, including *Tri11* and *Tri12*, were regulated by *Tri10*.



Our results suggest that applying ferulic acid at the spore germination step or during fungal mycelium development has the same lasting effect on the reduction of TCT B biosynthesis by *F. culmorum*. In kernels, phenolic acids are present in free soluble form but the majority of phenolic acids are insoluble and bound in cell walls polysaccharides by ester linkages, with ferulic acid the major phenolic acids (Zhou *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). In response to the pathogen infection, phenolic acids could accumulate rapidly at the infection site (Matern and Kneusel, 1988; Nicholson and Hammerschmidt, 1992) or some esterified forms of phenolic acids could be released from cell walls by esterase (Faulds and Williamson, 1995). This suggests that during its progression into the kernel, *Fusarium* can encounter several times ferulic acid. According to our *in vitro* results, several contacts between *Fusarium* and ferulic acid lead to a cumulative reduction of TCT B yields.

Our data report a "dose effect" of ferulic acid on the reduction of TCT B biosynthesis by *F. culmorum*. If confirmed for various *Fusarium* strains, this result is of great concern, knowing that *in planta*, ferulic acid is the most abundant phenolic acid present in kernel and that ferulic acid concentration is different between varieties of wheat (Moore *et al.*, 2006; Mpofu *et al.*, 2006). This could explain the difference in TCT B yields accumulating in kernels depending on durum wheat varieties (Favre *et al.*, 2004). More studies have to be performed in order to link ferulic acid content of wheat and TCT B contamination of kernels. It remains to demonstrate that ferulic acid is effective *in planta*. Such a result could open the way for selecting varieties exhibiting an appropriate kernel composition, rich in ferulic acid.

### **Acknowledgements**

This work is part of Anne-Laure Boutigny' PhD project financially supported by the IRTAC (Institute of Technical and Agronomical Research on Cereals), the ANRT ("Association Nationale de la Recherche Technique") and the "Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche" as a part of the National Integrated Research Project "RARE fusariotoxines 2003-2007".

### **References**

Adams, M.R., Moss, M.O., 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 88-90.



## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

- Alexander, N.J., Hohn, T.M., McCormick, S.P., 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.
- Alexander, N.J., McCormick, S.P., Hohn, T.M., 1999. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular and General Genetics* 261, 977-984.
- Beekrum, S., Govinden, R., Padayachee, T., Odhav, B., 2003. Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B<sub>1</sub>. *Food Additives and Contaminants* 20, 490-493.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497-516.
- 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. Thèse Doctorale, Université de Pau, France.
- 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., Regnault-Roger, C., 2004. Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia* 157, 117-126.
- Bottalico, A., Perrone, G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 611-624.
- Brown, D.W., Dyer, R.B., McCormick, S.P., Kendra, D.F., Plattner, R.D., 2004. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genetics and Biology* 41, 454-462.
- Chipley, J.R., Uraih, N., 1980. Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 352-357.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M., McCormick, S.P., 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiological Reviews* 57, 595-604.
- Etcheverry, M., Torres, A., Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2002. *In vitro* control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *Journal of Applied Microbiology* 92, 624-632.
- Faulds, C.B., Williamson, G., 1995. Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 1082-1087.
- Favre, L., Verdal-Bonnin, M.N., Pinson-Gadais, L., Roumet, P., Barreau, C., Richard-Forget, F., 2004. Does biochemical composition of durum wheat kernels influence the trichothecenes B (TCT B) contamination levels. In: 2<sup>nd</sup> International Symposium on *Fusarium* Head Blight, Orlando, Florida, USA.
- Hazel, C.M., Patel, S., 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters* 153, 51-59.
- Hohn, T.M., Desjardins, A.E., 1992. Isolation and gene disruption of the *Tox5* gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5, 249-256.
- Hohn, T.M., Desjardins, A.E., McCormick, S.P., 1995. The *Tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Molecular and General Genetics* 248, 95-102.
- Hohn, T.M., Roopa, K., Proctor, R.H., 1999. Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology* 26, 224-235.
- Kim, K.-H., Tsao, R., Yang, R., Cui, S.W., 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry* 95, 466-473.





## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

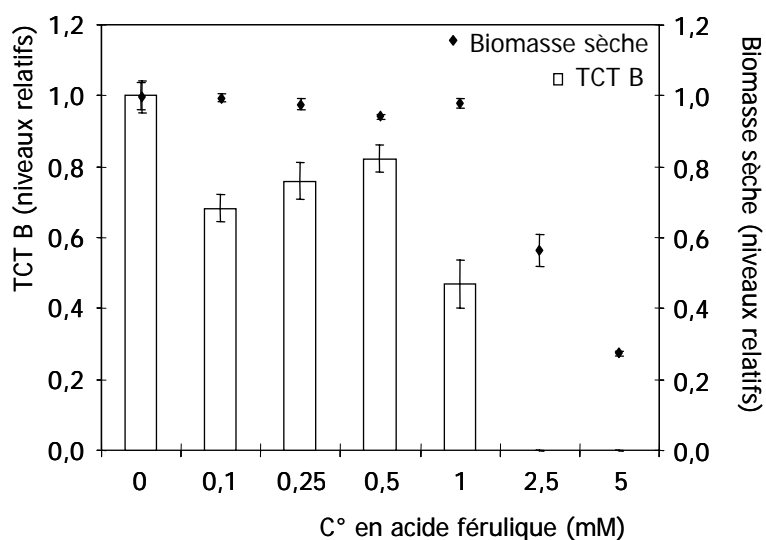
- Kimura, M., Matsumoto, G., Shingu, Y., Yoneyama, K., Yamaguchi, I., 1998. The mystery of the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene. Analysis of the region around *Tri101* and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*. FEBS Letters 435, 163-168.
- Lempereur, I., Rouau, X., Abecassis, J., 1997. Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. Journal of Cereal Science 25, 103-110.
- Lempereur, I., Surget, A., Rouau, X., 1998. Variability in dehydrodiferulic acid composition of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) and distribution in milling fractions. Journal of Cereal Science 28, 251-258.
- Matern, U., Kneusel, R.E., 1988. Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica 16, 153-170.
- McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H., 2006. *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. Canadian Journal of Microbiology 52, 636-642.
- Moore, J., Liu, J.G., Zhou, K.Q., Yu, L.L., 2006. Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 5313-5322.
- Mpofu, A., Sapirstein, H.D., Beta, T., 2006. Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 1265-1270.
- Nicholson, R.L., Hammerschmidt, R., 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopathology 30, 369-389.
- Passone, M.A., Resnik, S.L., Etcheverry, M.G., 2005. *In vitro* effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B1 accumulation by peanut *Aspergillus* section Flavi. Journal of Applied Microbiology 99, 682-691.
- Peplow, A.W., Tag, A.G., Garifullina, G.F., Beremand, M.N., 2003. Identification of new genes positively regulated by *Tri10* and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. Applied and Environmental Microbiology 69, 2731-2736.
- Peyron, S., Surget, A., Mabilbe, F., Autran, J.C., Rouau, X., Abecassis, J., 2002. Evaluation of tissue dissociation of durum wheat grain (*Triticum durum* Desf.) generated by the milling process. Journal of Cereal Science 36, 199-208.
- Pfaffl, M., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. Nucleic Acids Research 29, 2002-2007.
- 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 PCR. Nucleic Acids Research 30, 1-10.
- Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Chaurand, M., Gregoire, S., Monmarson, M., Richard-Forget, F., 2007. Distribution of toxigenic *Fusarium spp.* and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. Food Additives and Contaminants 24, 53-62.
- Ponts, N., 2005. Influence de stress oxydatifs sur la biosynthèse de mycotoxines de *Fusarium spp.* contaminantes de l'épi de Maïs. Thèse Doctorale, Université de Bordeaux, France.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.N., Barreau, C., Richard-Forget, F., 2006. Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. FEMS Microbiology Letters 258, 102-107.



## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

---

- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., Ouellet, T., 2007. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. FEBS Letters 581, 443-447.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M., McCormick, S.P., Desjardins, A.E., 1995. *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. Applied and Environmental Microbiology 61, 1923-1930.
- Reynoso, M.M., Torres, A.M., Ramirez, M.L., Rodriguez, M.I., Chulze, S.N., Magan, N., 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.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical Biology and Medicine 20, 933-956.
- Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F.M., 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. Food Additives and Contaminants 22, 369-378.
- Sinha, K.K., Premata, S., 1981. Effect of some phenolics on aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus*. Indian Phytopathology 34, 530-531.
- Tag, A.G., Garifullina, G.F., Peplow, A.W., Ake, C., Phillips, T.D., Hohn, T.M., Beremand, M.N., 2001. A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. Applied and Environmental Microbiology 67, 5294-5302.
- Thompson, D.P., 1996. Effect of butylated hydroxyanisole on intracellular components of aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Mycological Research 100, 1256-1258.
- Tokai, T., Koshino, H., Takahashi-Ando, N., Sato, M., Fujimura, M., Kimura, M., 2007. *Fusarium Tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. Biochemical and Biophysical Research Communications 353, 412-417.
- Torres, A.M., Ramirez, M.L., Arroyo, M., Chulze, S.N., Magan, N., 2003. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. International Journal of Food Microbiology 83, 319-324.
- Vogel, H.J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). Microbial Genetics Bulletin 13, 42-43.
- Zhou, K., Su, L., Yu, L.L., 2004. Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 6108-6114.



**Figure 39 : Effet d'une gamme de concentration en acide férulique sur la production de biomasse sèche et sur les niveaux de TCT B produits par la souche INRA 319 cultivée sur milieu MS.**

Les niveaux de biomasse sèche et de TCT B produits sont analysés après 10 jours de culture. Les niveaux de TCT B produits par la souche dans les cultures traitées avec de l'acide férulique sont exprimés en niveaux relatifs par rapport aux niveaux de TCT B produits par la souche dans les cultures témoins (9394 µg/g).

Les niveaux de production de biomasse sèche par la souche dans les cultures traitées avec de l'acide férulique sont exprimés en niveaux relatifs par rapport aux niveaux de biomasse sèche produits par la souche dans les cultures témoins (28 mg).

### Commentaires additionnels sur la publication précédente

#### 1) "Effet dose" *in vitro* de l'acide férulique sur la biosynthèse de toxines par *Fusarium*

Dans la publication précédente, l'effet de différentes concentrations en acide férulique sur la biosynthèse de toxines par *Fusarium* a été étudié. Les cultures de *Fusarium* ont été supplémentées par différentes concentrations en acide férulique (de 0 à 5 mM) et, les niveaux de TCT B produits ainsi que les niveaux de biomasse sèche produites ont été analysés (cf. publication précédente, Table 4 ). Pour des concentrations en acide férulique comprise entre 0 et 1 mM, la production de biomasse sèche fongique est peu affectée. Par contre, à ces concentrations, les niveaux de TCT B sont inhibés et le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration en acide férulique supplémentée.

Nous avons voulu vérifier l'effet dose de l'acide férulique sur une autre souche de *F. culmorum* (INRA 319) de chémotype NIV/FX. De la même façon, les cultures ont été supplémentées par des concentrations croissantes en acide férulique (de 0 à 5 mM) et, les niveaux de TCT B produits ainsi que les niveaux de biomasse sèche produites ont été analysés (figure 39). En ce qui concerne la croissance mycélienne, les niveaux de biomasse sèche produits sont peu affectés par la supplémentation d'acide férulique jusqu'à 1 mM. Par contre, la supplémentation des cultures par des concentrations en acide férulique supérieures à 1 mM inhibe la production de biomasse sèche de 44% à 2,5 mM en acide férulique et 73% à 5 mM en acide férulique. Ces résultats sont en accord avec les résultats présentés dans la publication précédente obtenus avec la souche de *F. culmorum* INRA 117 productrice de DON/ADON. En ce qui concerne les niveaux de TCT B produits, l'addition d'acide férulique dans les cultures inhibe la production de TCT B de 32% à 0,1 mM de 24% à 0,25 mM de 18% à 0,5 mM, de 53% à 1 mM, 100% au-delà de 2,5 mM en acide férulique. Les résultats obtenus ici sont différents des résultats obtenus avec la souche INRA 117. De plus, pour la souche INRA 319, on n'observe pas de relation entre la concentration en acide férulique supplémentée aux cultures et le pourcentage d'inhibition de la biosynthèse des trichothécènes B. A 0,5 mM, l'acide férulique inhibe la production de TCT B de 90% pour la souche INRA 117 et de 18% pour la souche INRA 319. Ceci met en évidence une différence de sensibilité vis-à-vis de l'acide férulique selon les souches de *F. culmorum*. Cette différence de sensibilité des souches à l'acide férulique est confirmée par l'analyse de l'effet de l'acide férulique (à 0,5 mM) sur la



production de TCT B par différentes souches de *Fusarium*, de chémotypes et d'espèces différentes, dont les résultats sont présentés dans la publication précédente (Table 5).

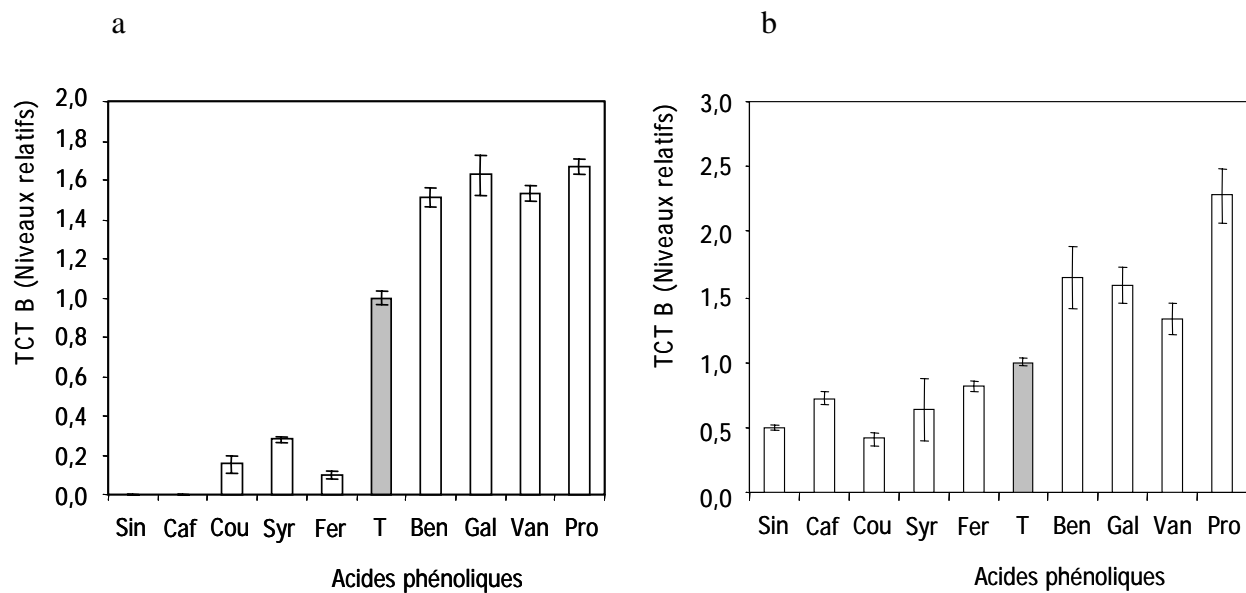
Pour la suite des études, nous avons décidé d'étudier l'effet "anti mycotoxines" des acides phénoliques individuels à une concentration de 0,5 mM. En effet, une telle concentration en acide férulique ne semble pas affecter la croissance fongique de différentes souches de *Fusarium*, dans nos conditions de culture. Ceci suggère que l'effet observé sur la biosynthèse de toxines est un effet spécifique des acides phénoliques et non un effet secondaire dû à une réduction de la production de biomasse fongique.

## **2) Effet *in vitro* du temps de supplémentation en acide férulique sur la mycotoxinogénèse de *Fusarium***

Au cours de son développement sur la plante, *Fusarium* pourrait rencontrer une source d'acides phénoliques à la germination ou à l'état de mycélium, c'est-à-dire au moment où il pénètre dans les grains. Nous avons donc étudié l'effet du moment de supplémentation en acide férulique sur la biosynthèse des toxines par *Fusarium*. Les résultats présentés dans la publication précédente (Fig. 1) ont montré que la supplémentation des cultures en acide férulique à un temps ( $t_0$  ou  $t_3$ ), c'est-à-dire lorsque les spores sont en germination ou lorsque le mycélium est en développement, avait le même effet inhibiteur final sur la biosynthèse des TCT B par *Fusarium*. De plus, au cours de l'interaction entre *Fusarium* et la plante hôte, le champignon dégrade les parois cellulaires végétales et libère ainsi progressivement l'acide férulique estérifié des parois cellulaires. Nous avons montré *in vitro* que la supplémentation des cultures en acide férulique à deux temps ( $t_{0+3}$ ) aurait un effet inhibiteur cumulatif sur la biosynthèse des TCT B. Ce résultat suggère qu'une accumulation progressive d'acide férulique sur le site de l'infection due à leur libération des parois pourrait avoir un effet inhibiteur cumulatif de la toxinogénèse.

## **3) Effet *in vitro* de l'acide férulique sur l'expression de divers gènes *Tri* par *Fusarium***

De façon à analyser les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la mycotoxinogénèse par l'acide férulique, son effet a été étudié vis-à-vis de l'expression de divers gènes clés impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes. Nos résultats montrent clairement que dans des cultures de *Fusarium* supplémentées en acide férulique, la diminution des



**Figure 40 : Niveaux relatifs de TCT B produits par les souches de *F. culmorum* INRA 117 (a) et INRA 319 (b) sur milieu MS supplémenté ou non avec différents acides phénoliques.**

Les niveaux de TCT B produits sont analysés après 10 jours de culture. Les acides phénoliques ont été supplémentés à une concentration finale de 0,5 mM.

Sin : acide sinapique, Caf : acide caféique, Cou : acide *p*-coumarique, Syr : acide syringique, Fer : acide férulique, T : témoin, Ben : acide *p*-OH benzoïque, Gal : acide gallique, Van : acide vanillique, Pro : acide protocatéchique.



teneurs en toxines est associée à une plus faible expression de l'ensemble des gènes *Tri* étudiés et du gène *Fpps*. Le régulateur transcriptionnel *Tri10* pourrait jouer un rôle clé dans la régulation de la voie en réponse à l'acide férulique.

### II. 1. 2. Effet d'autres acides phénoliques présents dans les sons

Divers acides phénoliques également présents dans le blé ont été testés pour leurs effets sur la biosynthèse de TCT B par *F. culmorum*, en particulier l'acide sinapique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique, l'acide syringique, l'acide férulique, l'acide *p*-OH benzoïque, l'acide gallique, l'acide vanillique et l'acide protocatéchuique. La présence de ces différents acides phénoliques dans le blé a été rapportée par plusieurs auteurs (Onyeneho et Hettiarachchy, 1992 ; Zhou *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2006). Leur effet sur la biosynthèse des TCT B par les souches INRA 117 et INRA 319 a été étudié (figure 40a et 40b). La concentration en acides phénoliques choisie est de 0,5 mM. Cette concentration n'affecte pas la production de biomasse sèche pour aucun des composés essayés (résultats non montrés), confirmant l'opportunité de notre choix précédent. L'effet des acides phénoliques est analysé après 10 jours de culture. De plus, il a été vérifié que la supplémentation des milieux de culture en acides phénoliques ne modifiait pas le pH initial du milieu de culture.

Les résultats obtenus montrent que les acides sinapique et caféique inhibent totalement la biosynthèse de TCT B par la souche INRA 117 (figure 40a). Les acides *p*-coumarique, syringique et férulique inhibent les niveaux de TCT B produits de 85%, 72% et 90% respectivement. Au contraire, les acides *p*-OH benzoïque, gallique, vanillique et protocatéchuique activent les niveaux de TCT B produits de 51%, 63%, 54% et 67% respectivement.

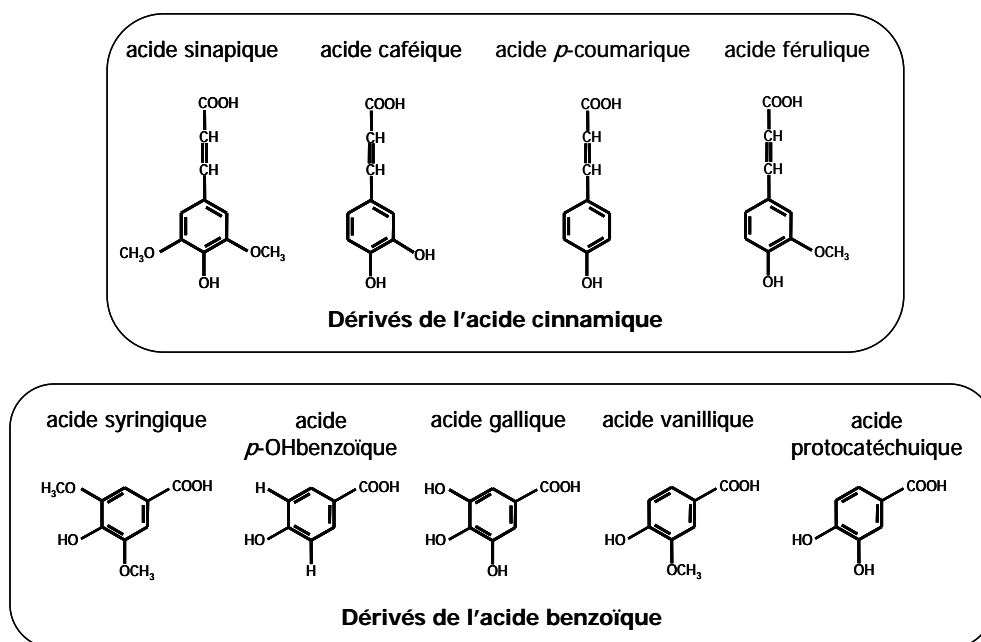
Les effets de ces mêmes acides phénoliques sur la biosynthèse de TCT B par la souche INRA 319, de chémotype NIV/FX, sont moins prononcés (figure 40b). Cependant, les mêmes tendances sont observées que pour la souche INRA 117. Les acides sinapique, caféique, *p*-coumarique, syringique et férulique inhibent les niveaux de TCT B produits de 50%, 28%, 59%, 36% et 18% respectivement. Les acides *p*-OH benzoïque, gallique, vanillique et protocatéchuique induisent une augmentation des niveaux de TCT B produits de 65%, 59%, 33% et 128% respectivement. Ces résultats confirment nos observations précédentes, démontrées avec l'acide férulique, de sensibilités différentes des souches aux acides phénoliques.



Dans nos conditions expérimentales, pour les deux souches de *F. culmorum* testées de chémotype différent, les acides sinapique, caféique, *p*-coumarique, syringique et férulique ont un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse alors que les acides *p*-OH benzoïque, gallique, vanillique et protocatéchuïque ont un effet activateur. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces effets différents selon les acides phénoliques sur la mycotoxinogénèse, en particulier la concentration testée en acides phénoliques, les structures chimiques différentes de ces molécules, leurs propriétés antioxydantes et/ou propriétés lipophiles différentes. Ces hypothèses sont discutées ci-après.

#### **a) Concentration en acides phénoliques testée**

Pour tous les acides phénoliques de l'étude, la concentration testée est 0,5 mM. Cette concentration a été choisie sur la base de l'étude de l'effet d'une gamme de concentration (de 0 à 5 mM) en acide férulique et en acide *p*-coumarique sur la biosynthèse des TCT B par les souches INRA 117 et INRA 319. La concentration de 0,5 mM a été définie comme une concentration appropriée pour l'étude car elle n'affectait pas la croissance du mycélium et une inhibition de la mycotoxinogénèse était observée, sans totalement l'inhiber. Cependant, une gamme de concentration de chacun des acides phénoliques n'a pas été testée vis-à-vis de la biosynthèse des TCT B par ces souches. Il est possible que la concentration de 0,5 mM soit limitante pour les acides pour lesquels un effet activateur de la mycotoxinogénèse est observé. En effet, au cours d'une étude sur l'effet de naphthoquinones sur la biosynthèse d'aflatoxines par *Aspergillus flavus*, Mahoney *et al.* (2000) ont montré qu'à concentrations élevées, la production d'aflatoxine est diminuée ou totalement inhibée, alors qu'à des concentrations faibles, elle est activée. La même constatation a été faite par Mahoney et Molyneux (2004) concernant l'effet de l'acide ellagique sur la biosynthèse d'aflatoxines et l'influence de la concentration testée. Cependant, cette hypothèse d'une concentration trop faible testée pour certains acides phénoliques est peu probable car au cours de notre étude sur l'effet de différentes concentrations en acide férulique et en acide *p*-coumarique sur la mycotoxinogénèse des souches INRA 117 et INRA 319, un effet activateur n'a jamais été observé même aux faibles concentrations testées.



**Figure 41 : Structures chimiques des acides phénoliques de l'étude.**

**Tableau 16 : Potentiel antioxydant et lipophilicité des acides phénoliques de l'étude.**

Acides phénoliques	Potentiel antioxydant * (mg/L)	Lipophilicité** (min)
acide sinapique	183,7	34,3
acide caféique	103,3	18,9
acide <i>p</i> -coumarique	186,0	27,9
acide férulique	170,5	33,1
acide syringique	80,4	21,2
acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	4,8	14,4
acide gallique	324,3	4,8
acide vanillique	117,2	18,6
acide protocatéchuique	163,2	8,9

\* Le potentiel antioxydant a été évalué par Kim et Lee (2004) selon la méthode VCEAC (vitamin C equivalent antioxidant capacity).

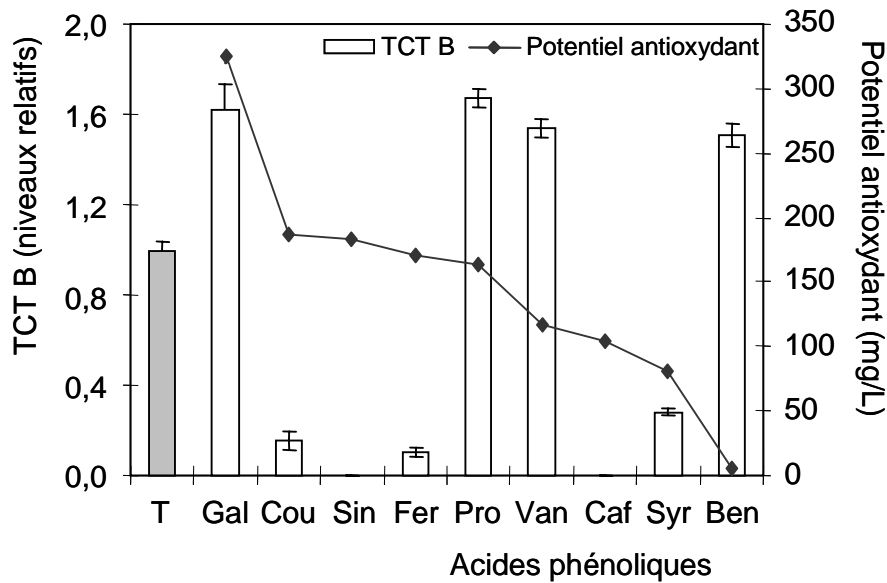
\*\* Le temps de rétention en HPLC sert de marqueur de lipophilicité.

### **b) Relation structure chimique des acides phénoliques et effet sur la mycotoxinogénèse**

Les structures chimiques des différents acides phénoliques de notre étude sont présentées sur la figure 41. Il apparaît que les dérivés de l'acide cinnamique (acides sinapique, caféique, *p*-coumarique et férulique) ont tous un effet inhibiteur de la biosynthèse des TCT B alors que les dérivés de l'acide benzoïque, à l'exception de l'acide syringique, ont un effet activateur. La présence du motif -CH=CH-COOH greffé au noyau benzénique des acides cinnamiques pourrait être impliquée dans l'inhibition de la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. Cependant, nous avons observé que l'acide syringique, dérivé de l'acide benzoïque, ne possédant donc pas de motif -CH=CH-COOH a également un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse. Une étude antérieure portant sur l'effet de différents acides phénoliques sur la croissance de *F. graminearum* avait montré que les dérivés de l'acide cinnamique avaient une action inhibitrice de la croissance plus importante que les dérivés de l'acide benzoïque (Favre, 2004). Dans cette étude, il avait également été observé que l'acide syringique se comportait différemment des autres dérivés de l'acide benzoïque et avait un effet inhibiteur de la croissance de *F. graminearum* semblable à celui des dérivés de l'acide cinnamique. L'acide syringique possède deux groupements méthoxy (-OCH<sub>3</sub>) sur son noyau benzénique. Bien que ces groupements ne soient pas connus pour conférer des propriétés particulières, c'est la seule particularité qui pourrait éventuellement expliquer son pouvoir inhibiteur de la mycotoxinogénèse par rapport aux autres acides dérivés de l'acide benzoïque.

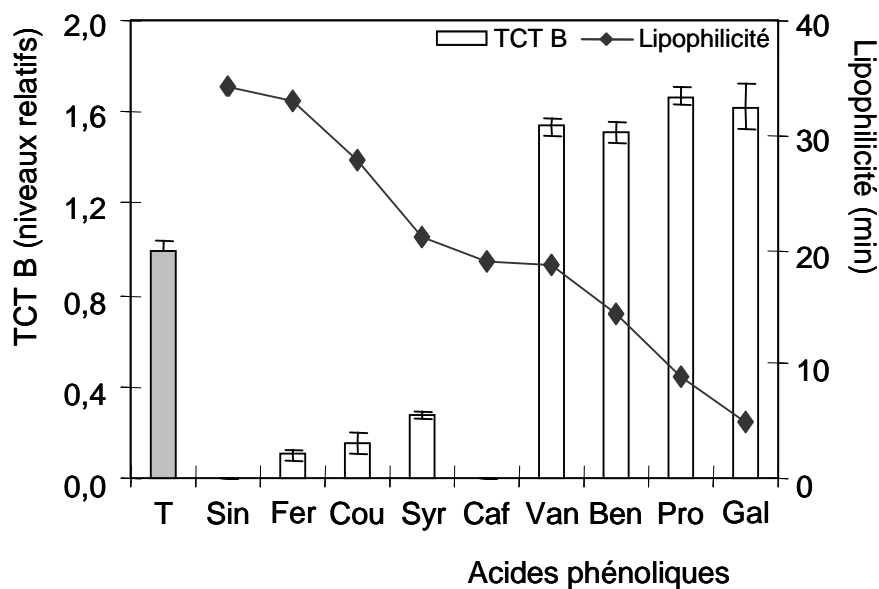
### **c) Relation propriétés antioxydantes des acides phénoliques et effet sur la mycotoxinogénèse**

Les propriétés antioxydantes des acides phénoliques pourraient jouer un rôle dans leur effet modulateur de la mycotoxinogénèse. Les trichothécènes sont synthétisés à partir du trichodiène par une série d'oxygénations (Desjardins *et al.*, 1993). Par conséquent, les modifications des paramètres oxydatifs du milieu de culture pourraient interférer avec le métabolisme secondaire du champignon et moduler les niveaux de trichothécènes produits (Ponts, 2005). Des expérimentations récentes ont montré que la supplémentation de cultures de *F. graminearum* avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulait la production de DON/ADON (Ponts *et al.*, 2006; Ponts *et al.*, 2007). Au contraire, d'autres études ont montré que des composés antioxydants pouvaient avoir un effet inhibiteur de la production de mycotoxines, telles que



**Figure 42 : Relation entre le potentiel antioxydant des acides phénoliques et leur effet sur la biosynthèse de toxines par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée en milieu MS.**

Sin : acide sinapique, Caf : acide caféique, Cou : acide *p*-coumarique, Syr : acide syringique, Fer : acide férulique, T : témoin, Ben : acide *p*-OH benzoïque, Gal : acide gallique, Van : acide vanillique, Pro : acide protocatéchique.



**Figure 43 : Relation entre la lipophilicité des acides phénoliques et leur effet sur la biosynthèse de toxines par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée en milieu MS.**

Sin : acide sinapique, Caf : acide caféique, Cou : acide *p*-coumarique, Syr : acide syringique, Fer : acide férulique, T : témoin, Ben : acide *p*-OH benzoïque, Gal : acide gallique, Van : acide vanillique, Pro : acide protocatéchique.

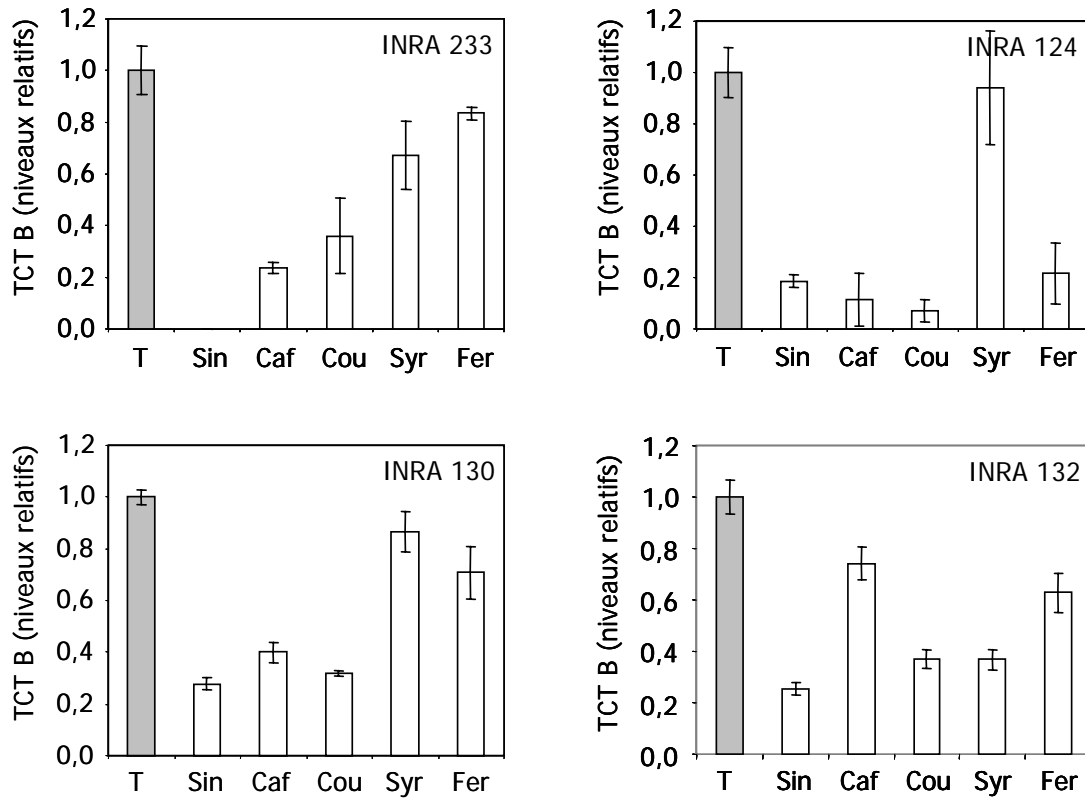
## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

les aflatoxines (Thompson, 1996b; Passone *et al.*, 2005) ou encore les fumonisines (Etcheverry *et al.*, 2002; Reynoso *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2003). Les potentiels antioxydants des acides phénoliques de notre étude sont présentés dans le tableau 16. Nous avons comparé les potentiels antioxydants des acides phénoliques de notre étude avec les niveaux de TCT B produits par la souche INRA 117 en culture en présence de ces acides phénoliques (figure 42). D'après les résultats obtenus, il ne semble pas, si l'on considère tous les acides phénoliques étudiés, exister de relation entre un niveau élevé de potentiel antioxydant d'un acide phénolique et son pouvoir inhibiteur de la mycotoxinogénèse. Par contre, au cours d'une étude sur *F. graminearum* en culture standard GYEP, en prenant en compte les acides *p*-coumarique, férulique, caféique, syringique et *p*-OH benzoïque, Ponts *et al.* (soumis) avait observé une corrélation entre le potentiel antioxydant des acides phénoliques et leur pouvoir activateur de la biosynthèse des TCT B. Cette différence d'effet des acides phénoliques est surprenante et pourrait être attribuée aux conditions expérimentales (souche, milieu, méthodes de culture) qui sont différentes.

### **d) Relation lipophilicité des acides phénoliques et effet sur la mycotoxinogénèse**

Les effets divers observés sur la modulation de la mycotoxinogénèse des acides phénoliques pourraient être liés à des différences de leurs propriétés lipophiles. L'aptitude des molécules à entrer dans les cellules dépend de leur lipophilicité. Guiraud *et al.* (1995) ont attribué la toxicité de l'acide férulique envers la croissance de divers champignons à ses propriétés lipophiles. Les propriétés lipophiles des acides phénoliques de notre étude sont présentées dans le tableau 16. Les valeurs correspondent aux temps de rétention de ces acides phénoliques en HPLC. Nous avons comparé la lipophilicité mesurée dans cette condition de ces acides phénoliques avec les niveaux de TCT B produits par la souche INRA 117 en culture en présence de ces composés (figure 43). Il apparaît que les acides phénoliques les plus lipophiles ont un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse alors que les moins lipophiles auraient un effet stimulateur de la mycotoxinogénèse. Un seuil de lipophilicité pourrait exister ; au-delà de ce seuil, un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse serait induit par les composés les plus lipophiles.

Nos résultats montrent que les acides caféique et vanillique qui ont des propriétés lipophiles et des potentiels antioxydants semblables ont des effets sur la mycotoxinogénèse totalement opposés, l'acide caféique ayant un effet inhibiteur et l'acide vanillique ayant un



**Figure 44 : Effet des acides phénoliques "inhibiteurs" sur la biosynthèse de TCT B par les souches de *F. culmorum* INRA 233, INRA 124, INRA 130 et INRA 132.**

Les acides phénoliques sont supplémentés aux cultures à  $t_0$  à une concentration de 0,5 mM et les niveaux de TCT B produits sont analysés après 10 jours de culture.

T : témoin, Sin : acide sinapique, Caf : acide caféique, Cou : acide *p*-coumarique, Syr : acide syringique, Fer : acide férulique.



CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

---

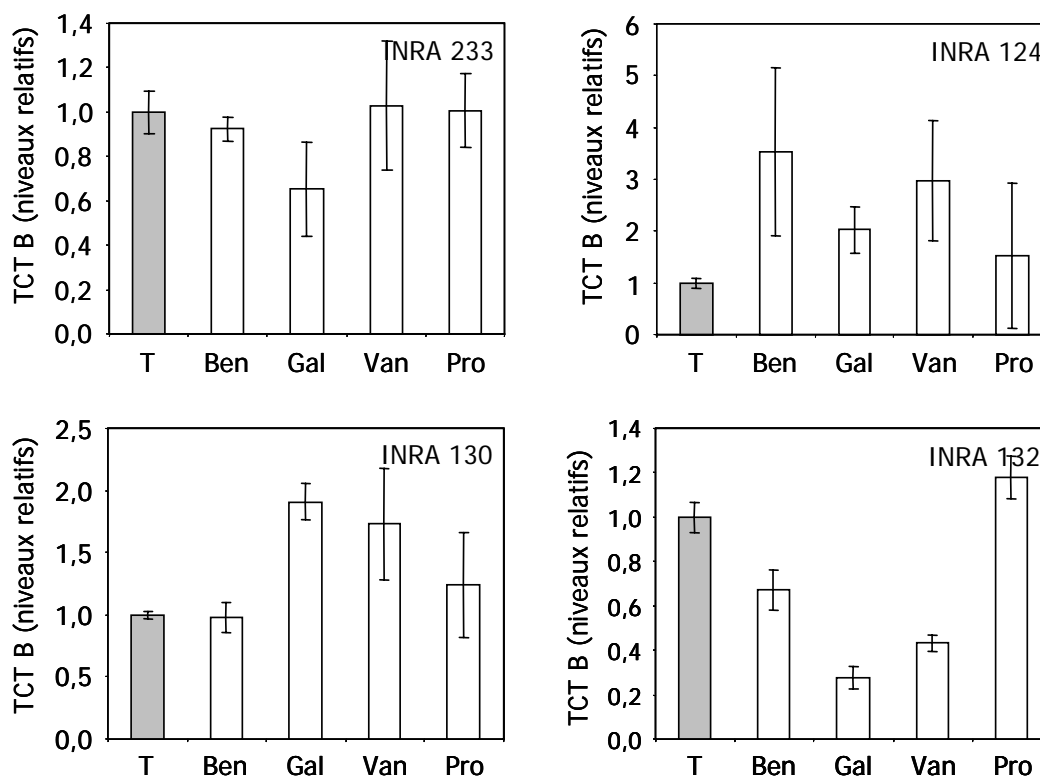
effet stimulateur de la mycotoxinogénèse. Ceci suggère que la lipophilicité n'est pas seule à expliquer les différences d'effet des acides phénoliques sur la mycotoxinogénèse. L'acide caféique étant un dérivé d'acide cinnamique possède le motif  $-CH=CH-COOH$  contrairement à l'acide vanillique qui est un dérivé de l'acide benzoïque. On peut supposer qu'une fois pénétré dans les cellules, les acides phénoliques pourraient avoir des mécanismes d'action différents.

Nous avons étudié l'effet des acides phénoliques sur quatre autres souches de *F. culmorum* : les souches INRA 233 et INRA 124 de chémotype DON/ADON et les souches INRA 130 et INRA 132 de chémotype NIV/FX.

Tout d'abord, les acides phénoliques précédemment montrés comme "inhibiteurs" (sinapique, caféique, *p*-coumarique, syringique et férulique) ont été testés sur la biosynthèse de TCT B par ces quatre souches (figure 44). Les résultats obtenus confirment le pouvoir inhibiteur des acides sinapique, caféique, *p*-coumarique, syringique et férulique vis à vis de la mycotoxinogénèse des quatre souches de *Fusarium*, excepté pour l'acide syringique qui n'a pas d'effet significatif sur la production de TCT B par la souche INRA 124.

Ensuite, les acides phénoliques précédemment montrés comme "activateurs" (*p*-OH benzoïque, gallique, vanillique et protocatéchuique) ont été testés sur la biosynthèse de TCT B par ces souches (figure 45). Globalement, les effets observés sur la mycotoxinogénèse correspondent à une activation ou pas d'effet significatif sauf pour la souche INRA 132 où une inhibition par les acides *p*-OH benzoïque, gallique et vanillique est observée.

En conclusion, nous avons mis en évidence des effets sur la mycotoxinogénèse des acides phénoliques souche dépendante ainsi que des effets acides phénoliques dépendants. Cependant, il semble que globalement on puisse tirer la conclusion que les effets modulateurs de la mycotoxinogénèse des acides phénoliques soient liés à leurs structures chimiques ainsi qu'à leurs propriétés lipophiles.



**Figure 45 : Effet des acides phénoliques "activateurs" sur la biosynthèse de TCT B par les souches de *F. culmorum* INRA 233, INRA 124, INRA 130 et INRA 132.**

Les acides phénoliques sont supplémentés aux cultures à  $t_0$  à une concentration de 0,5 mM et les niveaux de TCT B produits sont analysés après 10 jours de culture.

T : témoin, Ben : acide *p*-OH benzoïque, Gal : acide gallique, Van : acide vanillique, Pro : acide protocatéchuique.

## II. 2. Cinétique de remplissage des grains de blé en acides phénoliques

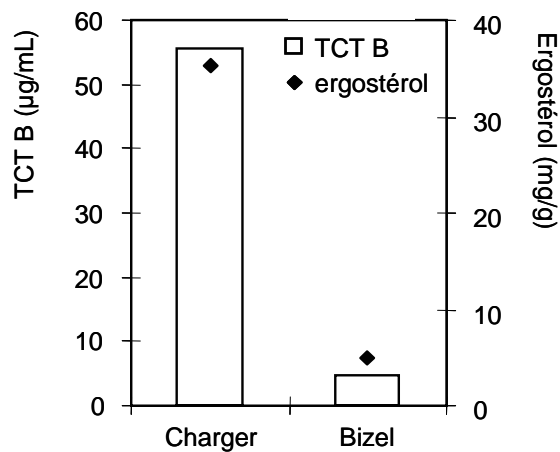
Les conclusions du paragraphe précédent sont que les acides phénoliques testés individuellement ont *in vitro* un effet modulateur de la mycotoxinogénèse. Suite à ces résultats, nous nous sommes interrogés sur la présence des acides phénoliques dans les grains de blé, la variation de la composition en acides phénoliques au cours de la cinétique de remplissage des grains de blé et en réponse à l'infection par *Fusarium*.

Malheureusement nous ne disposons pas d'échantillons de blé dur mais nous disposons d'échantillons de blé tendre sur lesquels nous avons décidé de réaliser cette étude. Des épis de différentes variétés de blé tendre nous ont été fournis par Maxime Trottet (INRA Rennes, France) à différents stades après floraison : 10-12 jours, 20 jours et 30 jours (maturité) (cf. tableau 2, Matériel et Méthodes, p. 58). Des épis contaminés à la floraison par la souche de *F. graminearum* INRA 16 (R964) nous ont également été fournis au stade 30 jours après floraison.

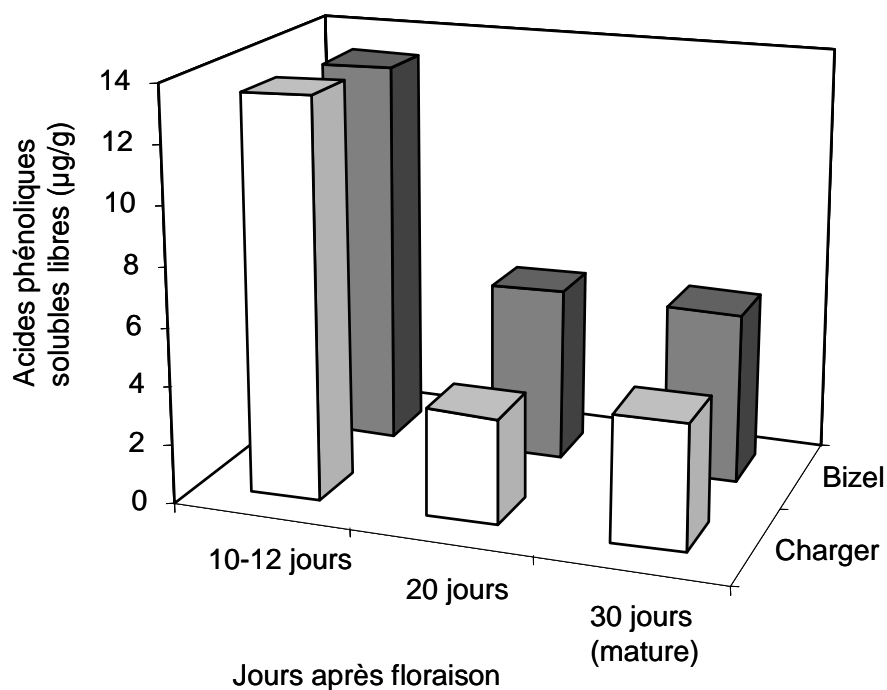
Charger est une variété de blé tendre sensible à la fusariose (note de sensibilité à *Fusarium* : 3) ; Bizel est une variété résistante (note de sensibilité à *Fusarium* : -8). Dans un premier temps, les acides phénoliques solubles libres et insolubles liés aux parois ont été analysés dans les grains de ces deux variétés de blé tendre au cours de la cinétique de remplissage des grains. Les grains contaminés matures de ces deux variétés ont été analysés pour leur contenu en TCT B, en ergostérol, en acides phénoliques solubles et en acides phénoliques insolubles liés aux parois. Puis, dans un deuxième temps, certaines analyses ont été menées sur d'autres variétés de blé tendre, telles Shango, Renan et Sumai 3.

### II. 2. 1. Contenu en TCT B et en ergostérol des grains matures des variétés Charger et Bizel contaminés à la floraison par *F. graminearum*

La figure 46 présente les niveaux de TCT B et le contenu en ergostérol des grains de blé matures, contaminés à la floraison avec la souche de *F. graminearum* INRA 16, des variétés Charger et Bizel. Les résultats obtenus sont en accord avec ce qui est connu concernant les niveaux de résistance à la fusariose et à l'accumulation de mycotoxines de ces deux variétés. En effet, Charger, qui est une variété sensible, présente des niveaux d'ergostérol dans les grains plus importants que Bizel, ce qui traduit un envahissement par le champignon plus



**Figure 46 : Niveaux de TCT B et contenu en ergostérol des grains de blé matures des variétés Charger et Bize1 contaminés à la floraison.**



**Figure 47 : Contenus en acides phénoliques solubles libres des grains des variétés Charger et Bize1 au stade 10-12 jours, 20 jours et 30 jours après floraison.**

important. En ce qui concerne les niveaux de TCT B accumulés dans les grains, ils sont corrélés à la contamination fongique. Bizel accumule peu de TCT B alors que Charger en accumule une quantité environ 12 fois plus importante.

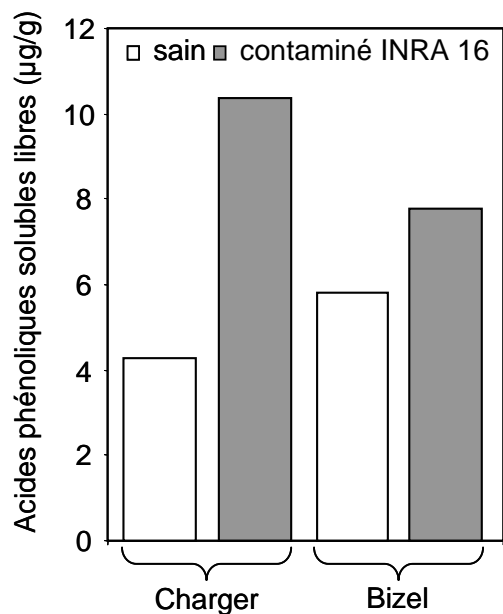
## **II. 2. 2. Contenu en acides phénoliques solubles libres au cours de la cinétique de remplissage des grains des variétés Charger et Bizel**

Au stade 10-12 jours, 20 jours et 30 jours après floraison, le contenu en acides phénoliques solubles libres des grains des variétés Charger et Bizel a été analysé (figure 47). Les acides férulique, *p*-coumarique, sinapique, caféique, protocatéchuique, *p*-OH benzoïque et vanillique ont été détectés dans les grains des deux variétés. L'acide férulique est l'acide phénolique soluble libre majoritaire et représente de 43% à 55% des acides phénoliques solubles libres totaux considérant Charger et Bizel à tous les stades de développement des grains.

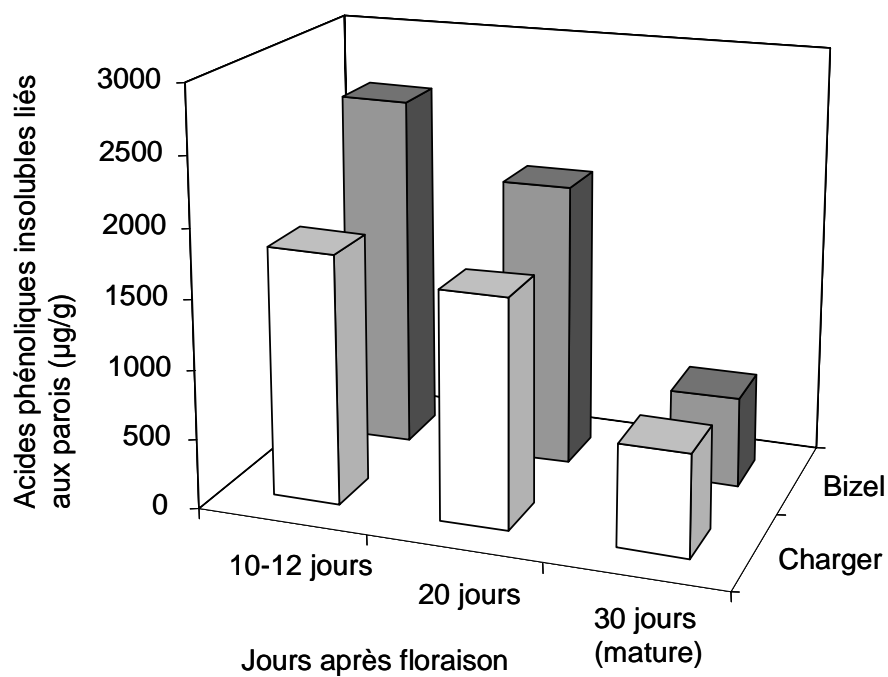
Le contenu en acides phénoliques solubles libres des grains est le plus important à 10-12 jours après floraison, puis, diminue fortement à 20 jours après floraison et est stable jusqu'à 30 jours. Au cours du développement du grain de blé, McCallum et Walker (1991) ont observé deux "pools" de synthèse d'acide férulique soluble au début et à la fin de l'état laiteux du grain suivi par une diminution du contenu en acide férulique soluble à maturité. Ces deux "pools" de synthèse correspondraient à la différenciation de différents tissus du grain. Nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence ces deux moments de synthèse d'acide férulique, les stades d'analyse étant trop distants, par contre, nous observons bien la baisse du contenu en acides phénoliques solubles totaux à partir de 20 jours après la floraison. Cette réduction pourrait être expliquée par l'estérification des acides phénoliques solubles aux parois cellulaires au cours du développement du grain.

A 10-12 jours après floraison, il n'existe pas de différences entre les contenus en acides phénoliques solubles libres des deux variétés. Par contre, à 20 jours après floraison et à maturité, les contenus en acides phénoliques sont légèrement supérieurs (1,6 et 1,4 fois respectivement) dans les grains de la variété Bizel, rappelons que la variété Bizel accumule moins de mycotoxines que la variété Charger.

A maturité, le contenu en acides phénoliques solubles libres a été comparé dans les grains des variétés Charger et Bizel sain ou contaminé à la floraison par la souche INRA 16 de *F. graminearum* (figure 48). Le contenu en acides phénoliques est plus important dans les



**Figure 48 : Contenus en acides phénoliques solubles libres dans les grains matures des variétés Charger et Bizel sain ou contaminé à la floraison.**



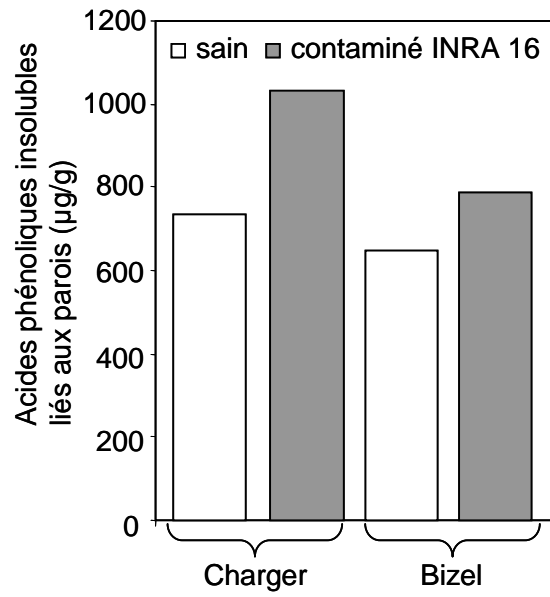
**Figure 49 : Contenus en acides phénoliques insolubles liés des grains des variétés Charger et Bizel au stade 10-12 jours, 20 jours et 30 jours après floraison.**

grains contaminés par rapport aux grains sains, quelle que soit la variété considérée. Le contenu en acides phénoliques des grains contaminés de la variété charger augmente d'un facteur 2,4 alors qu'il augmente seulement d'un facteur 1,3 dans les grains de la variété Bizel. Suite à l'infection, l'augmentation du contenu en acides phénoliques solubles dans les grains contaminés pourrait être expliquée soit par une synthèse d'acides phénoliques, soit par une libération des acides phénoliques estérifiés des parois qui pourrait être plus importante dans les grains de la variété sensible. En effet, la biomasse fongique étant plus importante sur les grains de la variété Charger, on peut supposer qu'il y aurait plus d'activités estérases et hydrolases capables de libérer les acides phénoliques estérifiés dans les parois.

### **II. 2. 3. Contenu en acides phénoliques insolubles liés aux parois au cours de la cinétique de remplissage des grains des variétés Charger et Bizel**

Au stade 10-12 jours, 20 jours et 30 jours après floraison, le contenu en acides phénoliques insolubles liés aux parois des grains des variétés Charger et Bizel a été analysé (figure 49). Les acides férulique, *p*-coumarique, sinapique, caféique et vanillique ont été détectés dans les grains des deux variétés. Pour ces deux variétés, l'acide férulique est l'acide phénolique insoluble lié aux parois largement majoritaire et représente de 94% à 99% des acides phénoliques insolubles liés aux parois totaux à tous les stades de développement des grains. A 10-12 jours et 20 jours après floraison, l'acide *p*-coumarique est le deuxième acide phénolique majoritaire. A maturité, ce sont les acides *p*-coumarique et sinapique qui constituent les acides phénoliques majoritaires après l'acide férulique. Des variations qualitatives des contenus en acides phénoliques ont déjà été observées au cours de la maturation des grains de blé (McKeehen *et al.*, 1999).

Le contenu en acides phénoliques insolubles liés des grains est le plus important à 10-12 jours après floraison, puis diminue entre 10-12 et 30 jours après floraison. Une diminution du contenu en acides phénoliques liés au cours du développement du grain a également été rapportée par McCallum et Walker (1991) ou encore par McKeehen *et al.* (1999). Cette diminution du contenu en acides phénoliques liés pourrait être expliquée par la réduction de leur extractibilité au cours du développement du grain (McCallum et Walker, 1991 ; McKeehen *et al.*, 1999). McKeehen *et al.* (1999) suggère que le développement de l'endosperme dépasse le développement des couches externes à maturité, et par conséquent, le contenu en acides phénoliques est dilué. On peut également supposer que cette diminution est



**Figure 50 : Contenus en acides phénoliques insolubles liés dans les grains matures des variétés Charger et Bizel sain ou contaminé à la floraison.**



## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

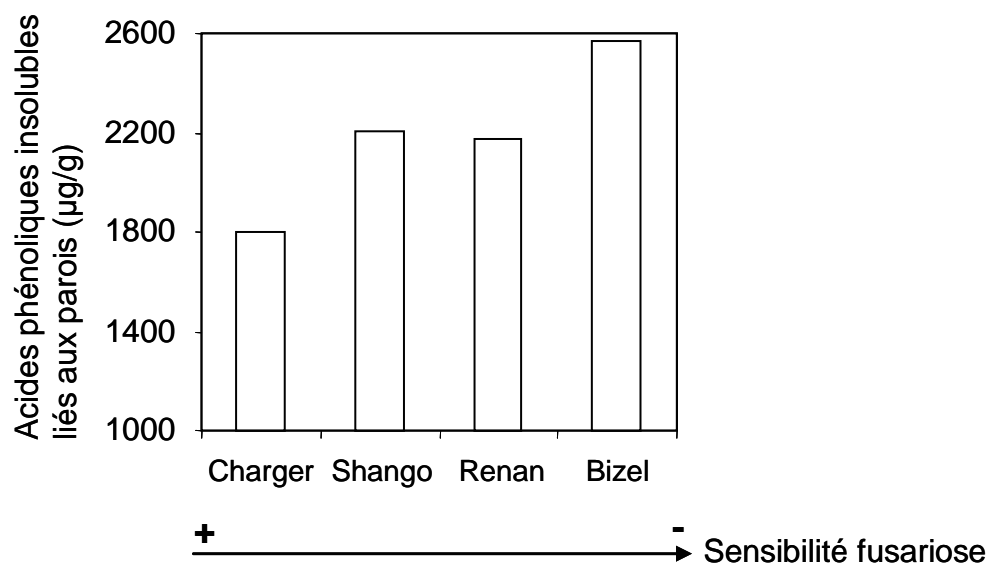
artificielle si l'on considère la matière sèche, car à 10 jours, le grain est aqueux alors qu'à 30 jours, le grain est sec.

A 10-12 jours et à 20 jours après floraison, les contenus en acides phénoliques sont légèrement supérieurs (1,4 et 1,3 fois respectivement) dans les grains de la variété Bizel. Par contre, à maturité, il n'existe pas de différences entre les contenus en acides phénoliques des deux variétés. Ceci est en accord avec les résultats de McKeehen *et al.* (1999) qui ont observé des concentrations en acide férulique lié plus importante dans les grains de la variété Sumai (variété résistante) par rapport à la variété Roblin (variété sensible) jusqu'à 27 jours après l'anthèse. McKeehen *et al.* (1999) observent également que, à maturité, le contenu en acide férulique lié est identique dans les grains des six variétés de leur étude.

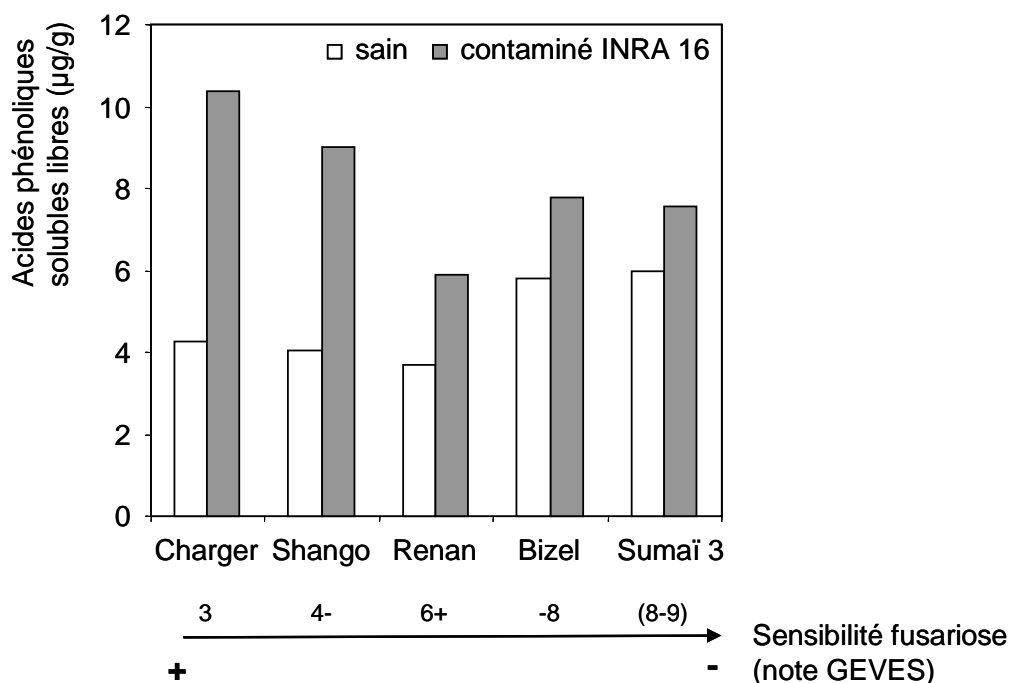
A maturité, le contenu en acides phénoliques insolubles liés a été comparé dans les grains des variétés Charger et Bizel sain ou contaminé à la floraison par la souche de *F. graminearum* INRA 16 (figure 50). Le contenu en acides phénoliques augmente lorsque les grains ont été contaminés par rapport aux grains sains, quelle que soit la variété considérée. Le contenu en acides phénoliques des grains contaminés de la variété charger augmente d'un facteur 2,4 alors qu'il augmente seulement d'un facteur 1,3 dans les grains de la variété Bizel. Ce résultat suggère une augmentation du contenu en acides phénoliques liés en réponse à l'infection. De plus, en réponse à l'infection, une modification qualitative des acides phénoliques est observée, en effet, la concentration en acide sinapique augmente d'un facteur 5 et l'acide sinapique devient le deuxième acide phénolique majoritaire dans les deux variétés.

### II. 2. 4. Conclusion

Le stade 10-12 jours après floraison correspond au stade où les contenus en acides phénoliques solubles et en acides phénoliques liés sont les plus importants. Ce stade correspond également à un moment de plus grande sensibilité des grains à *Fusarium* et à la contamination par les mycotoxines. A 10-12 jours après floraison, les grains de la variété Bizel (résistante) sont plus riches en acides phénoliques liés que les grains de la variété Charger (sensible). Les acides phénoliques liés contribuent à l'intégrité et à la stabilité des parois (cf. Introduction, Chapitre III). Les parois riches en acides phénoliques liés de certaines variétés de blé pourraient alors limiter l'infection des grains par *Fusarium*. Les épis des variétés de blé tendre Shango (note de sensibilité à *Fusarium* : 4-) et Renan (note de sensibilité à *Fusarium* : 6+) nous ont été fournis par Maxime Trottet (INRA Renne, France) (cf. tableau 2, Matériel et Méthodes, p. 58). A 10-12 jours après floraison, les grains de ces



**Figure 51 :** Contenus en acides phénoliques insolubles liés des grains des variétés Charger, Shango, Renan et Bizel au stade 10-12 jours après floraison et sensibilité à la fusariose.

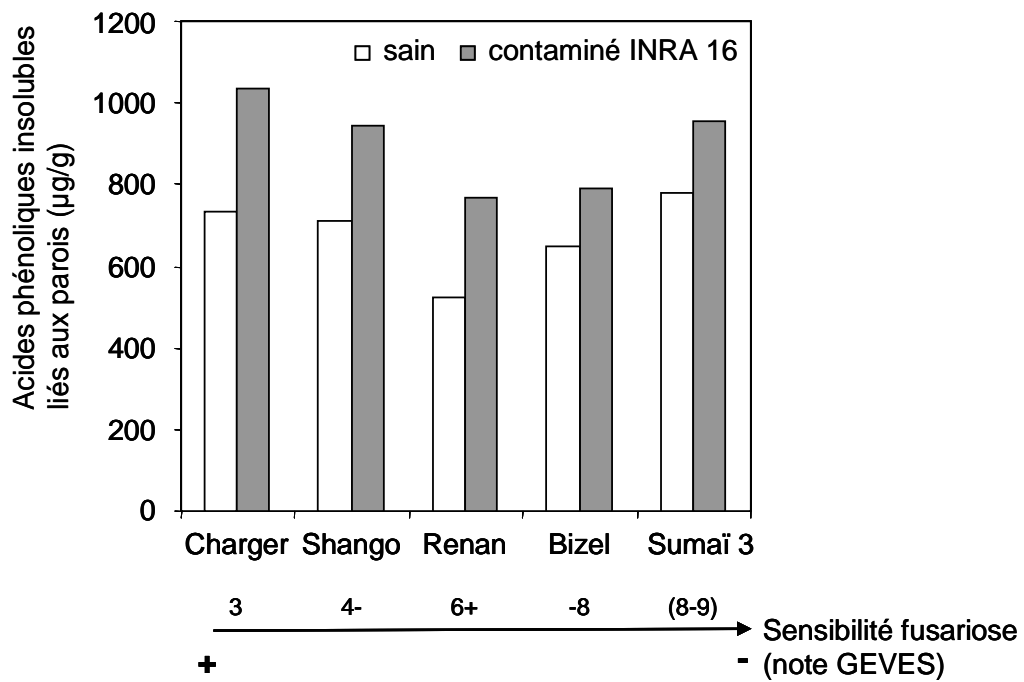


**Figure 52 :** Contenus en acides phénoliques solubles libres des grains matures des variétés Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumai 3 sain ou contaminé à la floraison.

## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

variétés, qui présentent des sensibilités intermédiaires à la fusariose ainsi qu'à l'accumulation de mycotoxines comparées à Charger et Bizel, ont été analysés pour leur contenu en acides phénoliques liés (figure 51). Le contenu en acides phénoliques liés des variétés Shango et Renan ne semble pas différent. Il est supérieur au contenu de la variété Charger et est inférieur au contenu de la variété Bizel. Par conséquent, nous ne pouvons pas conclure sur l'existence d'un lien entre le contenu des grains en acides phénoliques liés à 10-12 jours après floraison et la résistance à l'accumulation de mycotoxines si l'on considère ces quatre variétés. Cependant, ces résultats constituent des données préliminaires compte tenu qu'une seule extraction des acides phénoliques liés a pu être réalisée sur les grains. Il conviendrait de multiplier les extractions et de considérer un plus grand nombre de variétés afin de conclure ou pas sur l'implication des acides phénoliques liés dans la résistance à l'accumulation de mycotoxines.

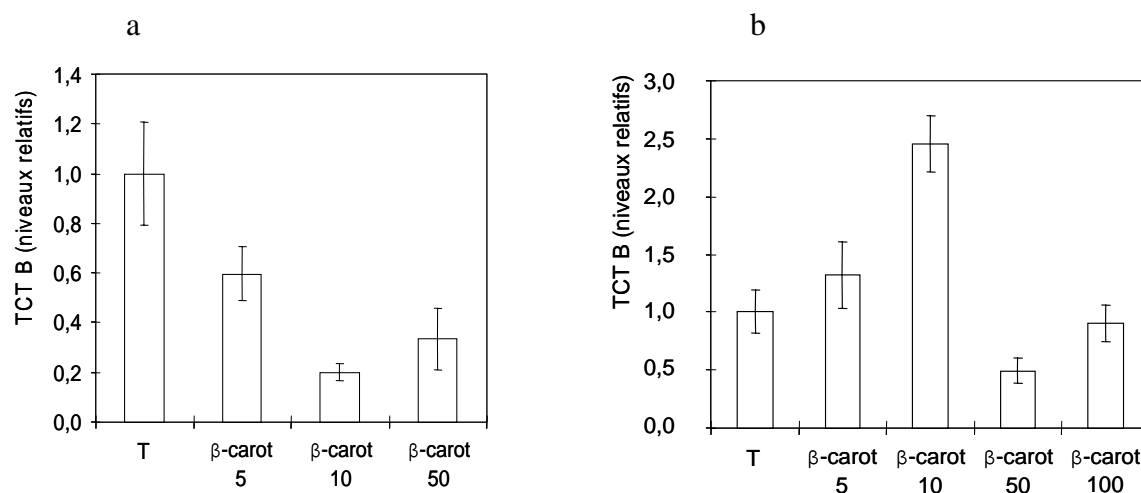
En réponse à l'infection, une augmentation des contenus en acides phénoliques solubles et en acides phénoliques liés a été observée quelle que soit la variété considérée. A maturité, les grains contaminés ou non des variétés Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumai 3 (note de sensibilité à *Fusarium* : (8-9)) ont été analysés pour leur contenu en acides phénoliques solubles (figure 52). Ce contenu augmente en réponse à l'infection et semble augmenter d'autant plus que la variété est sensible à *Fusarium*. Ce résultat est cohérent. En effet, cette augmentation du contenu en acides phénoliques solubles pourrait être le résultat de la libération d'acides phénoliques estérifiés aux parois suite à la dégradation des parois par le pathogène. Plus la variété est sensible, plus le champignon se développe sur les grains et plus les activités enzymatiques sont capables de libérer les acides phénoliques des parois. Ces résultats sont préliminaires étant donné qu'une seule extraction des acides phénoliques solubles des grains a pu être réalisée. Siranidou *et al.* (2002) ont observé que six jours après infection, le contenu en acides phénoliques libres diminue dans les grains d'une variété résistante (Frontana) ainsi que dans les grains d'une variété sensible (Agent) et que cette diminution était plus rapide dans les grains de la variété sensible. Le stade 30 jours après floraison ne paraît pas le stade le plus adapté pour cette étude. Des perspectives intéressantes seraient de réaliser des cinétiques plus précises du remplissage des grains infectés ou non en acides phénoliques de variétés de sensibilité différente à l'accumulation de mycotoxines et non d'effectuer seulement une analyse à 30 jours après l'infection.



**Figure 53 : Contenu en acides phénoliques insolubles liés des grains matures des variétés Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumai 3 sain ou contaminé à la floraison.**

A maturité, les grains contaminés ou non des variétés Charger, Shango, Renan, Bizel et Sumaï 3 ont été analysés pour leur contenu en acides phénoliques insolubles liés des parois (figure 53). Ce contenu augmente en réponse à l'infection. Comme l'ont suggéré Siranidou *et al.* (2002), cette augmentation du contenu en acides phénoliques liés des parois pourrait être relié au processus de lignification des parois en réponse à l'attaque du pathogène. Cependant, nos résultats ne montrent pas de relation entre le contenu en acides phénoliques liés à maturité et la résistance à l'accumulation de mycotoxines des variétés. Dans leur étude, Siranidou *et al.* (2002) analysent le contenu en acide férulique lié dans des grains de blé de variétés résistantes et sensibles à deux, trois et six jours après l'infection. A deux jours après inoculation, ils observent déjà une augmentation significative du contenu en acide *p*-coumarique dans les tissus de la variété résistante par rapport au témoin non inoculé. Nous pensons qu'il faudrait analyser la cinétique de remplissage des grains infectés ou non en acides phénoliques de variétés de sensibilité différente et le corrélérer à l'accumulation de toxines dans les grains et non d'effectuer seulement une analyse à maturité. Notre analyse à 30 jours est trop tardive puisque deux jours après infection, des études rapportent déjà des variations des contenus en acides phénoliques.

Notre question initiale était de savoir si les acides phénoliques étaient présents et disponibles lorsque *Fusarium* infecte les grains. Nos résultats montrent que dès 10-12 jours après floraison, des acides phénoliques solubles libres et liés sont présents dans les grains et pourraient donc interférer avec la toxinogénèse de *Fusarium*. Des différences de contenus en acides phénoliques existent selon les variétés. En réponse à l'infection, les contenus en acides phénoliques augmentent et des variations qualitatives de la composition en acides phénoliques sont observées. Nos résultats sont tout de même à moduler puisque les analyses des contenus en acides phénoliques ont été réalisées 30 jours après l'infection. Les perspectives sont incontestablement de réaliser des cinétiques plus précises (jour après jour) de remplissage des grains en acides phénoliques en comparant dans un premier temps une variété résistante et une variété sensible. Les sensibilités à la fusariose ou à l'accumulation de toxines différentes des variétés pourraient par exemple être reliées à la rapidité de synthèse des acides phénoliques ou de leur estérification aux parois.



**Figure 54 : Effet d'une gamme de concentration en  $\beta$ -carotène sur la biosynthèse de TCT B par les souches de *F. culmorum* INRA 117 (a) et INRA 319 (b) cultivées sur milieu MS.**

Les niveaux de TCT B sont analysés après 10 jours de culture. Les concentrations en  $\beta$ -carotène supplémentées vont de 0 à 50  $\mu\text{g/mL}$ . Les niveaux de TCT B dans les cultures supplémentées en  $\beta$ -carotène sont exprimés en niveaux relatifs par rapport aux niveaux de TCT B dans les cultures témoins (T).

## II. 3. Etude préliminaire de l'effet du $\beta$ -carotène sur la mycotoxinogénèse

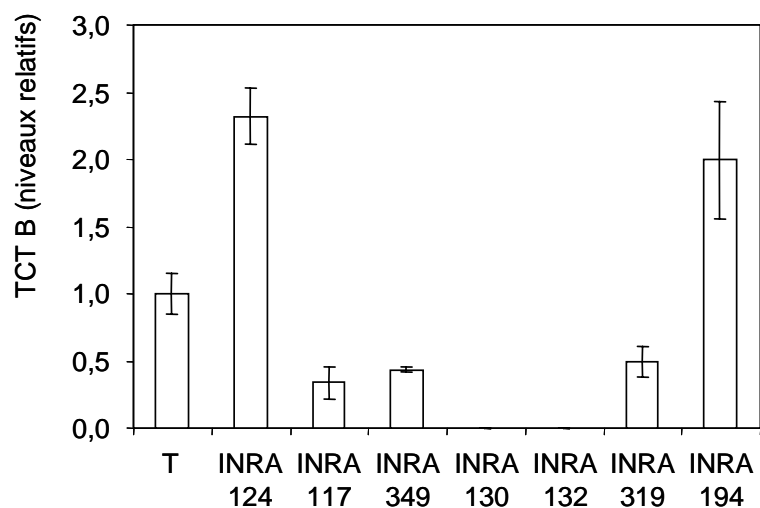
Une étude préliminaire sur l'effet des caroténoïdes en tant que molécules candidates pour l'inhibition de la mycotoxinogénèse a été entreprise. La lutéine et la zéaxanthine sont les caroténoïdes majoritaires dans les grains de blé (Abdel-Aal *et al.*, 2007). Pour une étude préliminaire, nous avons décidé d'utiliser le  $\beta$ -carotène comme composé modèle, malgré qu'il ne soit pas le caroténoïde majoritaire des grains.

Il est à noter que pour réaliser les expérimentations suivantes, nous avons utilisé du Tween 80, indispensable pour une solubilisation homogène du  $\beta$ -carotène dans le milieu de culture aqueux. Pour chaque expérimentation, des témoins ont été réalisés en leur supplémentant un même volume de Tween 80 et, nous avons pu constater que le Tween 80, à lui seul, a un effet sur la toxinogénèse. Les résultats présentés sont donc à prendre avec précaution. Afin d'apprécier les effets spécifiques du  $\beta$ -carotène sur la toxinogénèse, les résultats obtenus sont présentés relativement aux niveaux de TCT B dans les cultures témoins contenant la même quantité de Tween 80.

### II. 3. 1. Effet d'une gamme de concentration en $\beta$ -carotène sur la biosynthèse de toxines

Dans son étude, Norton (1997) a observé que la lutéine, la zéaxanthine ou le  $\beta$ -carotène inhibait 50% de la biosynthèse d'aflatoxines à des concentrations de 0,62  $\mu\text{g/mL}$ , 32  $\mu\text{g/mL}$  et 64  $\mu\text{g/mL}$  respectivement. A 50  $\mu\text{g/mL}$ , le  $\beta$ -carotène inhibe la biosynthèse d'aflatoxines de plus de 90% de 28 souches d'*Aspergillus flavus* (Wicklow *et al.*, 1998).

Afin de se rapprocher des concentrations inhibitrices *in vitro* de la biosynthèse d'aflatoxines déterminées dans les études de Norton (1997) et de Wicklow *et al.* (1998), nous avons tout d'abord étudié l'effet d'une gamme de concentration en  $\beta$ -carotène vis-à-vis de la production de biomasse sèche et de la biosynthèse de toxines par les souches de *F. culmorum*. INRA 117 et INRA 319 (figure 54a et 54b). Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. En conditions de cultures supplémentées par le  $\beta$ -carotène, les niveaux de biomasse sèche fongique sont peu affectés (données non représentées).



**Figure 55 : Effet du  $\beta$ -carotène à 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sur la biosynthèse de TCT B par différentes souches *Fusarium* cultivées sur milieu MS.**

Les niveaux de TCT B sont analysés après 10 jours de culture. Les niveaux de TCT B dans les cultures supplémentées en  $\beta$ -carotène sont exprimés en niveaux relatifs par rapport aux niveaux de TCT B dans les cultures témoins (T).



## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

En ce qui concerne la souche INRA 117 (figure 54a), les niveaux de TCT B produits sont réduits de 40%, 80% et 66% lorsque les cultures sont supplémentées avec du  $\beta$ -carotène à une concentration respectivement de 5, 10 et 50  $\mu\text{g/mL}$ .

En ce qui concerne la souche INRA 319 (figure 54b), seule la concentration de 50  $\mu\text{g/mL}$  a un effet inhibiteur de 50% de la biosynthèse des TCT B par rapport aux niveaux produits dans les cultures témoins. Les autres concentrations n'ont pas d'effet significatif (5 et 100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou ont un effet activateur (10  $\mu\text{g/mL}$ ).

L'effet du  $\beta$ -carotène sur la toxigenèse des deux souches de *F. culmorum* de l'étude semble souche dépendant et concentration dépendant. Nos résultats suggèrent qu'il semble exister une concentration optimale pour l'inhibition de la mycotoxinogénèse par le  $\beta$ -carotène. Des concentrations plus faibles ou plus fortes à cette concentration optimale ont un effet moindre ou un effet activateur. Les souches INRA 117 et INRA 319 n'ont pas la même sensibilité au  $\beta$ -carotène pour l'inhibition de la biosynthèse des toxines. La souche INRA 319 de chémotype NIV/FX semble moins sensible. Nous avons observé précédemment que la souche INRA 319 était moins sensible aux acides phénoliques.

### **II. 3. 2. Effet du $\beta$ -carotène sur la biosynthèse de toxines par plusieurs souches de *Fusarium***

L'effet du  $\beta$ -carotène, à une concentration de 50  $\mu\text{g/mL}$ , a été testé vis-à-vis de la toxigenèse de plusieurs souches de *Fusarium*, d'espèces et de chémotypes différents (figure 55). La concentration de 50  $\mu\text{g/mL}$  a été choisie suite aux résultats obtenus dans le paragraphe précédent. Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. Les souches INRA 124, INRA 117, INRA 130 et INRA 132 sont des souches de *F. culmorum*. Les souches INRA 349 et INRA 194 sont des souches de *F. graminearum*. Les souches INRA 124, INRA 117 et INRA 349 sont de chémotype DON/ADON. Les souches INRA 130, INRA 132, INRA 319 et INRA 194 sont de chémotype NIV/FX.

En conditions de cultures supplémentées par le  $\beta$ -carotène à 50  $\mu\text{g/mL}$ , les niveaux de biomasse sèche fongique sont peu affectés quelle que soit la souche de *Fusarium* (données non représentées). En ce qui concerne les niveaux de TCT B produits en condition de cultures supplémentées par le  $\beta$ -carotène, ils sont activés pour les souches INRA 124 et INRA 194 et

**Tableau 17 : Bilan des effets observés sur la production de TCT B par les différentes souches de *F. culmorum*.**

Acides phénoliques	Souches					
	INRA 117	INRA 233	INRA 124	INRA 319	INRA 130	INRA 132
acide sinapique	-	-	-	-	-	-
acide férulique	-	-	-	-	-	-
acide p-coumarique	-	-	-	-	-	-
acide syringique	-	-	0	-	-	-
acide caféique	-	-	-	-	-	-
acide vanillique	+	0	+	+	+	-
acide p-hydroxybenzoïque	+	0	+	+	0	-
acide protocatéchuique	+	0	0	+	0	+
acide gallique	+	-	+	+	+	-

Les souches INRA 117, INRA 233 et INRA 124 sont de chémotype DON/ADON et les souches INRA 319, INRA 130 et INRA 132 sont de chémotype NIV/FX.

Une case rouge représente un effet inhibiteur ; une case verte, un effet activateur et une case blanche, un effet non significatif de la biosynthèse des trichothécènes B.

## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

ils sont réduits de 66%, 56%, 100%, 100% et 51% pour respectivement les souches INRA 117, INRA 349, INRA 130, INRA 132 et INRA 319.

Ces résultats confirment que l'effet du  $\beta$ -carotène sur la toxino-genèse de *Fusarium* est souche dépendant. Les effets semblent indépendants du chémotype de la souche et de l'espèce.

### II. 4. Conclusions sur l'étude de molécules candidates

Au regard des résultats concernant les effets du  $\beta$ -carotène sur la mycotoxinogenèse, il semble que la concentration en  $\beta$ -carotène induisant un effet inhibiteur de la biosynthèse des toxines soit souche dépendante. Le  $\beta$ -carotène a effectivement un effet modulateur de la toxino-genèse, cependant, cet effet peut être activateur ou inhibiteur selon la concentration supplémentée aux cultures de *Fusarium*. Il serait important d'étudier l'effet de la lutéine et de la zéaxanthine qui constituent les caroténoïdes majoritaires du blé. Il sera intéressant pour les futures études de trouver une alternative au Tween 80 afin de solubiliser les caroténoïdes dans les milieux de culture. Ces résultats constituent des données préliminaires sur l'effet des caroténoïdes sur la toxino-genèse de *Fusarium* qui doivent clairement être complétées par d'autres essais.

Concernant les acides phénoliques en tant que molécules candidates, nos résultats montrant clairement une action inhibitrice de certains acides phénoliques sur la toxino-genèse de *Fusarium*, quelle que soit la concentration testée ou la souche utilisée. Le tableau 17 présente le bilan des effets des acides phénoliques individuels observés sur la production des TCT B par les souches de *Fusarium* INRA 117, INRA 233 et INRA 124 (chémo-type DON/ADON) et par les souches INRA 319, INRA 130 et INRA 132 (chémo-type NIV/FX). Une case rouge représente un effet inhibiteur, une case verte un effet activateur et une case blanche un effet non significatif. Les acides sinapique, caféique, *p*-coumarique et férulique ont un effet inhibiteur de la mycotoxinogenèse des six souches de *F. culmorum* considérées. L'acide syringique inhibe la toxino-genèse de cinq souches et est sans effet pour une souche. Ce pouvoir inhibiteur pourrait être relié à leur structure chimique et à leur lipophilicité. Par contre, l'effet des acides *p*-OH benzoïque, gallique, vanillique et protocatéchuïque sur la mycotoxinogenèse des six souches est moins évident. Il semble que l'acide protocatéchuïque a un effet activateur ou est sans effet significatif pour les six souches considérées. Les acides



## CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

*p*-OH benzoïque et vanillique sont activateurs ou sans effet significatif pour cinq souches et ils sont inhibiteurs pour une souche. L'acide gallique est activateur ou sans effet significatif pour quatre souches et il est inhibiteur pour deux souches. Ces effets opposés (inhibiteur ou activateur) d'un composé sur différentes souches ont déjà été observés. Par exemple, Passone *et al.* (2005) ont observé que certaines souches d'*Aspergillus* de leur étude étaient résistantes au BHT, un composé antioxydant, et pouvait même produire des niveaux plus importants d'aflatoxines en présence d'antioxydants alors que d'autres souches étaient très sensibles à l'inhibition par le BHT. De plus, nos résultats montrent que l'intensité des effets modulateurs des acides phénoliques serait souche dépendante.

L'acide férulique, acide phénolique largement majoritaire dans les grains a clairement un effet inhibiteur de la biosynthèse des toxines en culture *in vitro*. De plus, nous montrons que l'intensité de l'effet augmente avec la concentration en acide férulique supplémentée aux cultures. De plus, un effet inhibiteur cumulatif a été observé lorsque les cultures de *Fusarium* sont supplémentées deux fois de suite par l'acide férulique. Les contenus en acide férulique variant en fonction des variétés de blé dur et ces contenus pouvant également augmenter progressivement lors de l'infection par la libération d'acides phénoliques des parois (Bily, 2003), il est alors possible d'émettre l'hypothèse que les différences de concentrations en acide férulique ainsi que leur accumulation progressive sur le site de l'infection pourraient expliquer les différences de niveaux de TCT B accumulés dans les grains en fonction des variétés.

*In planta*, quelle est la disponibilité en acides phénoliques dans les grains ? Afin de répondre à cette question, nous avons analysé le contenu en acides phénoliques au cours de la cinétique de remplissage des grains. Il apparaît que les acides phénoliques sont présents très tôt dans les grains, ceux-ci pourraient donc avoir un effet sur la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. Nos résultats suggèrent une synthèse ou une libération des acides phénoliques des parois en réponse à l'infection. Cependant, nous ne pouvons pas conclure quant à l'implication de ces acides phénoliques dans la résistance à l'accumulation de mycotoxines. Nous préconisons pour des études futures de comparer les contenus en acides phénoliques de variétés résistantes et sensibles au cours de la cinétique (jour après jour) de remplissage des grains en réponse à l'infection.

Dans les grains de blé, les acides phénoliques solubles (libres + estérifiés + glycosylés) sont présents à des concentrations de l'ordre de 80 µg/g (Kim *et al.*, 2006). D'après nos résultats obtenus *in vitro*, des concentrations de l'ordre de 80 à 100 µg/mL en acides phénoliques modulent la toxinogénèse. Les concentrations en acides phénoliques ayant un



CHAPITRE II : Etude de molécules candidates, présentes dans les sons de blé dur, potentiellement modulatrices *in vitro* de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*

effet modulateur *in vitro* de la toxinogénèse sont représentatives des concentrations en acides phénoliques solubles existantes dans les grains de blé. Par conséquent, il est tout à fait possible que les acides phénoliques solubles des grains aient une activité modulatrice de la toxinogénèse de *Fusarium in planta*.





## **CHAPITRE III :**

### **Etude *in vitro* de l'effet d'extraits naturels d'acides phénoliques, issus des sons de blé dur, sur la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium***

**Tableau 18 : Contenu en acides phénoliques solubles libres des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer.**

acides phenoliques solubles libres	Contenu ( $\mu\text{g/g MS}$ )	
	Orjaune	Nefer
acide férulique	3,94	2,00
acide <i>p</i> -coumarique	0,49	0,18
acide sinapique	0,42	0,15
acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	1,28	0,45
acide vanillique	3,51	1,65
acides phenoliques solubles libres totaux	9,63	4,45

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les acides phénoliques testés individuellement sont des molécules candidates capables de moduler la biosynthèse des toxines par *Fusarium*. Dans les grains, plusieurs acides phénoliques sont présents simultanément et à des concentrations différentes. De plus, les acides phénoliques existent sous une forme soluble ou sous une forme insoluble liée aux parois cellulaires. Les acides phénoliques sont majoritairement présents sous formes insolubles (McCallum et Walker, 1991). Au cours de l'interaction entre *Fusarium* et le blé, les acides phénoliques liés aux parois cellulaires pourraient être libérés progressivement et participer à l'interaction (Siranidou *et al.*, 2002). Au cours de l'infection, les acides phénoliques insolubles libérés des parois cellulaires pourraient interagir avec la toxinogénèse. Afin de se rapprocher de cette condition naturelle, nous avons étudié l'effet d'extraits naturels d'acides phénoliques insolubles liés aux parois isolés des sons de blé dur sur la biosynthèse des toxines par *Fusarium*. Dans un premier temps, les compositions en acides phénoliques de deux variétés de blé dur, les variétés Orjaune et Nefer, ont été analysées. Rappelons que la variété Orjaune est une variété qui accumule peu de mycotoxines par rapport à la variété Nefer qui est plus sensible à l'accumulation de mycotoxines.

### **III. 1. Composition des sons de blé dur en acides phénoliques**

#### **III. 1. 1. Contenu en acides phénoliques libres solubles des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer**

La composition en acides phénoliques libres solubles des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer est présentée dans le tableau 18. Les acides férulique, *p*-coumarique, sinapique, *p*-OH benzoïque et vanillique ont été identifiés dans les sons des deux variétés. Les acides férulique et vanillique sont les acides phénoliques libres solubles majoritaires des sons de blé dur de ces deux variétés. Ceci est en accord avec les résultats de Kim *et al.* (2006). Des différences de concentration en acides phénoliques existent entre les deux variétés. Les sons de la variété Orjaune contiennent deux fois plus d'acide férulique, 2,7 fois plus d'acide *p*-coumarique, 2,8 fois plus d'acide sinapique et d'acide *p*-OH benzoïque et 2,1 fois plus d'acide vanillique que les sons de la variété Nefer. Globalement, le contenu en acides phénoliques libres solubles est 2,2 fois plus important dans les sons de la variété Orjaune (9,6 µg/g) que

**Tableau 19 : Contenu en acides phénoliques insolubles liés des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer.**

acides phenoliques liés	Contenu ( $\mu\text{g/g MS}$ )	
	Orjaune	Nefer
acide férulique	3057	1612
acide <i>p</i> -coumarique	57	44
acide sinapique	29	28
acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	5	4
acide vanillique	13	12
acides phenoliques liés totaux	3161	1699

dans les sons de la variété Nefer (4,5 µg/g). A titre de comparaison, Kim *et al.* (2006) ont trouvé des teneurs de 3,9 µg/g en acides phénoliques libres solubles dans les sons de blé dur commerciaux.

### **III. 1. 2. Contenu en acides phénoliques insolubles liés des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer**

La composition en acides phénoliques insolubles liés aux parois des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer est présentée dans le tableau 19. Il est à noter que les concentrations en acides phénoliques insolubles liés est environ 300 fois supérieures que les concentration en acides phénoliques solubles pour deux variétés de l'étude. Les acides férulique, *p*-coumarique, sinapique, *p*-OH benzoïque et vanillique ont été identifiés dans les sons des deux variétés. L'acide férulique est l'acide phénolique largement majoritaire dans les sons des deux variétés. Dans les sons de la variété Orjaune, l'acide férulique a des teneurs 54 fois plus importante que les teneurs en acide *p*-coumarique. Dans les sons de la variété Nefer, elles sont 37 fois plus importantes. Ce résultat est en accord avec différents travaux qui ont rapporté que l'acide férulique était l'acide phénolique insoluble lié majoritaire dans les sons de blé dur (Zhou *et al.*, 2004 ; Parker *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2006 ; Mpofo *et al.*, 2006). Des différences de concentration en acide férulique existent, la variété Orjaune en contenant environ deux fois plus que la variété Nefer. Concernant les autres acides phénoliques, les concentrations sont semblables entre les deux variétés. Globalement, la concentration en acides phénoliques insolubles liés est de 3161 µg/g dans les sons de la variété Orjaune et de 1699 µg/g dans les sons de la variété Nefer. A titre de comparaison, Kim *et al.* (2006) rapportent des concentrations totales en acides phénoliques insolubles liés de l'ordre de 2027 µg/g dans les sons de blé dur commerciaux.



### III. 2. Effet d'extraits naturels d'acides phénoliques des sons de blé dur sur la mycotoxinogénèse

Article soumis à *Applied and Environmental Microbiology* (Octobre 2007)

#### **Phenolic acids naturally occurring in wheat bran are strong inhibitors of type B trichothecenes biosynthesis and *Tri* genes expression in *Fusarium* liquid cultures**

Anne-Laure Boutigny,<sup>1,2,\*</sup> Vessela Atanassova-Pénichon,<sup>2</sup> Christian Barreau,<sup>2</sup> and Florence Richard-Forget,<sup>2,\*</sup>

Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales, 66 rue La Boétie, Paris 75008, France<sup>1</sup>  
and Institut National de la Recherche Agronomique, UPR1264 Mycology and Food Safety, 71 avenue Edouard Bourleaux BP81, Villenave d'Ornon 33883, France<sup>2</sup>

#### **RESUME**

Cette étude entreprend l'inhibition de la production des mycotoxines de *Fusarium* par les acides phénoliques naturellement présents dans les sons de blé dur. La composition d'un extrait naturel d'acides phénoliques isolé des sons de blé dur a été analysée. Les acides férulique, sinapique, *p*-coumarique, vanillique et *p*-hydroxybenzoïque ont été identifiés ; l'acide férulique étant largement majoritaire. De plus, diverses formes oligomériques de l'acide férulique, et en particulier des formes dimériques, ont également été détectées. Lorsque des cultures liquides de *F. culmorum* sont supplémentées par cet extrait naturel, la production de trichothécènes B est totalement inhibée. L'effet sur la mycotoxinogénèse de la co-existence des formes monomériques et oligomériques dans cet extrait naturel a été entrepris. Un mélange reconstitué d'acides phénoliques a alors été préparé, en mélangeant des poudres commerciales, de façon à obtenir la même composition qualitative et quantitative en monomères d'acides phénoliques que l'extrait naturel. L'efficacité inhibitrice de ce mélange reconstitué a été comparée à celle de l'extrait naturel. Quel que soit la souche utilisée et la





concentration en extrait testée, l'extrait naturel d'acides phénoliques est toujours le plus efficace pour l'inhibition de la toxinogénèse. Ces résultats suggèrent que les formes monomériques d'acides phénoliques présentes dans l'extrait naturel sont des inhibiteurs efficaces de la production de mycotoxines mais que la présence des formes oligomériques de l'acide férulique rend l'inhibition encore plus efficace. Le mécanisme par lequel l'extrait naturel d'acides phénoliques inhibe la synthèse des toxines n'est pas connu mais l'inhibition semble résulter en partie d'une réduction très importante du niveau d'expression de divers gènes *Tri* impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes B.

### ABSTRACT

This research investigates the inhibition of *Fusarium* mycotoxins production by phenolic acids naturally occurring in bran from durum wheat. The composition of an extract of phenolic acids from bran was analysed. The occurrence of ferulic, sinapic, *p*-coumaric, vanillic and *p*-hydroxybenzoic acids is observed, with ferulic acid being the most abundant. In addition, various oligomeric forms of ferulic acid, and especially dimeric forms, are also detected. When liquid culture of *Fusarium culmorum* were supplemented with this natural extract, type B trichothecenes production was fully inhibited. The effect on toxin synthesis of co-occurrence in the natural extract of both monomeric and oligomeric forms of phenolics was investigated. A reconstituted mixture was generated by pooling commercial preparations of phenolic acids to get the same monomeric composition than the natural extract and the inhibitory efficiency of this reconstituted mixture was compared to that of the natural extract. Whatever the strain used and the concentration tested, the natural extract of phenolic acids is always the most effective for toxin inhibition. These results suggest that monomeric forms of phenolic acids contained in the natural extract are efficient inhibitors but that the presence of oligomeric forms of ferulic acid renders inhibition of the natural extract even more effective. The mechanism by which the natural extract of phenolic acids inhibits the toxin synthesis is not known but inhibition seems to result at least in a great part from a drastic reduction in the level of expression of various *Tri* genes involved in the type B trichothecenes biosynthesis pathway.

**Keywords:** mycotoxin; *Fusarium*; phenolic acids; diferulic acid, *Tri* genes, regulation



## INTRODUCTION

Wheat, one of the most important agricultural crops, is subject to *Fusarium* Head Blight (FHB) leading to significant yields reductions and mycotoxins contaminations of the remaining grains (20). *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* are major species associated to FBH and leading to mycotoxin contamination of cereals (20, 10). Both species produce type B trichothecenes (TCT B), including deoxynivalenol (DON), acetyldeoxynivalenol (ADON), nivalenol (NIV) and fusarenone X (FX). Type B trichothecenes are heat-stable molecules and are not fully eliminated during the processes currently used in food manufacture (21). The toxicity of type B trichothecenes on animals and humans is now well documented (7, 16) and it is of great concern to reduce trichothecenes occurrence in cereals and derived products.

Presently, the best way to prevent mycotoxins occurrence in kernels is to limit their biosynthesis by the fungus during cultivation of the crop (12, 15). It was observed that some durum wheat varieties could naturally limit type B trichothecenes accumulation presumably due to a particular biochemical composition of their kernels (19). Phenolic acids contained in bran were suspected to have an inhibitory effect on trichothecenes biosynthesis (37). Several *in vitro* experiments reported an inhibitory effect of various individual phenolic acids on mycotoxins production, including aflatoxin production by *Aspergillus* (44), fumonisin production by *F. verticillioides* (6) and type B trichothecenes production by *F. graminearum* and *F. culmorum* (8, Boutigny *et al.*, submitted for publication). Various phenolic acids are present simultaneously and at different amounts in wheat bran. They are also observed in different forms such as soluble forms and insoluble forms bound to cell walls (25). It could be worthwhile to investigate the effect of these different phenolic compounds contained in bran on trichothecenes biosynthesis by *Fusarium* and to identify the mechanism by which the inhibition occurs.

Most of the *Tri* genes involved in the type B trichothecenes biosynthesis pathway have been identified (11, 14, 27), allowing studies of their transcriptional expression in relation to the level of toxin production (39, Boutigny *et al.*, submitted for publication). The first steps of the type B trichothecenes biosynthesis pathway are catalysed by a trichodiene synthase encoded by the *Tri5* gene (22), a multifunctional cytochrome P450 mono-oxygenase encoded by *Tri4* gene (23, 29, 47) and a C-15 hydroxylase encoded by *Tri11* (2). Expression of these genes can be representative of the initial flux of the biosynthetic pathway. Then, an



acetyltransferase encoded by *Tri101*, a noncluster gene, catalyses the acetylation of trichothecenes (26). The *Tri12* gene encodes a trichothecene efflux pump allowing type B trichothecenes export (3, 50). These two last genes play a role in self protection against trichothecenes and can be limiting steps in the biosynthetic pathway. Genes *Tri6* (41, 24) and *Tri10* (45, 34) encode the two positive regulators that control other *Tri* genes expression. Expression of all these genes can be compared to expression of the *Fpps* gene from mevalonate pathway which encodes the farnesyl pyrophosphate synthase that generates farnesyl pyrophosphate (FPP), the precursor of the toxin biosynthesis pathway.

This study aims at evaluating *in vitro* the effect of phenolic acids naturally occurring in wheat bran on trichothecenes accumulation by *Fusarium culmorum*. The efficiency of the natural extract to inhibit biosynthesis of the toxin by *Fusarium* was compared to the effect of a mixture of phenolic acids reconstituted with commercial powders. It is also shown for the first time that a natural extract of phenolic acids from wheat supplemented to *Fusarium* liquid cultures strongly reduces the level of expression of various *Tri* genes involved in the toxin biosynthesis pathway.

## MATERIALS AND METHODS

**Wheat samples.** The durum wheat of Orjaune variety (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) was used for this study. Bran fractions were provided by the "Grande Semoulerie de l'Ouest" (GSO, Angoulême, France).

***Fusarium culmorum* strains.** The *F. culmorum* INRA 117 and INRA 319 strains were used in this study. The INRA 117 strain was provided by Quirico Migheli (University of Sassari, Italy) and the INRA 319 strain was from the INRA-MycSA laboratory collection. In liquid cultures, the INRA 117 strain predominantly produces 3-ADON, and to a lesser extent DON (DON/ADON chemotype) while the INRA 319 strain predominantly produces FX and to a lesser extent NIV (NIV/FX chemotype). The *Fusarium* strains were grown on PDA slants at 25°C for eight days and spores suspensions were prepared by adding sterile distilled water to the PDA slants with gentle shaking.

**Medium and culture conditions.** Liquid-culture experiments were performed in a Mycotoxin Synthetic medium (MS medium) (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 g/L; MgSO<sub>4</sub>, 0.017 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L; glucose, 20 g/L; biotine, 0.1 mg/L and 0.1 mL/L Vogel mineral salts solution (49)). Cultures were done in triplicate. Sterile Petri dishes (Ø 55 mm) containing 8 mL of MS medium supplemented or not with phenolic acids extracts were inoculated with



spore suspensions to achieve a final concentration of  $10^4$  spores/mL. Fungal liquid cultures were incubated in the dark at 25°C. Following incubation, the culture medium was removed by centrifugation and stored at -20°C until analysis for type B trichothecenes content while the mycelium was stored at -80°C. Mycelia were used either for RNA extractions or were lyophilised in order to quantify the fungal biomass production.

A mixture of phenolic acids was reconstituted using commercial powders to get the same qualitative and quantitative composition in monomeric forms of phenolic acids that the natural extract isolated from wheat bran. The correct composition of this reconstituted mixture was verified using HPLC-DAD. Liquid cultures of *F. culmorum* (INRA 117 and INRA 319 strains) were supplemented or not before fungal inoculation either with the natural extract of phenolic acids or with the reconstituted mixture to achieve final concentrations of either 0.5 mM or 0.1 mM ferulic acid. Their effect on type B trichothecenes accumulation was analysed after ten days of culture. It was previously checked that initial pH of the culture medium was not affected by addition of the phenolic acids extracts compared to control.

**HPLC analysis of type B trichothecenes.** A 4 mL of culture medium were extracted with 8 mL of ethyl acetate. 6 mL of the organic phase were evaporated to dryness at 70°C under a nitrogen flux. Dried samples were dissolved in 200 µL of methanol/water (1:1, v/v) before analysis using HPLC-DAD (9). HPLC analysis were carried out using an Agilent Technologies 1100 series liquid chromatograph equipped with an auto sampler system, an Agilent photodiode array detector (DAD) and the ChemStation chromatography manager software (Agilent, Waldbronn, Germany). Quantification was performed by using external calibration with NIV, DON, FX, 15-ADON and 3-ADON standards solutions prepared from commercial pure powders purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

**Extraction of phenolic acids.** Phenolic acids were released from cell walls by an alkaline hydrolysis. In brief, milled bran samples (15 g) were shaken for 4 h in 600 mL of sodium hydroxide (2 M). Filtrates were acidified to pH 2 with hydrochloric acid (12 M). Samples were extracted with 600 mL of ethyl acetate. After centrifugation (4500 x g), the ethyl acetate fractions were collected and evaporated to dryness using a rotavapor (BÜCHI Rotavapor R-200). Finally, dried samples were dissolved in 400 µL of methanol before analysis using HPLC.

**HPLC-DAD analysis of phenolic acids.** HPLC separation was accomplished according to a previously described procedure (25) with modifications. Separation of phenolic acids was achieved on a ZORBAX SB-C18 column (5 µm; 250 mm x 4.6 mm) (Agilent, Palo Alto, USA) maintained at 30°C. The mobile phase consisted of 2% formic acid in water (v/v)

TABLE 1

Primer pairs used to amplify *Ef2*, *Tri4*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* and *Fpps* genes by RT-PCR.

Gene	Sequence forwards (5'-3')	Sequence reverse (5'-3')	Tm (°C)	Accession No.
<i>Ef2</i>	Ef2-F CTGTGTTCTTACCATGAC	Ef2-R CAACAGGTTAGCACCA	58	FG12849
<i>Tri4</i>	Tri4-F* TATTGTTGGCTACCCAAGG	Tri4-R* TGTCAGATGCGCCTTACAAA	58	FG03535
<i>Tri5</i>	Tri5-F GACCCTAAGCGACTACAG	Tri5-R GTGCTACGGATAAGGTTC	58	FG03537
<i>Tri11</i>	Tri11-F AGCCGTCTACTTCCTATG	Tri11-R ACTACTGAAACGCGCA	60	FG03540
<i>Tri12</i>	Tri12-F ATTCGGTACATGGGCT	Tri12-R GCAGTGCTGTTCGTCA	57	FG12013
<i>Tri101</i>	Tri101-F <sup>a</sup> AGGGCATTAGCGAGGGAAACACA	Tri101-R <sup>a</sup> ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC	59	AB011417
<i>Tri6</i>	Tri6-F <sup>a</sup> AGCGCCTTGCCCTCTTTG	Tri6-R <sup>a</sup> AGCCTTTGGTGCCGACTTCTTG	58	FG03536
<i>Tri10</i>	Tri10-F <sup>a</sup> TCTGAACAGGCGATGGTATGGA	Tri10-R <sup>a</sup> CTGCGGCGAGTGAGTTTGACA	58	FG03538
<i>Fpps</i>	Fpps-F CATGATCGCCATTAACGAC	Fpps-R CAATGTGTTCCGGGCTT	57	FG06784

Primer pairs used to amplify *Ef2*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri12* and *Fpps* were designed in our laboratory using the LightCycler Probe Design Software Version 1.0 (Roche).

\* Ponts (2005)



(solvent A) and acetonitrile (solvent B). The flow rate was kept at 1 mL/min for a total run time of 75 min. Phenolic acids were separated by a gradient elution as follows: 5-15% B in 30 min, 15-50% B in 20 min, 50-90% B in 8 min, 90% B for 5 min, 90-5% B in 2 min, and 5% B for 10 min post-run reconditioning. The injection volume was set on 5  $\mu$ L. The UV-VIS spectra were recorded from 200 to 550 nm and peak areas were measured at 260 nm, 280 nm and 320 nm according to the phenolic acid studied. Quantification was performed by using external calibrations with phenolic acids standards solutions prepared from commercial pure powders (gallic acid, protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, trans ferulic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid and sinapic acid) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

**HPLC-MS analysis of phenolic acids.** HPLC-MS analysis were performed using a QTrap 2000 LC/MS/MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a TurboIonSpray ESI source and a 1100 Series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany). Chromatographic separation was achieved as previously described with some modifications. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (v/v) (solvent A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (v/v) (solvent B). The flow rate was kept at 1 mL/min and was split after UV detection so that 0.25 mL/min went to the electrospray source. The injection volume was set on 10  $\mu$ L. Detection was monitored at 280 nm. The electrospray interface was used in the negative ion mode at 400°C with the following settings: curtain gas, 25 p.s.i.; nebulizer gas, 35 p.s.i.; auxiliary gas, 65 p.s.i.; ion spray voltage, -4200 V; declustering potential, -30 V; entrance potential, -10 V; collision energy, -30 eV; collision-activated dissociation gas, high.

**Extraction of total RNA and preparation of cDNA.** Frozen mycelium (50 mg) was ground in 1 mL of TRIzol® Reagent (Invitrogen) with the TissueLyser System® (Qiagen). Total RNA was extracted following the TRIzol® Reagent manufacturer's instructions. The quality of the prepared RNA was assessed by agarose gel electrophoresis. The RNA samples were quantified by absorbance measurements at 260 nm. Total RNA (5  $\mu$ g) was reverse-transcribed using the SuperScript™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen).

**PCR analysis.** Classic PCR analyses were performed using the iCycler™ thermal cycling (Bio-Rad). All PCR were conducted in 25  $\mu$ L reaction mixtures containing 1  $\mu$ L of each cDNA sample (corresponding to 10 ng of total RNA), 2.5 U GoTaq® DNA polymerase (Promega), 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM of each dNTP, and 0.5  $\mu$ M of each primer. The primer pairs used and annealing temperatures are given in Table 1. PCR amplification was realized



using 28 cycles. Amplification products were separated by electrophoresis through 1.5% agarose gel.

Real time PCR analyses were performed using a LightCycler<sup>®</sup> 2.0 system and the LightCycler Software 3.5.3 (Roche). Abundance of the transcripts of the genes *Ef2*, *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* and *Fpps* was evaluated in 2  $\mu$ L of each cDNA (corresponding to 10 ng of total RNA) in a final reaction volume of 10  $\mu$ L using the QuantiTect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit (Qiagen). MgCl<sub>2</sub> was supplemented to the PCR mix to achieve a final concentration of 4 mM. The primers were used at the final concentration of 1  $\mu$ M (Table 1). Analyses were performed in triplicate. The expression of the *Ef2* elongation factor was used as an endogenous reference. Real time PCR amplification was realized using 45 cycles according to the thermal cycling conditions recommended by the kit manufacturer. In order to determine PCR efficiencies, a standard cDNA mixture was prepared by mixing a fraction of each cDNA sample. A range of four log dilutions was prepared from the standard mixture. For each gene, PCR efficiency (*E*) was determined with the serial dilutions as described previously (39). The PCR efficiencies obtained were 1.95 for *Ef2*, 1.93 for *Tri5*, 1.96 for *Tri4*, 1.87 for *Tri11*, 1.93 for *Tri101*, 2.02 for *Tri6*, 1.82 for *Tri10*, 2.02 for *Fpps*. All our cDNA samples were tested for residual genomic DNA (39). The absence of non-specific PCR amplification products or primer dimers formation was checked by running both melting curves and agarose gel analyses on the final PCR products.

**Real-time PCR data analysis.** The crossing point values (*C<sub>p</sub>*) experimentally measured (the mean value of three replicates) obtained for *Ef2* were compared in order to verify the stability of *Ef2* expression under the treatment. The *C<sub>p</sub>* values experimentally measured obtained for our target *Tri* genes and *Fpps* gene were compared in control and treated conditions and normalized relative to the *C<sub>p</sub>* values obtained for the reference gene *Ef2* using the REST<sup>®</sup> software REST-384 (Relative Expression Software Tool). The mathematical model used takes into account differences for efficiencies between the reference gene and the target gene and the mean crossing point deviation between the control and the treated condition (35, 36). The expression levels of the target genes, normalized by the reference gene expression, were expressed as regulation factor in the treated condition relative to the control condition, with the ratio =  $(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control-treated})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control-treated})}$ . The expression ratio results are tested for significance by running Pair Wise Reallocation Randomisation Test<sup>©</sup> with a p value of 0.001 using the REST<sup>®</sup> software REST-384 (35, 36).

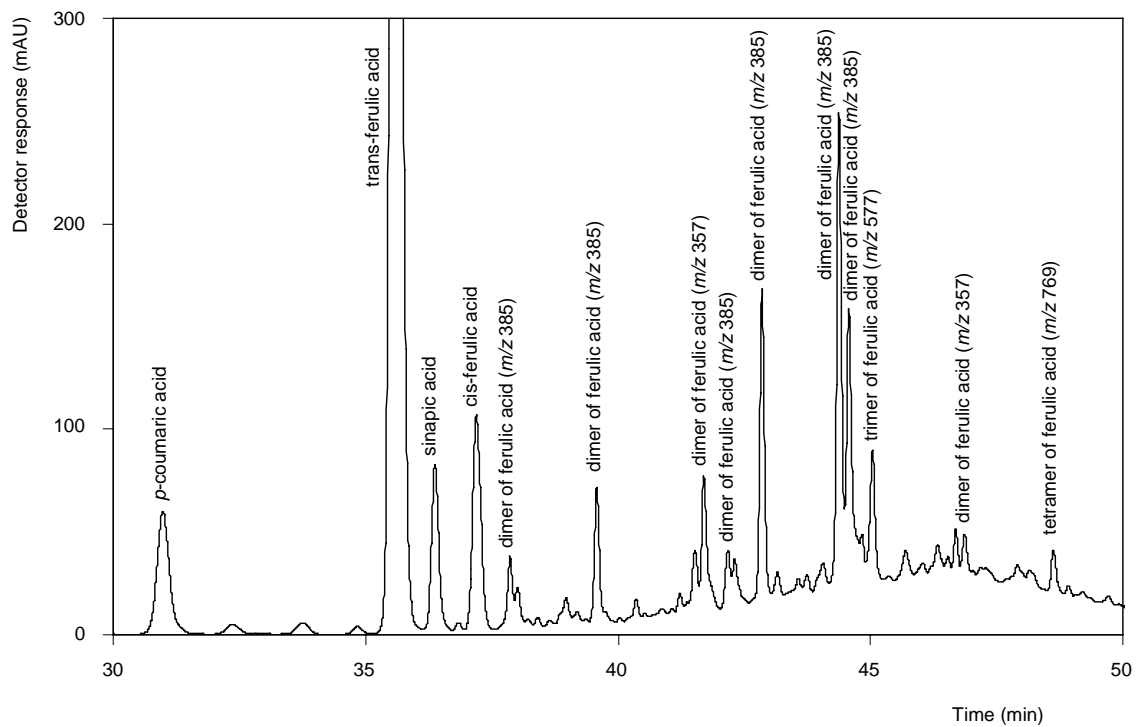


FIG. 1. HPLC elution profile of the natural extract of phenolic acid released from cell walls of wheat bran from Orjaune variety. Peaks were detected at 280 nm.

TABLE 2

*In vitro* effect of natural extract and reconstituted mixture of phenolic acids, at 0.5 mM or 0.1 mM in ferulic acid, on TCT B production by the INRA 117 and INRA 319 strains of *F. culmorum*.

Supplementation	Ferulic acid (mM)	TCT B yields (% inhibition)	
		INRA 117	INRA 319
Natural extract	0,5	100	100
Reconstituted mixture	0,5	79	13
Natural extract	0,1	68	85
Reconstituted mixture	0,1	21	14

The natural extract of phenolic acids was obtained from bran wheat of the Orjaune variety. TCT B yields were analysed after 10 days of culture. TCT B yields are expressed as % of inhibition in treated cultures compared to control cultures.

## RESULTS

### **Phenolic acids composition of the natural extract from bran of Orjaune durum wheat.**

The natural extract of phenolic acids was analysed for its composition (Fig. 1). Monomeric forms of phenolic acids were identified and quantified using HPLC-DAD on the basis of their retention time and their UV spectra. Ferulic acid (1007 µg/g of bran), sinapic acid (73 µg/g of bran), *p*-coumaric acid (34 µg/g of bran), vanillic acid (13 µg/g of bran) and *p*-hydroxy benzoic acid (7 µg/g of bran) were detected in the natural extract. Ferulic acid was the most abundant phenolic acid (89%), as also reported by several authors (30, 31, 25). The HPLC-MS analysis revealed the presence of trans-ferulic acid and cis-ferulic acid forms, with the trans-form being predominant. In addition to the monomeric forms of phenolic acids, several oligomeric forms were observed in this extract. Using HPLC-MS, peaks were assigned to ferulic acid oligomers on the basis of their UV spectra and their mass spectra. Dimers ( $m/z$  385 or  $m/z$  357), trimers ( $m/z$  577) and tetramers ( $m/z$  769) of ferulic acid were detected in the extract. The dimeric forms of ferulic acid were the most abundant.

### **The natural extract and the reconstituted mixture of phenolic acids differentially reduce type B trichothecenes production by *F. culmorum* *in vitro*.**

We previously showed that ferulic acid inhibits trichothecenes biosynthesis by *Fusarium in vitro* (Boutigny *et al.*, submitted for publication). In order to investigate the effect on mycotoxinogenesis of the co-occurrence of both monomeric forms and oligomeric forms of phenolic acids present in the natural extract, we compared the inhibitory efficiency of this natural extract with that of a reconstituted mixture containing only monomeric forms. These two preparations were tested *in vitro*, at final concentrations corresponding to 0.1 and 0.5 mM ferulic acid, for their effect on type B trichothecenes production by two strains (INRA 117 and INRA 319) of *F. culmorum* (Table 2). These two strains produce DON/ADON and NIV/FX respectively. Liquid cultures supplementation with both phenolic acids preparations does not affect fungal biomass production compared to control cultures (data not shown). At a concentration corresponding to 0.1 mM ferulic acid, the natural extract reduces type B trichothecenes yields by 68% for the INRA 117 strain and by 83% for the INRA 319 strain. At a concentration corresponding to 0.5 mM ferulic acid equivalents, it fully inhibits type B trichothecenes production of both strains. Whatever the concentration tested and the strains used, the reconstituted mixture also decreases type B trichothecenes yields, but always with a lower efficiency than that of the natural extract. At 0.1 mM ferulic acid equivalents, it reduces type

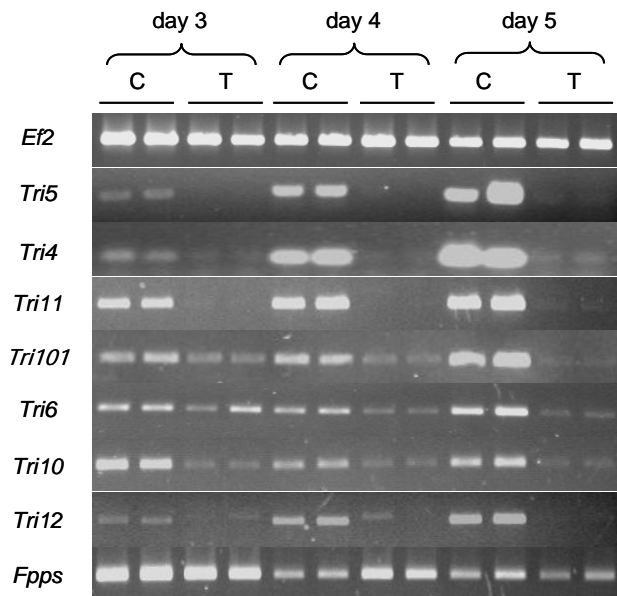


FIG. 2. Amplification products for *Ef2*, *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* and *Fpps* obtained after RT PCR using cDNA from *F. culmorum* (INRA 117 strain) grown for 3 days, 4 days and 5 days in liquid cultures supplemented or not with natural extract of phenolic acids from bran of Orjaune variety.

Two replicates were made for each condition. C: control cultures, T: treated cultures supplemented with the natural extract of phenolic acids at 0.5 mM in ferulic acid.

B trichothecenes yields by only 21% and 14% for INRA 117 and the INRA 319 strains respectively. At 0.5 mM ferulic acid equivalents, the reconstituted mixture reduces type B trichothecenes yields up to 79% for the INRA 117 strain but only by 13% for the INRA 319 strain. The total inhibitory effect of the natural extract from bran of the Orjaune variety on toxin production by the INRA 117 strain has been obtained with three biological repetitions. It has also been observed with an extract from another variety of durum wheat (data not shown). These results suggest that oligomeric forms of ferulic acid present in the natural extract, and especially dimeric forms which are the most abundant, are responsible for the greatest effectiveness of the inhibition of type B trichothecenes production observed when compared to the reconstituted mixture.

**The natural extract of phenolic acids strongly reduces expression of *Tri* genes from the *F. culmorum* INRA 117 strain in liquid cultures.** In order to investigate the effect of the natural phenolic acids extract on type B trichothecenes biosynthesis, we analysed the expression of several genes (*Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* and *Fpps*) involved in the type B trichothecenes biosynthesis pathway. Experiments were first performed by classic reverse transcription followed by a 28 cycles PCR, using RNA extracted from three, four and five days old mycelium from cultures of *F. culmorum* INRA 117 strain supplemented or not with the natural extract of phenolic acids at 0.5 mM ferulic acid equivalents (Fig. 2). In these conditions, the expression of the *Ef2* reference gene seems to be constant under the time and the conditions of treatment. In control cultures, all target genes are expressed at day three, a moment when type B trichothecenes start to accumulate in the culture medium. Then, the expression level of *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101* and *Tri12* genes seems to increase with time in control cultures. *Tri6* seems to be expressed at the same level at day three, day four and day five while the expression of *Tri10* seems to be greater at day three and then decreases later on. In cultures treated with natural phenolic acids, it is clear that expression of all the *Tri* genes is strongly decreased compared to control cultures at any day of the experiment. Only the expression of *Fpps* gene seems to be constant at day three and day five and activated at day four in treated culture. Next, in order to quantify this effect at the transcriptional level, the expression of *Ef2*, *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri101*, *Tri6*, *Tri10* and *Fpps* was analysed by real time PCR of reverse transcribed RNA at day three, day four and day five. The elongation factor *Ef2* gene was used as a reference gene. Analysis of the *Ef2* Cp values measured in control cultures and in supplemented cultures indicated that levels of *Ef2* transcripts were not significantly different ( $p=0.05$ ) under the treatment at day three, day four and day five. We compared the expression levels of our target genes in cultures supplemented

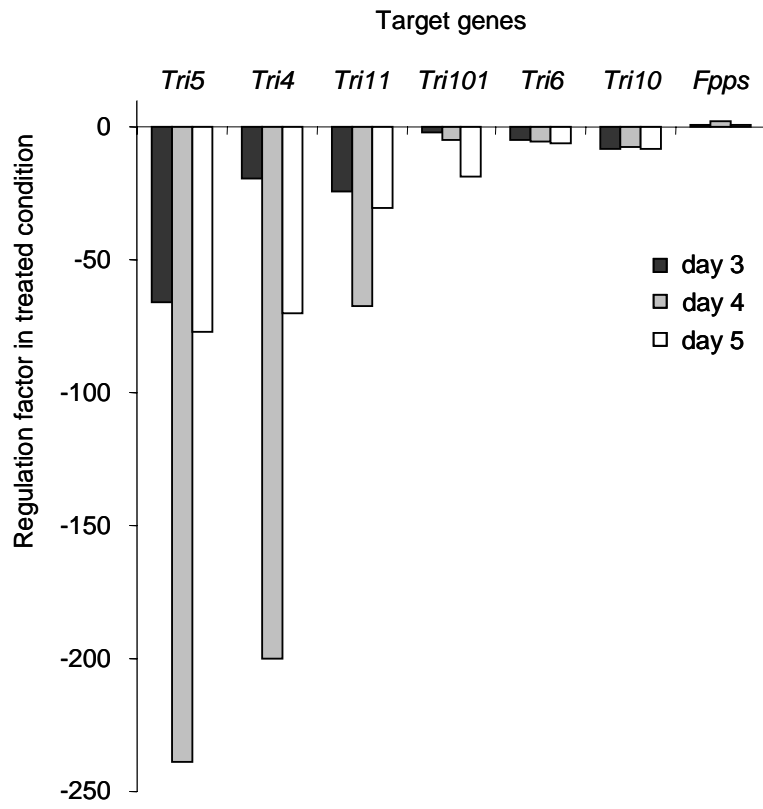


FIG. 3. Regulation factor obtained for the target genes in the phenolic acid supplemented culture relative to the control culture at day 3, day 4 and day 5, calculated with the REST software.



or not with the natural extract (Fig. 3). The expression values of the target *Tri* genes and the *Fpps* gene, normalized by the reference gene expression value, were expressed as up or down regulation factor in the treated condition relative to the control condition. First, expression of *Fpps*, the gene encoding the farnesyl pyrophosphate synthase, is slightly but significantly activated at day four ( $p=0.001$ ) and constant at day three and day five in treated cultures. By contrast, expression of all the studied *Tri* genes is significantly decreased ( $p=0.001$ ) by the treatment at all days studied. For *Tri5*, *Tri4* and *Tri11* genes, levels of expression are considerably decreased in the treated condition, particularly at day four (between 50 to 250 times), the moment when the toxin starts to accumulate in the medium of the control culture. At day three and day four, expression of *Tri101* is only slightly decreased in treated cultures. Decrease starts to be more important at day five. Surprisingly, expression of *Tri6* and *Tri10* genes is decreased but to a lower extent than other *Tri* genes. Expression of these genes is still clearly detectable at day four and day five (Fig. 2), meanwhile expression of *Tri5*, *Tri4* and *Tri11* seems residual.

## DISCUSSION

Our results show *in vitro* a strong inhibitory effect of phenolic acids naturally occurring in bran on the biosynthesis of type B trichothecenes by two *F. culmorum* strains. This result is in agreement with previous data reporting an *in vitro* inhibitory effect of natural phenolic acids extracted from maize germ on type B trichothecenes production by *F. graminearum* (4). Natural phenolic acids extracted from the pellicle of walnut (28) or from olive callus tissues (33) have also been shown to have an inhibitory effect on aflatoxin production by *Aspergillus*. Phenolic acids are known to have strong antioxidant properties (43). Wheat bran extract, having high concentration of phenolic acids, was characterized by a higher antioxidant activity than other fractions of wheat (30). Trichothecenes are synthesized from trichodiene by a series of oxygenations (13). Therefore, changes in the oxidative parameters of the medium could interfere with the fungal secondary metabolism and modulate the levels of trichothecenes production (38). Recent *in vitro* experiments suggested that plant metabolites with pro-oxidant properties have a strong activating effect on type B trichothecenes biosynthesis by *F. graminearum* (40) and that suppressing the oxidant molecule from the medium strongly decreases synthesis of the toxin (39). Moreover, other studies showed inhibitory effects of various antioxidants compounds on fumonisin production by *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (17, 42, 48) or on aflatoxin production by *Aspergillus* (46,



32). It has been suggested (1) that antioxidant may act at the cell membrane, by eliminating the pH component of the proton active force and affecting energy transduction and substrate transport by alteration of cell membrane permeability. By perturbing the membrane function, antioxidant compounds could indirectly interfere with the secondary metabolism of the fungus and thus modulate mycotoxins production.

The mechanisms by which phenolic acids extracted from wheat bran inhibit the biosynthesis of the toxin remain unclear but our results clearly show that the inhibition of toxin production is coincident with a clear decrease in the expression of various biosynthesis *Tri* genes. In treated cultures, the level of expression of the genes *Tri5*, *Tri4* and *Tri11* is drastically reduced. Expression of the non-cluster gene *Tri101* is also reduced but to a lower extent and the reduction occurs later. Although *Tri6* and *Tri10* have been shown to regulate the expression of the other *Tri* genes in the schematic regulatory model of the biosynthesis pathway (45, 34), we observed that expression of these regulatory genes was not so strongly reduced compared to the other *Tri* genes. Moreover, expression of the *Fpps* gene, controlling the synthesis of the farnesyl pyrophosphate used as substrate by trichodiene synthase encoded by *Tri5* gene, is not repressed although it has also been shown to be under the control of *Tri10*. According to these observations, we suggest that *Tri10* and *Tri6* are not the only factors that regulate *Tri* genes expression in our culture treated with natural phenolic acids extract from wheat bran. Regulation of aflatoxin and sterigmatocystin gene clusters in *Aspergillus* is under the control of specific transcription factors but is also modulated by more global regulatory factors that mediate environmental signals including carbon (CreA) and nitrogen (AreA) source, ambient temperature, light and pH (PacC) (51). We hypothesize that our target *Tri* gene could be under the control of more global regulators or of other unidentified transcription factors. We also cannot exclude at this stage that other mechanisms, including biochemical or post transcriptional regulations, could also participate in the reduction of toxin synthesis by the phenolic acids extract.

As the natural extract and the reconstituted mixture of phenolic acids differentially reduces type B trichothecenes production by *F. culmorum in vitro*, we suggest that oligomeric forms of ferulic acid, and especially dimeric forms of ferulic acid which are the most abundant in the extract, could be potent inhibitors of toxin biosynthesis. It would be of particular interest to purify each oligomeric form of ferulic acid from our natural extract and to test them independently for their effect on type B trichothecenes accumulation by *Fusarium*. In bran, phenolic acids are present in free soluble forms but they are mainly insoluble and bound to cell walls polysaccharides by ester linkages, with ferulic acid the



major phenolic acids (25). During infection with *Fusarium*, some esterified forms of phenolic acids could be released from cell walls by esterase and then participate to the interaction (18). It has been observed that incubation of wheat cell walls with ferulic acid esterase led to a release of diferulic acid (5). We suggest that oligomeric forms of ferulic acid released from cell walls during the attack could accumulate rapidly at the infection site and then interfere with trichothecenes biosynthesis. Difference in ester linked ferulic acids content in the bran cell wall could explain at least in part the differences in the susceptibility of some wheat varieties to toxin accumulation.

### ACKNOWLEDGMENT

This work is part of Anne-Laure Boutigny' PhD project financially supported by the IRTAC ("Institut de Recherches Technologiques Agroalimentaires des Céréales"), the ANRT ("Association Nationale de la Recherche Technique") and the "Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche" as a part of the National Integrated Research Project "RARE fusariotoxines 2003-2007".

### REFERENCES

1. **Adams, M. R., and M. O. Moss.** 1995. Food Microbiology. In The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
2. **Alexander, N. J., T. M. Hohn, and S. P. McCormick.** 1998. The *TRI11* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P-450 monooxygenase required for C-15 hydroxylation in trichothecene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:221-225.
3. **Alexander, N. J., S. P. McCormick, and T. M. Hohn.** 1999. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **261**:977-984.
4. **Bakan, B., A. C. Bily, D. Melcion, B. Cahagnier, C. Regnault-Roger, B. J. R. Philogene, and D. Richard-Molard.** 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.
5. **Bartolome, B., C. B. Faulds, P. A. Kroon, K. Waldron, H. J. Gilbert, G. Hazlewood, and G. Williamson.** 1997. An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* esterase (XylD) release a 5-5' ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:208-212.
6. **Beekrum, S., R. Govinden, T. Padayachee, and B. Odhav.** 2003. Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B<sub>1</sub>. *Food Addit. Contam.* **20**:490-493.
7. **Bennett, J. W., and M. Klich.** 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:497-516.



CHAPITRE III : Etude *in vitro* de l'effet d'extraits naturels d'acides phénoliques, issus des sons de blé dur, sur la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*.

---

8. **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. Ph.D. thesis. University of Pau, France.
9. **Bily, A. C., L. M. Reid, M. E. Savard, R. Reddy, B. A. Blackwell, C. M. Campbell, A. Krantis, T. Durst, B. J. R. Philogene, J. T. Arnason, and C. Regnault-Roger.** 2004. Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia* **157**:117-126.
10. **Bottalico, A., and G. Perrone.** 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**:611-624.
11. **Brown, D. W., R. B. Dyer, S. P. McCormick, D. F. Kendra, and R. D. Plattner.** 2004. Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* **41**:454-462.
12. **Champeil, A., T. Dore, and J. F. Fourbet.** 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 Sci.* **166**:1389-1415.
13. **Desjardins, A. E., T. M. Hohn, and S. P. McCormick.** 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiol. Rev.* **57**:595-604.
14. **Desjardins, A. E., and R. H. Proctor.** 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.*, in press. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024.
15. **Edwards, S. G.** 2004. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicol. Lett.* **153**:29-35.
16. **Eriksen, G. S.** 2003. Metabolism and toxicity of trichothecenes. Ph.D. thesis. University of Agraria, Sweden.
17. **Etcheverry, M., A. Torres, M. L. Ramirez, S. Chulze, and N. Magan.** 2002. *In vitro* control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *J. Appl. Microbiol.* **92**:624-632.
18. **Faulds, C. B., and G. Williamson.** 1995. Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:1082-1087.
19. **Favre, L., M. N. Verdal-Bonnin, L. Pinson-Gadais, P. Roumet, C. Barreau, and F. Richard-Forget.** 2004. Does biochemical composition of durum wheat kernels influence the trichothecenes B (TCT B) contamination levels? *In 2<sup>nd</sup> International Symposium on Fusarium Head Blight.*, Orlando, Florida, USA.
20. **Goswami, R. S., and H. C. Kistler.** 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* **5**:515-525.
21. **Hazel, C. M., and S. Patel.** 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol. Lett.* **153**:51-59.
22. **Hohn, T. M., A. E. Desjardins, and S. P. McCormick.** 1993b. Analysis of Tox5 gene expression in *Gibberella pulicaris* strains with different trichothecene production phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2359-2363.
23. **Hohn, T. M., A. E. Desjardins, and S. P. McCormick.** 1995. The Tri4 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **248**:95-102.
24. **Hohn, T. M., K. Roopa, and R. H. Proctor.** 1999. Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genet. Biol.* **26**:224-235.





CHAPITRE III : Etude *in vitro* de l'effet d'extraits naturels d'acides phénoliques, issus des sons de blé dur, sur la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*.

---

25. **Kim, K.-H., R. Tsao, R. Yang, and S. W. Cui.** 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.* **95**:466-473.
26. **Kimura, M., I. Kaneko, M. Komiyama, A. Takatsuki, H. Koshino, K. Yoneyama, and I. Yamaguchi.** 1998b. Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins - Cloning and characterization of *Tri101*. *J. Biol. Chem.* **273**:1654-1661.
27. **Kimura, M., T. Tokai, N. Takahashi-Ando, S. Ohsato, and M. Fujimura.** 2007. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**:2105-23.
28. **Mahoney, N., and R. J. Molyneux.** 2004. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *J. Agric. Food Chem.* **52**:1882-1889.
29. **McCormick, S. P., N. J. Alexander, and R. H. Proctor.** 2006. *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **52**:636-642.
30. **Onyeneho, S. N., and N. S. Hettiarachchy.** 1992. Antioxidant activity of durum wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* **40**:1496-1500.
31. **Parker, M. L., A. Ng, and K. W. Waldron.** 2005. The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *J. Sci. Food Agric.* **85**:2539-2547.
32. **Passone, M. A., S. L. Resnik, and M. G. Etcheverry.** 2005. *In vitro* effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B1 accumulation by peanut *Aspergillus* section Flavi. *J. Appl. Microbiol.* **99**:682-691.
33. **Paster, N., B. J. Juven, and H. Harshemesh.** 1988. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *J. Appl. Bacteriol.* **64**:293-297.
34. **Peplow, A. W., A. G. Tag, G. F. Garifullina, and M. N. Beremand.** 2003. Identification of new genes positively regulated by *Tri10* and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2731-2736.
35. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:2002-2007.
36. **Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, and L. Dempfle.** 2002. Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**:1-10.
37. **Pinson-Gadais, L., C. Barreau, M. Chaurand, S. Gregoire, M. Monmarson, and F. Richard-Forget.** 2007. Distribution of toxigenic *Fusarium spp.* and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. *Food Addit. Contam.* **24**:53-62.
38. **Ponts, N.** 2005. Influence de stress oxydatifs sur la biosynthèse de mycotoxines de *Fusarium spp.* contaminantes de l'épi de Maïs. Ph.D. thesis. University of Bordeaux, France.
39. **Ponts, N., L. Pinson-Gadais, C. Barreau, F. Richard-Forget, and T. Ouellet.** 2007. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Lett.* **581**:443-447.



CHAPITRE III : Etude *in vitro* de l'effet d'extraits naturels d'acides phénoliques, issus des sons de blé dur, sur la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*.

---

40. **Ponts, N., L. Pinson-Gadais, M. N. Verdal-Bonnin, C. Barreau, and F. Richard-Forget.** 2006. Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**:102-107.
41. **Proctor, R. H., T. M. Hohn, S. P. McCormick, and A. E. Desjardins.** 1995. *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1923-1930.
42. **Reynoso, M. M., A. M. Torres, M. L. Ramirez, M. I. Rodriguez, S. N. Chulze, and N. Magan.** 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.
43. **Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, and G. Paganga.** 1996. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**:933-956.
44. **Sinha, K. K., and S. Premkata.** 1981. Effect of some phenolics on aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus*. *Indian Phytopathology.* **34**:530-531.
45. **Tag, A. G., G. F. Garifullina, A. W. Peplow, C. Ake, T. D. Phillips, T. M. Hohn, and M. N. Beremand.** 2001. A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5294-5302.
46. **Thompson, D. P.** 1996. Effect of butylated hydroxyanisole on intracellular components of aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycol. Res.* **100**:1256-1258
47. **Tokai, T., H. Koshino, N. Takahashi-Ando, M. Sato, M. Fujimura, and M. Kimura.** 2007. *Fusarium Tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**:412-417.
48. **Torres, A. M., M. L. Ramirez, M. Arroyo, S. N. Chulze, and N. Magan.** 2003. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* **83**:319-324.
49. **Vogel, H. J.** 1956. A convenient growth medium for Neurospora (Medium N). *Microb. Genet. Bull.* **13**:42-43.
50. **Wuchiyama, J., M. Kimura, and I. Yamaguchi.** 2000. A trichothecene efflux pump encoded by *Tri102* in the biosynthetic gene cluster of *Fusarium graminearum*. *J. Antibiot.* **53**:196-200.
51. **Yu, J. H., and N. Keller.** 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:437-458.



### Commentaires additionnels sur la publication précédente

#### 1) L'extrait naturel et le mélange reconstitué d'acides phénoliques réduisent différemment la production de trichothécènes B par *F. culmorum* *in vitro*

Dans les grains, plusieurs acides phénoliques sont présents simultanément à des concentrations différentes. Dans ces conditions, quel est leur effet sur la biosynthèse des toxines par *Fusarium* ?

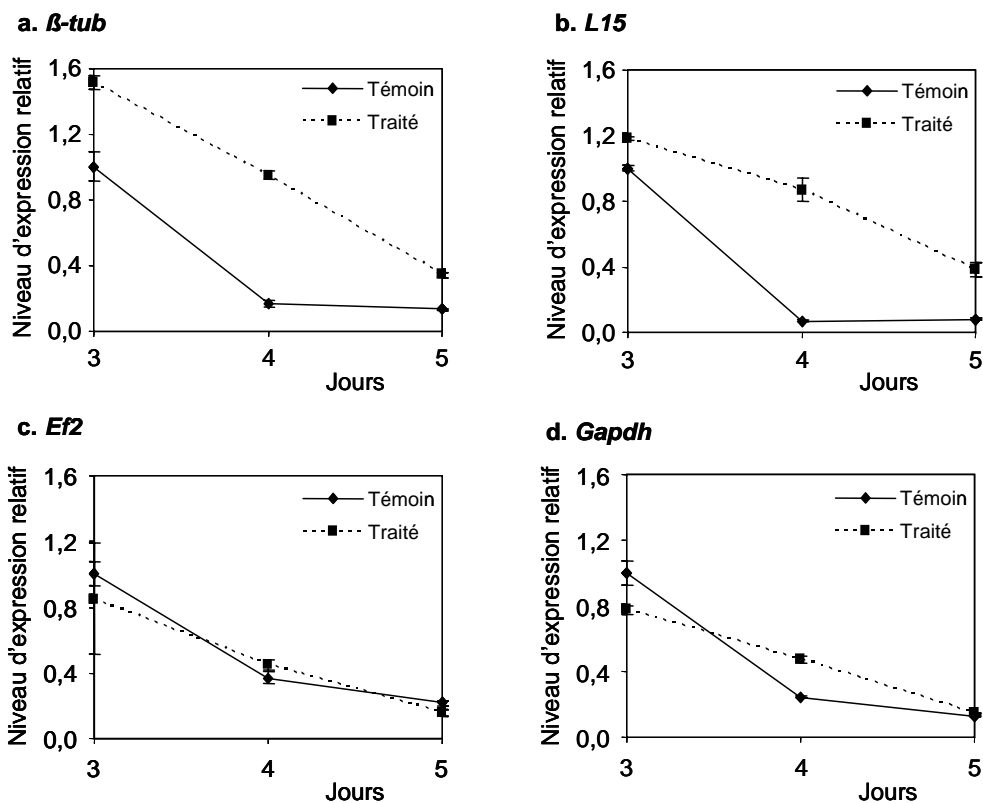
L'analyse par HPLC-MS de la composition de l'extrait naturel d'acides phénoliques issus des sons a révélé la présence de monomères d'acides phénoliques mais également de nombreux oligomères d'acide férulique, et notamment de dimères d'acides férulique.

Cet extrait naturel et un mélange reconstitué d'acide phénoliques ont été testés *in vitro* à deux concentrations (0,5 et 0,1 mM en acide férulique) vis-à-vis de la mycotoxinogénèse de deux souches de *F. culmorum* de chémotypes différents. Les résultats obtenus montrent que l'extrait naturel est un inhibiteur puissant de la biosynthèse des TCT B par les deux souches de l'étude, inhibant totalement la biosynthèse des TCT B lorsqu'il est supplémenté à 0,5 mM. Le mélange reconstitué d'acides phénolique a un effet inhibiteur moindre, en particulier pour la souche INRA 319 de chémotype NIV/FX. La souche INRA 319 est moins sensible au mélange reconstitué d'acides phénoliques, ce qui est en accord avec nos résultats précédents concernant l'effet de l'acide férulique seul. Cependant, l'extrait naturel a la même activité "anti mycotoxines" quelle que soit la souche considérée. Il serait très intéressant de tester l'effet de cet extrait naturel d'acides phénoliques sur un plus grand nombre de souches.

Nous suggérons alors un rôle inhibiteur potentiel de la mycotoxinogénèse des dimères d'acide férulique présent dans l'extrait naturel.

#### 2) L'extrait naturel d'acides phénolique réduit fortement l'expression des gènes *Tri* de la souche de *F. culmorum* INRA 117 en cultures liquides

De façon à analyser les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la mycotoxinogénèse par l'extrait naturel d'acides phénoliques, nous avons étudié l'expression de divers gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes en condition de cultures supplémentées par l'extrait.



**Figure 56 : Niveaux d'expression relatif des gènes  $\beta tub$  (a),  $L15$  (b),  $Ef2$  (c) et  $Gapdh$  (d) au 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour de croissance de la souche de *F. culmorum* INRA 117 en cultures témoin et traitées avec l'extrait naturel d'acides phénoliques.**

Les niveaux d'expression relatifs des gènes  $Ef2$ ,  $\beta tub$ ,  $Gapdh$  et  $L15$  sont normalisés par rapport à leurs niveaux d'expression respectifs dans le témoin à 3 jours.

Dans les cultures traitées, les variations des niveaux d'expression observées pour les gènes  $\beta tub$ ,  $Gapdh$  et  $L15$  sont significatives entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour et entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour. Entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour, les variations observées pour  $Ef2$  ne sont pas significatives ( $p=0,05$ ). Entre le 4<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, les variations observées pour  $Ef2$  sont significatives.

Si l'on compare les cultures témoins et les cultures traitées, les variations des niveaux d'expression observées pour les gènes  $\beta tub$ ,  $Gapdh$  et  $L15$  sont significatives à 3, 4 et 5 jours. les variations des niveaux d'expression observées pour le gène  $Ef2$  ne sont pas significatives à 3, 4 et 5 jours ( $p=0.05$ ).

Une première étape de cette analyse a consisté à choisir un gène de référence. L'expression constitutive des gènes  *$\beta$ -tub* codant la  $\beta$ -tubuline, *Gapdh* codant la glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase, *Ef2* codant un facteur d'élongation et *L15* codant une protéine ribosomique de la sous unité 60S a été comparée au 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour de croissance de la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée *in vitro* en cultures témoin et en cultures supplémentées avec l'extrait naturel d'acides phénoliques (0,5 mM équivalent acide férulique) (figure 56). Le paragraphe I. 4. 1 décrivait l'évolution de l'expression de ces gènes de référence au cours du temps dans les cultures témoins. Ici, l'évolution de leur expression au cours du temps dans les cultures traitées a été analysée ainsi que la variation de leur expression en fonction du traitement comparé aux cultures témoins.

Dans les cultures traitées,  *$\beta$ -tub*, *Gapdh*, *Ef2* et *L15* présentent un maximum d'expression au 3<sup>ème</sup> jour de culture, puis ce niveau diminue jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour de culture. Ces résultats sont en accord avec ce qui a déjà été observé dans les cultures témoins (paragraphe I. 4. 1).

En ce qui concerne les gènes  *$\beta$ -tub* et *L15*, les niveaux d'expression sont supérieurs dans les cultures traitées par rapport à leurs niveaux d'expression dans les cultures témoins. Alors que dans les cultures témoins, les niveaux d'expression diminuent fortement entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour de culture, dans les cultures traitées, ils diminuent progressivement entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de culture. Le traitement des cultures semble affecter l'expression des gènes  *$\beta$ -tub* et *L15* quel que soit le temps de culture considéré. Bien que les productions de biomasses sèches ne soient pas affectées par le traitement, celui-ci pourrait affecter le mode de développement du champignon, ce qui pourrait expliquer l'effet sur l'expression de ces gènes.

En ce qui concerne les gènes *Gapdh* et *Ef2*, les niveaux d'expression diminuent progressivement entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de culture. Il semble que le traitement des cultures affecte peu les niveaux d'expression des gènes *Gapdh* et *Ef2* par rapport aux gènes  *$\beta$ -tub* et *L15*. En effet, en ce qui concerne *Ef2*, les variations des niveaux d'expression observées entre les cultures témoins et les cultures traitées ne sont pas significatives à 3, 4 et 5 jours ( $p=0,05$ ).

Les facteurs de régulation de divers gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B ont été calculés au 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour de croissance de la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée *in vitro* en cultures témoin et supplémentées avec l'extrait naturel d'acides phénoliques (0,5 mM en acide férulique) et sont présentés dans la publication précédente. Le





gène de référence *Ef2* a été choisi pour normaliser nos résultats. Pour chaque temps de culture, les niveaux d'expression des gènes cibles, normalisés par les niveaux d'expression du gène de référence, sont exprimés par un facteur de régulation dans la condition traitée par rapport à la condition témoin avec le ratio =  $(E_{\text{cible}})^{\Delta\text{CP cible (témoin-traité)}} / (E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP ref (témoin-traité)}}$ .

Après trois, quatre et cinq jours de culture, l'expression de tous les gènes *Tri* est incontestablement plus faible dans les cultures traitées, comparé aux cultures témoins. Dans les cultures traitées, le niveau d'expression des gènes de biosynthèse *Tri5*, *Tri4* et *Tri11* est considérablement réduit. L'expression du gène *Tri101*, situé hors cluster, est elle aussi également réduite cependant, la réduction est plus faible et plus tardive. L'expression des deux régulateurs de la voie *Tri6* et *Tri10* est également réduite. Par contre, l'expression de *Fpps* semble très légèrement activée à quatre et cinq jours de culture. La réduction de l'expression de *Tri6* et *Tri10* est cependant très partielle et ne semble pas permettre d'expliquer l'effet important sur l'expression des gènes *Tri5*, *Tri4*, *Tri11* et *Tri101*. Nos résultats suggèrent donc que *Tri6* et *Tri10* ne seraient pas les seuls régulateurs de la voie. Les gènes cibles pourraient être sous le contrôle d'autres régulateurs spécifiques de la voie ou sous le contrôle de régulateurs plus généraux qui affecteraient l'expression des gènes de la voie de biosynthèse dans nos conditions.

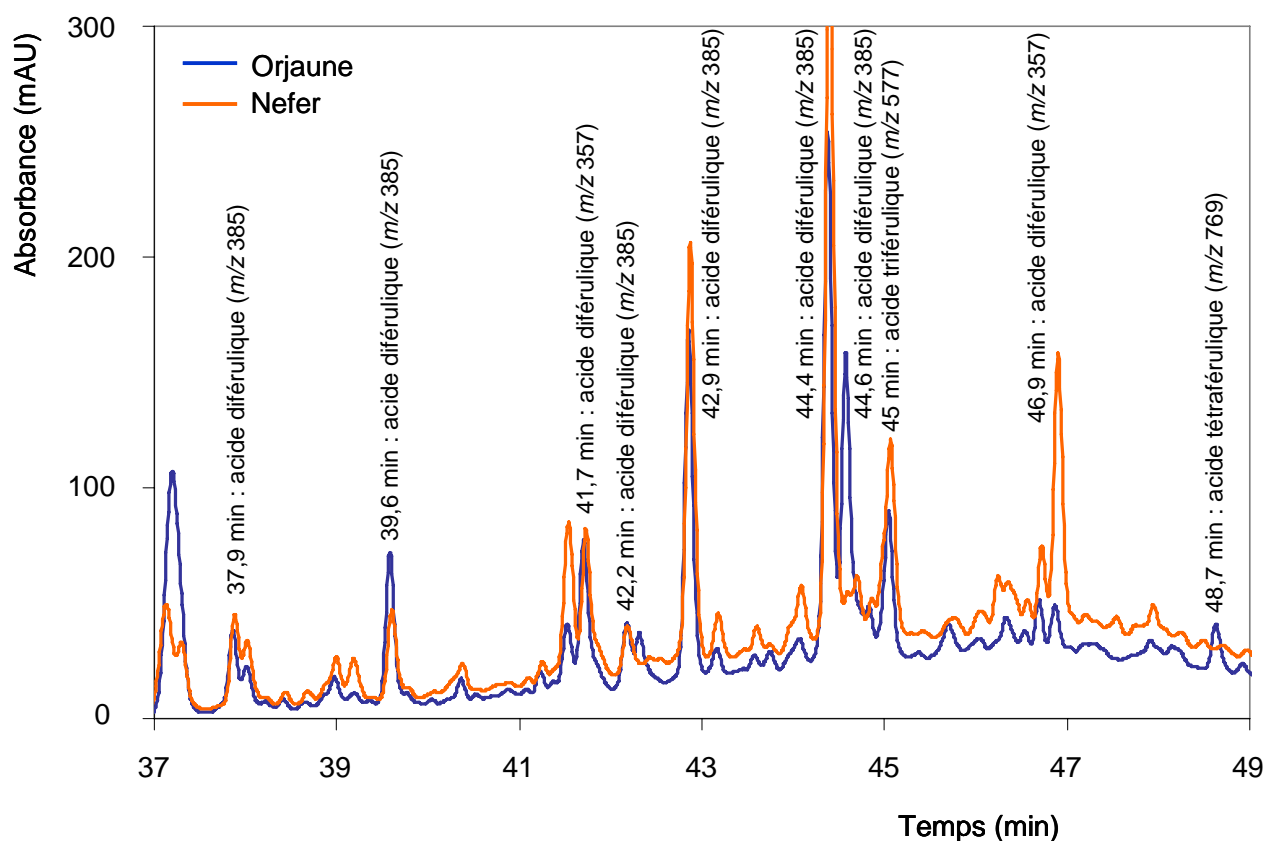
### **3) Extrait naturel d'acides phénoliques issus des sons de la variété Nefer, variété sensible à l'accumulation de mycotoxines : effet sur la mycotoxinogénèse ?**

De la même façon que dans la publication précédente, les acides phénoliques liés des parois ont été extraits des sons de blé de la variété Nefer, variété de blé dur sensible à l'accumulation de mycotoxines. Afin de comparer l'efficacité "anti mycotoxines" de l'extrait naturel d'acides phénoliques de Nefer et d'Orjaune, un extrait naturel d'acides phénoliques Nefer a été réalisé dans les mêmes proportions que celui d'Orjaune (extractions sur 15 g de sons, reprise de l'extrait sec par 400  $\mu\text{L}$ , supplémentation des cultures par le même volume d'extrait). Par conséquent, alors que pour Orjaune, l'extrait naturel était supplémenté aux cultures à une concentration finale de 0,5 mM et 0,1 mM en acide férulique ; pour Nefer, la concentration finale en acide férulique est en réalité inférieure à 0,5 mM avec l'extrait et inférieure à 0,1 mM avec l'extrait dilué 5 fois. Un mélange reconstitué a été réalisé avec des poudres commerciales d'acides phénoliques de façon à obtenir la même composition quantitative et qualitative que l'extrait naturel de Nefer.

**Tableau 20 : Effets des extraits naturels et reconstitués et des extraits naturels dilués 5 fois de Nefer sur la biosynthèse des toxines par les souches de *F. culmorum* INRA 117 et INRA 319 cultivées sur milieu MS.**

Supplémentation	TCT B (% d'inhibition)	
	INRA 117	INRA 319
Extrait naturel	100	100
Mélange reconstitué	73	12
Extrait naturel dilué 5 fois	68	91
Mélange reconstitué dilué 5 fois	nd	nd

nd : non déterminé



**Figure 57 : Profils chromatographiques à 280 nm des extraits naturels Nefer et Orjaune obtenus par HPLC-DAD.**

Les extraits naturels et reconstitués ainsi que les extraits naturels dilués 5 fois d'acides phénoliques "Nefer" ont été testés *in vitro* vis-à-vis de la mycotoxinogénèse de deux souches de *F. culmorum* de chémotypes différents (tableau 20). La supplémentation des cultures par ces extraits n'a pas d'effet sur la production de biomasse fongique (données non représentées).

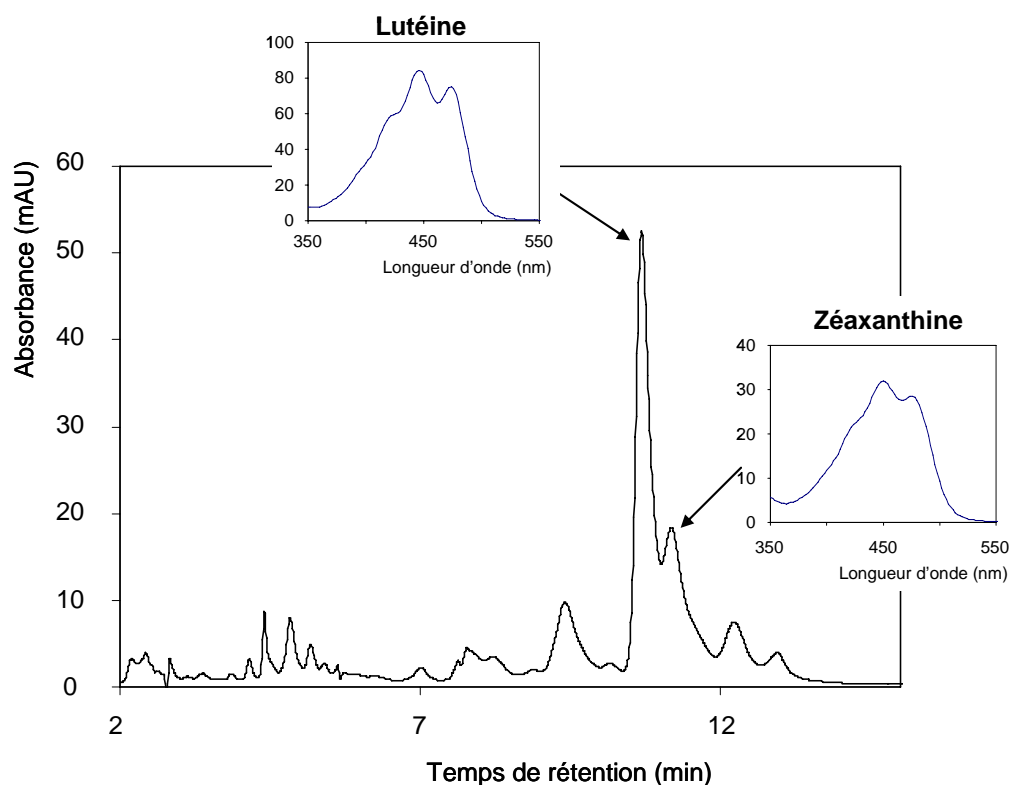
L'extrait naturel Nefer inhibe totalement la biosynthèse des TCT B par les deux souches de l'étude. L'extrait naturel Nefer dilué 5 fois inhibe la biosynthèse des TCT B de 68% pour la souche INRA 117 et de 91% pour la souche INRA 319. Rappelons qu'à quantité équivalente, l'extrait naturel Orjaune inhibait la biosynthèse des TCT B de 68% pour la souche INRA 117 et de 83% pour la souche INRA 319 (cf publication précédente). L'extrait naturel Nefer est donc aussi un puissant inhibiteur de la biosynthèse des toxines. De plus, nos résultats suggèrent que l'efficacité "anti mycotoxines" des extraits naturels et des extraits naturels dilués 5 fois Orjaune et Nefer est similaire.

Le mélange reconstitué Nefer inhibe la biosynthèse des TCT B, mais moins que l'extrait naturel Nefer, surtout pour la souche INRA 319. La souche INRA 319 est moins sensible aux acides phénoliques monomériques du mélange reconstitué. Les extraits naturels ont un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse plus important que les mélanges reconstitués, ce qui confirme ce que nous avons déjà observé précédemment en comparant l'efficacité "anti mycotoxines" des extraits naturels et reconstitués Orjaune (cf publication précédente).

Ces résultats suggèrent que les acides phénoliques de l'extrait naturel sont donc des composés inhibiteurs de la mycotoxinogénèse mais aussi que d'autres composés présents dans cet extrait sont aussi des inhibiteurs potentiels puissants de la toxinogénèse dont l'effet se cumulerait avec celui des acides phénoliques. Les nombreuses formes oligomériques de l'acide férulique présentes dans ce type d'extrait sont suspectées. La composition de l'extrait naturel "Nefer" a été analysée par HPLC-MS et a été comparée à celle de l'extrait naturel "Orjaune" (figure 57). Les dimères, le trimère et le tétramère d'acide férulique identifiés dans l'extrait "Orjaune" ont été retrouvés dans l'extrait "Nefer". Nous avons comparé dans les deux extraits les surfaces des pics identifiés par HPLC-MS comme étant des oligomères de l'acide férulique (tableau 21). Certains composés sont présents à des concentrations légèrement différentes selon la variété, c'est le cas des composés correspondant aux pics dont le temps de rétention est de 39,6 min, 42,9 min, 44,4 min, 44,6 min, 46,9 min et 48,7 min. La surface totale des pics identifiés comme des oligomères d'acide férulique est de 7792 pour Orjaune et 8472 pour Nefer.

**Tableau 21 : Surfaces des pics correspondant aux différents oligomères d'acide férulique dans les extraits Orjaune et Nefer.**

Temps de rétention	Composés	Surface des pics	
		Orjaune	Nefer
37,9	acide diférulique (m/z 385)	282	311
39,6	acide diférulique (m/z 385)	526	362
41,7	acide diférulique (m/z 357)	602	599
42,2	acide diférulique (m/z 385)	331	382
42,9	acide diférulique (m/z 385)	1270	1613
44,4	acide diférulique (m/z 385)	1857	2594
44,6	acide diférulique (m/z 385)	1235	235
45	acide triférulique (m/z 577)	858	884
46,9	acide diférulique (m/z 357)	405	1199
48,7	acide tetraférulique (m/z 769)	426	293



**Figure 58 : Profil chromatographique à 450 nm du contenu en caroténoïdes des sons de blé dur de la variété Orjaune après analyse par HPLC-DAD.**

La lutéine et la zéaxanthine ont été détectées dans cet extrait sur la base de leur temps de rétention et de leurs spectres UV représentés sur la figure.

Il est possible d'émettre l'hypothèse que la plus forte concentration en oligomères d'acide férulique de l'extrait Nefer, en particulier pour certaines formes dimériques telles que les formes éluant aux temps de rétention 42,9 min, 44,4 min et 46,9 min, pourrait compenser sa plus faible concentration en formes monomériques d'acides phénoliques, ce qui pourrait expliquer que les extraits naturels Orjaune et Nefer ont la même efficacité "anti mycotoxines". Pour le vérifier, il faudrait isoler ces formes dimériques et tester leur effet *in vitro* sur la production de toxines.

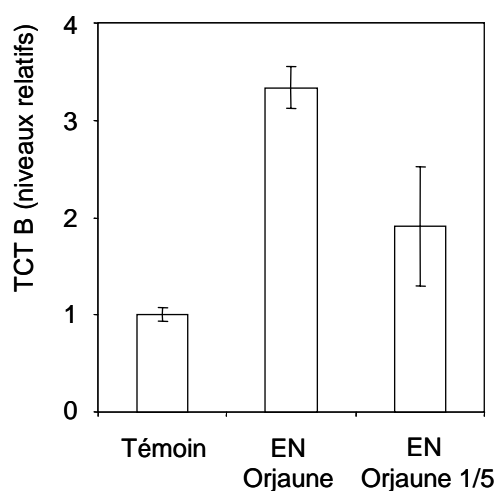
### III. 3. Extraits naturels de caroténoïdes : effet sur la mycotoxinogénèse ?

Dans un premier temps, le contenu en caroténoïdes a été comparé dans les sons des variétés Orjaune et Nefer. Puis, l'effet d'un extrait naturel de caroténoïdes a été étudié *in vitro* vis-à-vis de la biosynthèse des TCT B par *Fusarium*.

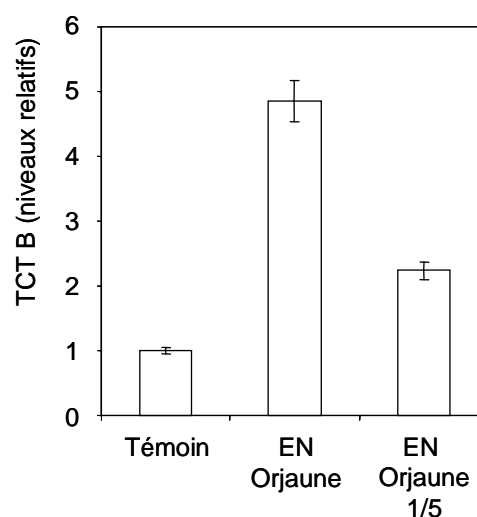
Une extraction des caroténoïdes des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer a été réalisée puis, les extraits obtenus ont été analysés par HPLC-DAD. Le profil chromatographique du contenu en caroténoïdes des sons de blé dur de la variété Orjaune est présenté sur la figure 58. La lutéine et la zéaxanthine ont été détectées dans cet extrait sur la base de leurs temps de rétention et de leurs spectres UV. Ce résultat est en accord avec la bibliographie, la lutéine étant le caroténoïde majoritaire du blé et la zéaxanthine le second (Humphries et Khachik, 2003). Par contre, les sons de blé dur de la variété Nefer contiennent de la lutéine en concentration très faible. Les concentrations en lutéine et zéaxanthine sont de 550 ng/g de sons pour la variété Orjaune et de 43 ng/g de sons pour la variété Nefer. A titre de comparaison, Hentschel *et al.* (2002) ont mesuré des teneurs en caroténoïdes de 2 µg/g dans les sons de blé dur de la variété Orjaune.

L'extrait naturel de caroténoïdes, issu des sons de la variété Orjaune, a été testé *in vitro* vis-à-vis de la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. Afin de comparer l'efficacité "anti mycotoxines" de l'extrait naturel de caroténoïdes à l'effet de l'extrait naturel d'acides phénoliques (cf publication précédente), l'extrait naturel de caroténoïdes a été réalisé dans les mêmes proportions que l'extrait naturel d'acides phénoliques (extractions sur 15 g de sons, reprise de l'extrait sec par 400 µL, supplémentation des cultures par le même volume

a



b



**Figure 59 : Effet des extraits naturels (EN) de caroténoïdes issus des sons de la variété Orjaune ainsi que de l'extrait dilué 5 fois vis-à-vis de la biosynthèse de toxines par les souches de *F. culmorum*. INRA 117 (a) et INRA 319 (b).**

EN Orjaune : cultures supplémentées avec l'extrait naturel de caroténoïdes issus des sons de la variété Orjaune, EN Orjaune 1/5 : cultures supplémentées avec l'extrait naturel dilué 5 fois de caroténoïdes issus des sons de la variété Orjaune.

En conditions de cultures supplémentées par les extraits naturels de caroténoïdes, les niveaux de biomasse sèche fongique sont peu affectés (données non représentées). Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. Les niveaux de TCT B dans les cultures supplémentées avec les extraits naturels de caroténoïdes sont exprimés en niveaux relatifs par rapport aux niveaux de TCT B dans les cultures témoins (INRA 117 :  $2113 \pm 177$   $\mu\text{g/g}$  de biomasse sèche, INRA 319 :  $2956 \pm 211$   $\mu\text{g/g}$  de biomasse sèche).

d'extrait). L'extrait naturel de caroténoïdes ainsi que de cet extrait dilué 5 fois ont été testés vis-à-vis de la biosynthèse de toxines par les souches de *F. culmorum*. INRA 117 et INRA 319 (figure 59a et 59b). La concentration en caroténoïdes (lutéine + zéaxanthine) est de 77 ng/mL dans les cultures supplémentées avec l'extrait naturel Orjaune, elle est de 15,4 ng/mL dans les cultures supplémentées avec l'extrait naturel Orjaune dilué 5 fois. Les niveaux de TCT B produits sont activés pour les deux souches lorsque les cultures sont supplémentées par l'extrait naturel de caroténoïdes issus des sons de la variété Orjaune et par l'extrait dilué 5 fois.

Les extraits naturels de caroténoïdes issus des sons Orjaune semblent donc avoir un effet activateur sur la biosynthèse de toxines par *Fusarium*, à la concentration testée (77 ng/mL et 15,4 ng/μL). Nous avons trouvé des teneurs en caroténoïdes de 550 ng/g dans les sons de la variété Orjaune. Hentschel *et al.* (2002) a mesuré des teneurs en caroténoïdes de 2000 ng/g dans les sons de la variété Orjaune. Il semblerait que les concentrations en extrait naturel que nous avons testées ne sont pas représentatives des concentrations présentes dans les sons, elles sont inférieures. Par conséquent, il serait intéressant de tester l'effet de l'extrait naturel de caroténoïdes sur la biosynthèse des toxines à une concentration plus importante afin de se rapprocher des concentrations naturelles dans les sons de blé. Rappelons que nous avons précédemment montré que l'effet du β-carotène sur la mycotoxinogénèse était très concentration dépendant. Au cours de ces expérimentations, les extraits naturels de caroténoïdes ont été solubilisés dans du Tween 80 afin de permettre leur solubilisation dans le milieu de culture aqueux. Il sera également intéressant pour les futures études de trouver une alternative à l'utilisation du Tween 80 qui à lui seul a un effet sur la biosynthèse de toxines. Ces résultats sont donc réellement préliminaires.

Au regard de ces résultats, l'extrait naturel de caroténoïdes Orjaune n'a pas d'efficacité "anti mycotoxines" dans les conditions testées.

### **III. 4. Extraits naturels d'acides phénoliques : Conclusions**

Les contenus en acides phénoliques solubles et en acides phénoliques liés sont très différents entre les variétés Orjaune et Nefer. La variété Orjaune qui accumule peu de mycotoxines contient environ deux fois plus d'acides phénoliques que la variété Nefer. Il serait intéressant d'analyser les contenus en acides phénoliques d'un plus grand nombre de





variétés de blé dur et de les relier aux niveaux de contamination des grains en mycotoxines, afin de conclure sur une éventuelle relation.

Dans les grains, plusieurs acides phénoliques sont présents en même temps et à des concentrations différentes. Existe-t-il des effets synergiques ou antagonistes entre les acides phénoliques vis-à-vis de la mycotoxinogénèse ? Afin de se rapprocher de ces conditions, nous avons étudié *in vitro* l'effet d'un extrait naturel d'acides phénoliques issus des sons de blé dur vis-à-vis de la mycotoxinogénèse. Cet extrait naturel a un effet inhibiteur puissant sur la biosynthèse des toxines et toujours supérieur à ce que l'on obtient avec un mélange reconstitué de monomères d'acides phénoliques. Nous avons montré que les formes monomériques d'acide phénoliques que contient cet extrait naturel sont des inhibiteurs effectifs de la biosynthèse des toxines. Cependant, nos résultats permettent de suggérer pour la première fois que les formes oligomériques d'acide férulique, et notamment les dimères de l'acide férulique que contient cet extrait naturel, seraient des inhibiteurs potentiels très puissants de la mycotoxinogénèse. Les perspectives seraient de séparer et de purifier les différentes formes oligomériques que contient cet extrait ou de les synthétiser chimiquement afin de les tester individuellement pour leur effet sur la biosynthèse des toxines.

De plus, dans des cultures de *Fusarium* supplémentées par l'extrait naturel d'acides phénoliques, nos résultats ont clairement mis en évidence que l'inhibition totale de la biosynthèse des toxines est associée à une réduction spectaculaire de l'expression de certains gènes *Tri*, notamment les gènes de biosynthèse *Tri5*, *Tri4* et *Tri11*. De plus, nous suggérons que les gènes *Tri* pourraient être sous le contrôle d'autres facteurs de transcription spécifique ou sous le contrôle d'un régulateur plus général.



## **CHAPITRE IV :**

### **Purification et caractérisation de composés présents dans les sons de blé dur modulant la biosynthèse des TCT B**



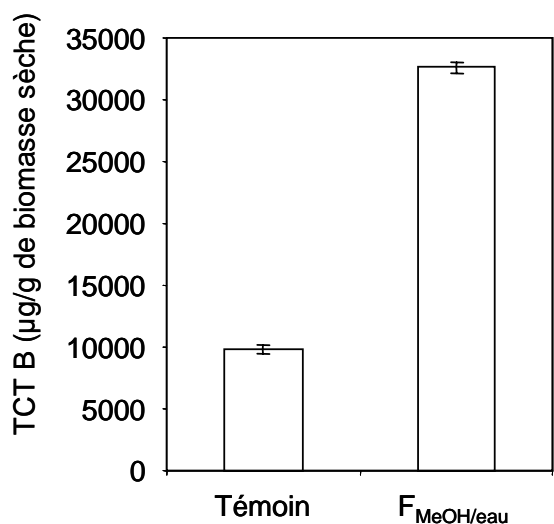
L'objectif de ce quatrième chapitre de thèse est de rechercher dans les sons de blé dur des composés interférant avec la biosynthèse des toxines. Pour cela, une démarche sans à priori sur la nature des composés recherchés a été menée. Des fractionnements successifs ont été réalisés à partir des sons de blé dur de deux variétés caractérisées par des sensibilités différentes à l'accumulation des mycotoxines, les variétés Orjaune et Nefer. Rappelons que la variété Nefer est une variété de blé dur sensible à l'accumulation de mycotoxines alors que pour la variété Orjaune, cette accumulation semble être plus limitée. Cette différence de sensibilité à l'accumulation de mycotoxines n'est pas liée à une métabolisation différente des toxines (glycosylation, acétylation, vérifié au laboratoire). Notre hypothèse est que cette différence de sensibilité serait liée à des compositions biochimiques différentes des sons en fonction des variétés, avec des composés capables d'interférer avec la mycotoxinogénèse de *Fusarium*. Selon les variétés, il pourrait exister un équilibre différent entre les composés inhibiteurs/activateurs présents dans les sons induisant une accumulation différentielle de mycotoxines dans les grains. Notre étude s'intéresse au fractionnement des composés solubles des sons et à leur effet sur l'accumulation des TCT B par *Fusarium*. Nous recherchons plus précisément des composés ayant une activité inhibitrice de la mycotoxinogénèse.

## **IV. 1. Purification à partir des sons de blé dur d'entités modulatrices de la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum***

### **IV. 1. 1. Séparation des composés solubles polaires et apolaires des sons de blé dur**

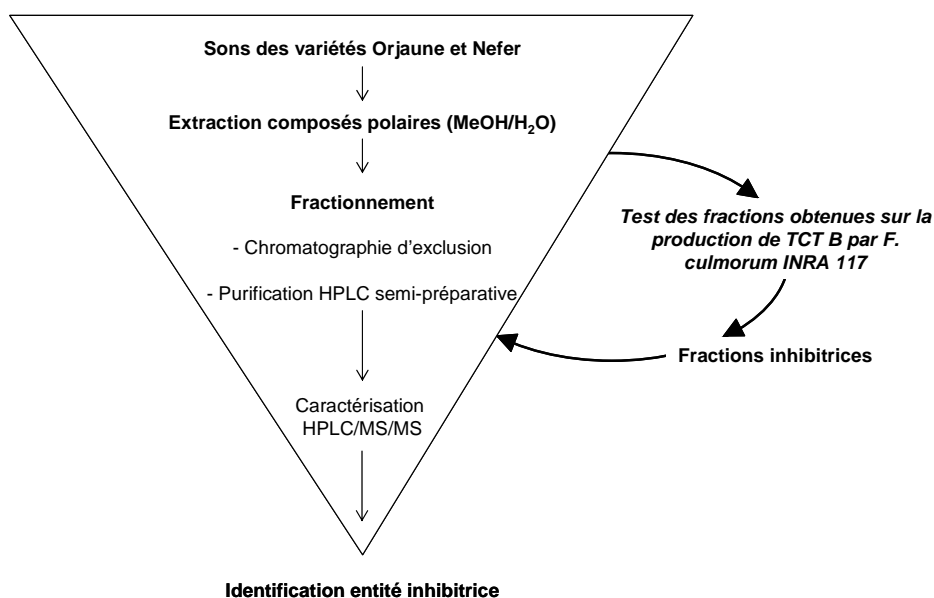
La première étape du fractionnement des sons a consisté en la séparation des composés apolaires (extraits par l'hexane) et des composés polaires (extraits par un mélange méthanol/eau) (cf Matériel et Méthodes, p. 58).

La fraction hexane extraite des sons de la variété Orjaune a été analysée par HPLC-DAD. Cette fraction contient entre autres des caroténoïdes, et notamment de la lutéine. Dans le chapitre III. 3 de cette thèse, une étude de la composition en caroténoïdes des sons de blé dur et de leur effet sur la mycotoxinogénèse de *Fusarium* a déjà été menée. C'est pourquoi, nous avons décidé pour la suite de l'étude de nous focaliser sur la fraction des sons extraite par le mélange méthanol/eau, qui contient les composés polaires.



**Figure 60 : Effet de l'extrait polaire (F<sub>MeOH/eau</sub>) issu des sons de blé dur de la variété Orjaune sur la biosynthèse des TCT B par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée sur milieu MS.**

Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. La supplémentation des cultures par cette fraction n'a pas d'effet sur la production de biomasse sèche comparé aux cultures témoins (données non représentées).



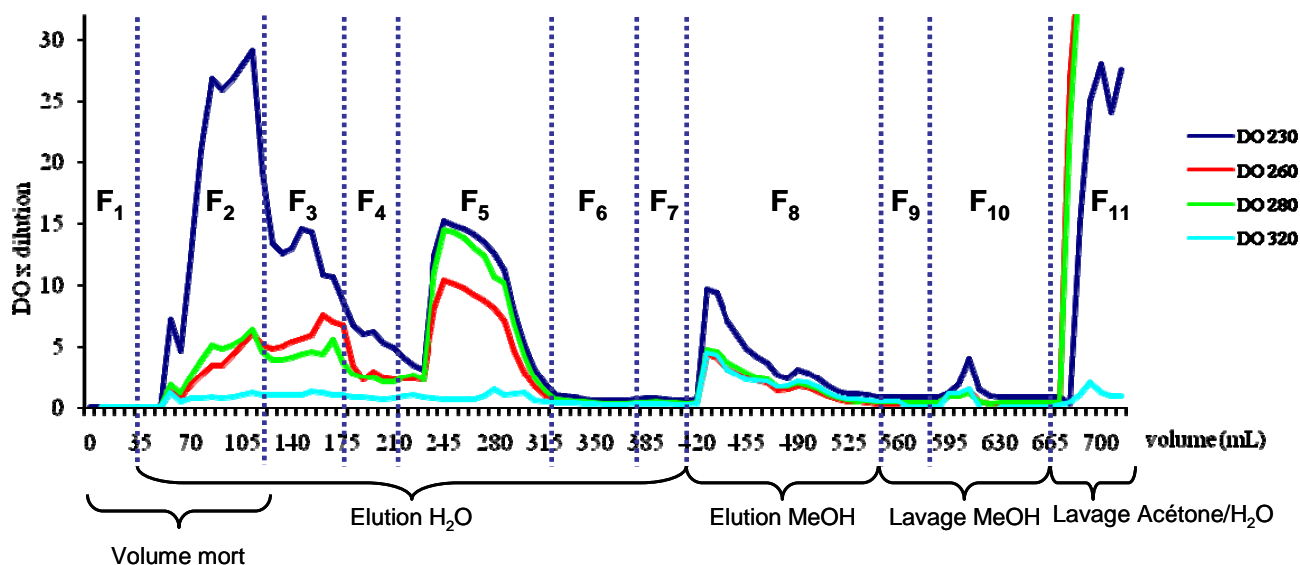
**Figure 61 : Représentation schématique de la démarche expérimentale menée au cours de la recherche d'entités inhibitrices de la mycotoxinogénèse à partir des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer.**

La fraction des sons extraite par le mélange méthanol/eau a été supplémentée à 1,4 mg/mL (quantité correspondante à 1,5 g de sons) aux cultures de *Fusarium* et son effet sur la biosynthèse de TCT B a été analysé (figure 60). La fraction méthanol/eau a un effet activateur de la mycotoxinogénèse. Cette fraction peut contenir divers composés, tels des polysaccharides, des protéines, des peptides, des composés phénoliques (Parker *et al.*, 2005). L'effet activateur *in vitro* de la biosynthèse des TCT B de la fraction méthanol/eau pourrait être attribué aux polysaccharides qu'elle contient. En effet, les niveaux de TCT B sont affectés par la source de carbone et la concentration de celle-ci dans les milieux de culture (Miller et Greenhalgh, 1985). Dans des études préliminaires, nous avons observé que les concentrations ainsi que la nature de la source de carbone du milieu MS avaient une influence sur les niveaux de toxines produits par *Fusarium* (données non représentées). La présence de ces composés activateurs dans la fraction méthanol/eau pourrait masquer l'effet de composés inhibiteurs éventuellement présents dans cette fraction. Il convient donc de continuer à fractionner cette fraction méthanol/eau afin de séparer les divers constituants et de rechercher des fractions avec un éventuel effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse.

## **IV. 1. 2. Fractionnement de l'extrait polaire issu des sons de blé dur**

### **IV. 1. 2. 1. Démarche expérimentale**

Dans cette étude, les sons des deux variétés de blé dur, Orjaune et Nefer, ont été fractionnés en parallèle. L'extrait de départ est un extrait polaire (méthanol/eau). La démarche expérimentale est résumée sur la figure 61. Les composés de l'extrait polaire ont ensuite été fractionnés par différentes étapes de chromatographie (chromatographie d'exclusion, HPLC semi-préparative). A chaque étape de fractionnement, les fractions récoltées ont été testées *in vitro* pour leur effet sur la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum* (INRA 117). Les fractions ayant une activité inhibitrice de la mycotoxinogénèse ont été caractérisées par HPLC-DAD puis refractionnées jusqu'à purification du ou des composés candidats inhibiteurs de la mycotoxinogénèse. Le ou les composés candidats ont alors été caractérisés par HPLC-MS/MS.



**Figure 62 : Profils chromatographiques obtenus après chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel de l'extrait polaire issu des sons de la variété Orjaune.**

Après dépôt de l'extrait polaire en tête de colonne, l'élution des extraits a été réalisée par de l'eau puis par du méthanol. Ensuite, un lavage au méthanol et un lavage à l'acétone/eau sont effectués. 11 fractions ont été collectées, notées de F<sub>1</sub> à F<sub>11</sub>.

**Tableau 22 : Bilan du fractionnement par chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel de l'extrait polaire issu des sons de la variété Orjaune.**

Le bilan a été déterminé par pesée des fractions lyophilisées récoltées puis, les masses sont exprimées en % par rapport à la masse totale récoltée.

Fractions	% fractions récoltées
F <sub>1</sub>	0,12
F <sub>2</sub>	59,02
F <sub>3</sub>	33,90
F <sub>4</sub>	1,07
F <sub>5</sub>	1,76
F <sub>6</sub>	0,30
F <sub>7</sub>	0,12
F <sub>8</sub>	0,60
F <sub>9</sub>	0,03
F <sub>10</sub>	0,04
F <sub>11</sub>	3,02



#### **IV. 1. 2. 2. Chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel : 100 < domaine de fractionnement < 10 000 Da**

Les extraits polaires issus des sons des variétés Orjaune et Nefer ont été déposés sur une matrice de Fractogel, permettant un premier fractionnement des molécules selon leur taille, avec un domaine de fractionnement assez large compris entre 100 et 10 000 Da.

##### **a. Profil chromatographique**

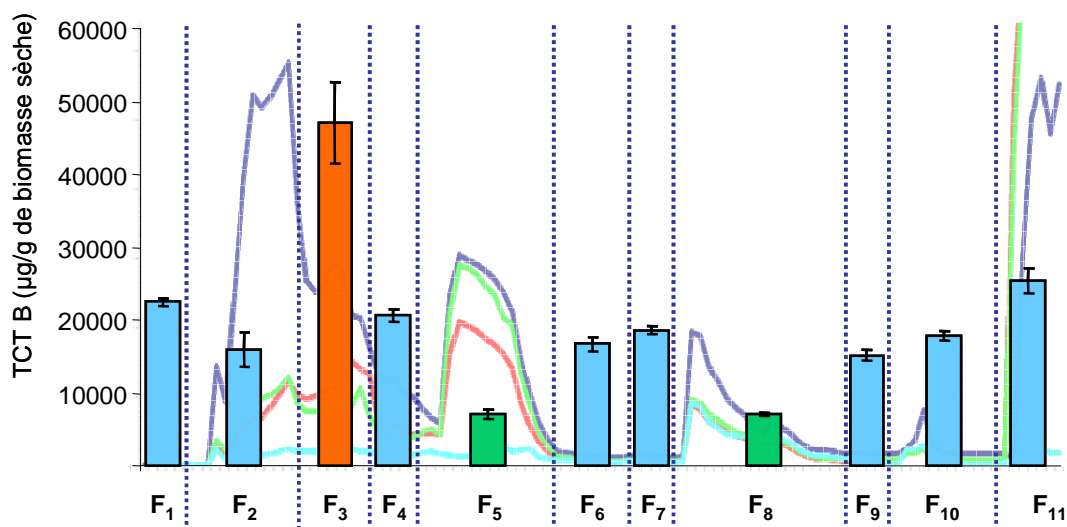
Après dépôt de l'extrait polaire (2 g d'extrait polaire lyophilisé dissout dans 50 mL d'eau) en tête de colonne, l'élution des extraits a été réalisée en deux temps ; tout d'abord, une élution à l'eau qui permet d'éluer les composés retardés puis une élution au méthanol qui permet d'éluer les molécules retenues par interaction avec le gel. En sortie de colonne, l'absorbance des éluats collectés est mesurée à 230, 260, 280 et 320 nm et conduit pour la variété Orjaune au profil chromatographique présenté sur la figure 62. Le fractionnement des extraits polaires des sons de Nefer a donné un profil chromatographique similaire.

En se basant sur le profil chromatographique obtenu, 11 fractions nommées de F<sub>1</sub> à F<sub>11</sub> ont été collectées. Le bilan du fractionnement est présenté dans le tableau 22. La fraction F<sub>1</sub>, éluee avec le volume mort, est constituée de phase mobile. La fraction F<sub>2</sub>, éluee avec le volume mort, contient des molécules totalement exclues de taille supérieure à 10 000 Da. Les fractions F<sub>3</sub> et F<sub>4</sub> contiennent des molécules de taille moyenne ( $\leq 10\ 000$  Da). La fraction F<sub>5</sub> contient des molécules totalement incluses dans le gel qui sortent en fin d'élution et qui sont de petites tailles (de 100 à 1 500 Da, déterminé grâce à la calibration du gel). De plus, la fraction F<sub>5</sub> contient des molécules qui ont la particularité d'absorber à 280 nm, ce qui est caractéristique des groupements aromatiques de composés tels que les composés phénoliques, les acides aminés de type tyrosine, tryptophane et phénylalanine. Aucune absorbance n'est mesurée pour les fractions F<sub>6</sub> et F<sub>7</sub>. La fraction F<sub>8</sub> est éluee par le méthanol, les composés de cette fraction étaient retenus par interaction avec le gel. Les molécules de la fraction F<sub>8</sub> absorbent à 280 et 320 nm, ce qui suggère la présence de composés phénoliques. Les fractions F<sub>9</sub>, F<sub>10</sub> et F<sub>11</sub> sont des fractions collectées après lavage de la colonne au méthanol puis avec un mélange acétone/eau.

Un test à la ninhydrine, permettant de mettre en évidence les fonctions  $\alpha$  amino-acide libres, a été réalisé sur les différentes fractions. Ce test a révélé la présence de fonctions

**Tableau 23 : Quantités de chaque fraction, F<sub>1</sub> à F<sub>11</sub>, supplémentées aux milieux de culture pour l'étude de l'effet des fractions sur la mycotoxinogénèse.**

Fractions	Quantité supplémentée aux cultures (mg/mL)
F <sub>1</sub>	0,060
F <sub>2</sub>	1,429
F <sub>3</sub>	1,429
F <sub>4</sub>	0,523
F <sub>5</sub>	0,860
F <sub>6</sub>	0,149
F <sub>7</sub>	0,057
F <sub>8</sub>	0,291
F <sub>9</sub>	0,014
F <sub>10</sub>	0,020
F <sub>11</sub>	1,474



**Figure 63 : Effet des fractions F<sub>1</sub> à F<sub>11</sub> sur la biosynthèse des TCT B par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée sur milieu MS.**

Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. Les fractions F<sub>1</sub> à F<sub>11</sub> sont issues du fractionnement par chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel de l'extrait polaire des sons de la variété Orjaune. La production de biomasse sèche est peu modifiée par la supplémentation des fractions aux milieux de culture (données non représentées).

amines libres dans les fractions F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> et F<sub>5</sub>, suggérant la présence de composés de nature protéique et peptidique.

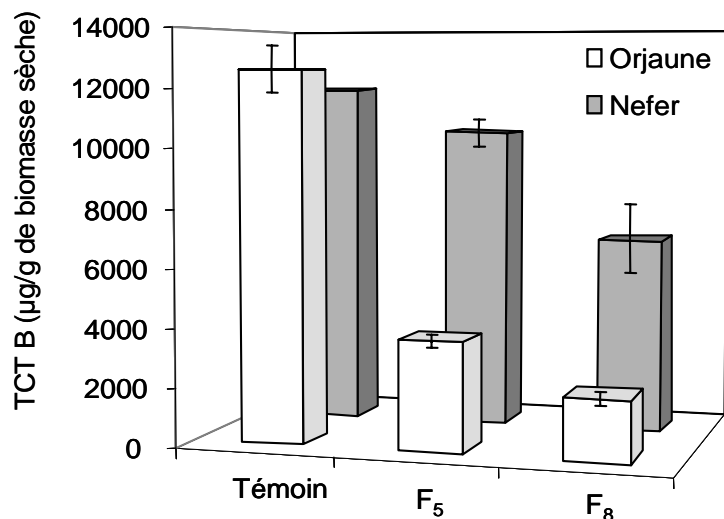
### **b. Effet des fractions F<sub>1</sub> à F<sub>11</sub> sur la mycotoxinogénèse**

Les 11 fractions issues des sons de Orjaune ont été testées *in vitro* pour leur effet vis-à-vis de la biosynthèse de mycotoxines par *F. culmorum* (INRA 117). Chacune des fractions a été lyophilisée et individuellement supplémentée au milieu de culture. Les quantités de chaque fraction supplémentées aux cultures sont reportées dans le tableau 23. Les niveaux de TCT B produits dans chaque condition sont présentés dans la figure 63. Les fractions F<sub>1</sub>, F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub> et F<sub>9</sub> constituent des témoins car elles ne contiennent pas de composés (pas d'absorbance et pas de matière sèche récoltée). Les niveaux de TCT B produits en présence des fractions F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>9</sub>, F<sub>10</sub> et F<sub>11</sub> sont peu différents. La fraction F<sub>3</sub>, qui pourrait contenir des polysaccharides, a un effet activateur d'un facteur 2 de la biosynthèse des TCT B. Les fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub> ont un effet inhibiteur de la biosynthèse des TCT B, avec 69% d'inhibition avec F<sub>5</sub> et également 69% d'inhibition avec F<sub>8</sub> (comparé au témoin supplémenté avec F<sub>1</sub>).

L'effet activateur global de la mycotoxinogénèse observé avec l'extrait polaire (méthanol/eau) pourrait être dû à l'effet activateur de la fraction F<sub>3</sub> masquant l'effet inhibiteur des fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub>.

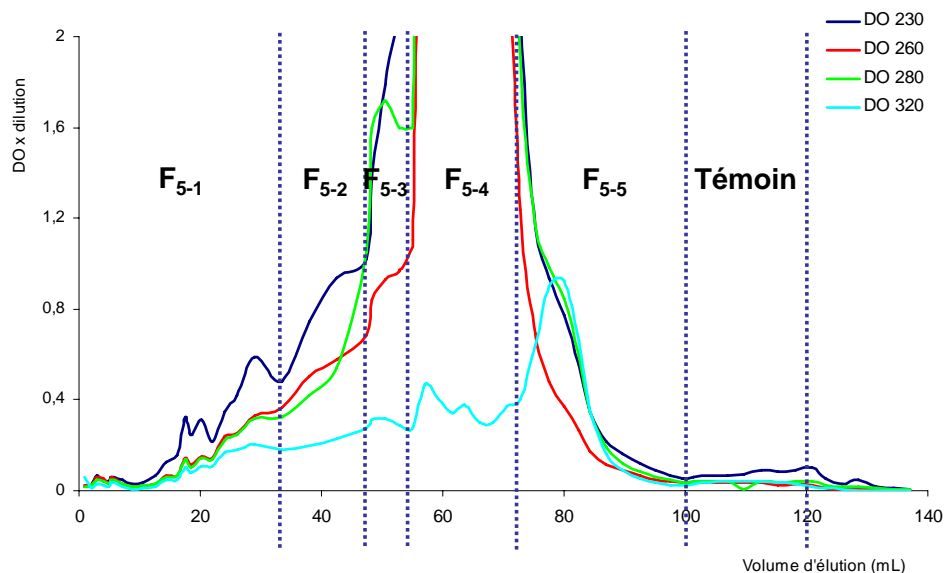
***La suite de l'étude a fait partie d'un projet de Master Recherche (Gros Jacques, 2007) que j'ai encadré et qui a participé à la réalisation des travaux. Les analyses par HPLC-MS/MS ont été réalisées avec l'aide de Vessela Atanassova-Pénichon.***

Les composés des fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub> issues du fractionnement en parallèle des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer ont été comparés *in vitro* pour leur effet vis-à-vis de la biosynthèse de mycotoxines par *F. culmorum* (INRA 117). Comme précédemment, chacune des fractions lyophilisées a été individuellement supplémentée au milieu de culture avant inoculation et leur effet sur la production de biomasse sèche et sur la biosynthèse de toxines a été évalué (figure 64). Des quantités de 0,45 mg/mL de F<sub>5</sub> Orjaune, 0,46 mg/mL de F<sub>5</sub> Nefer, 0,25 mg/mL de F<sub>8</sub> Orjaune et 0,28 mg/mL de F<sub>8</sub> Nefer ont été supplémentées aux cultures. Comme témoin de culture, nous avons supplémenté aux cultures une fraction lyophilisée ne présentant aucune absorbance. Les composés des fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub>, issues des fractionnements des extraits polaires des sons de Orjaune et de Nefer, ont un effet inhibiteur



**Figure 64 : Effet des fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub>, issues du fractionnement des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer, sur la biosynthèse des TCT B par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée sur milieu MS.**

Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. Les fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub> sont issues du fractionnement par chromatographie d'exclusion sur gel de Fractogel des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer. La production de biomasse sèche est peu modifiée par la supplémentation des fractions aux milieux de culture (données non représentées).



**Figure 65 : Profils chromatographiques obtenus après chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P2 de la fraction F<sub>5</sub> issu du fractionnement de l'extrait polaire des sons de la variété Orjaune.**

Après dépôt de la fraction F<sub>5</sub> en tête de colonne, l'élution des extraits a été réalisée par une solution de tampon acétate (40 mM) acidifiée à pH 4,4 avec de l'acide acétique. Cinq sous fractions ont été déterminées, notées de F<sub>5-1</sub> à F<sub>5-5</sub>.

de la biosynthèse de TCT B par *F. culmorum*. L'inhibition est plus importante avec les fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub> issues du fractionnement de Orjaune, induisant 71% d'inhibition pour F<sub>5</sub> et 84% d'inhibition pour F<sub>8</sub>. Les fractions issues du fractionnement de Nefer induisent 12% d'inhibition pour F<sub>5</sub> et 44% d'inhibition pour F<sub>8</sub>.

Nous avons donc mis en évidence deux fractions, les fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub>, issues du fractionnement par chromatographie d'exclusion sur un gel de Fractogel des extraits polaires des sons, qui contiennent des composés capables d'inhiber *in vitro* la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum*. Les fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub>, absorbent à 280 nm suggérant la présence de composés aromatiques tels que des composés phénoliques ou des acides aminés de type tyrosine, tryptophane ou phénylalanine. De plus, nos résultats suggèrent que les entités inhibitrices des fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub> seraient présentes dans les sons de la variété Orjaune mais également dans les sons de la variété Nefer. Cependant, leurs concentrations seraient probablement inférieures dans les sons de Nefer.

### c. Analyse des fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub> par HPLC-DAD

Les fractions F<sub>5</sub> et F<sub>8</sub>, issues des fractionnements des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer, ont été analysées par HPLC-DAD. La fraction F<sub>8</sub> contient essentiellement des composés phénoliques (résultats non montrés). Dans les chapitres II et III de cette thèse, une étude de la composition en acides phénoliques des sons de blé dur et de leur effet sur la mycotoxinogénèse de *Fusarium* a été menée. C'est pourquoi, nous avons décidé pour la suite de l'étude de nous focaliser sur la fraction F<sub>5</sub>. L'analyse chromatographique de la fraction F<sub>5</sub> ne nous a pas permis de définir sa composition, avec la méthode HPLC utilisée. Cette fraction F<sub>5</sub> étant encore trop complexe, nous avons poursuivi le fractionnement de cette fraction.

#### IV. 1. 2. 3. Chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P-2 : 100 < domaine de fractionnement < 1 800 Da

Les fractions F<sub>5</sub> issues du fractionnement des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer ont été déposées sur une matrice de Biogel P-2, permettant un deuxième fractionnement des molécules selon leur taille, avec cette fois un domaine de fractionnement plus fin compris entre 100 et 1 800 Da.

**Tableau 24 : Bilan du fractionnement par chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P2 des fractions F<sub>5</sub> issues du fractionnement des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer.**

Le bilan a été déterminé par pesée des fractions lyophilisées récoltées puis, les masses ont été exprimées en % par rapport à la masse totale récoltée.

Sous fractions collectées	Orjaune (%)	Nefer (%)
F <sub>5-1</sub>	13,1	24,2
F <sub>5-2</sub>	5,0	28,0
F <sub>5-3</sub>	9,5	12,8
F <sub>5-4</sub>	46,7	25,3
F <sub>5-5</sub>	25,6	9,8

**Tableau 25 : Quantités de chaque sous fraction, F<sub>5-1</sub> à F<sub>5-5</sub>, supplémentées aux milieux de culture pour l'étude de l'effet des sous fractions sur la mycotoxinogénèse.**

Sous fractions	Orjaune (mg/mL)	Nefer (mg/mL)
F <sub>5-1</sub>	0,074	0,254
F <sub>5-2</sub>	< 0,029	0,294
F <sub>5-3</sub>	0,054	0,134
F <sub>5-4</sub>	0,266	0,266
F <sub>5-5</sub>	0,146	0,103

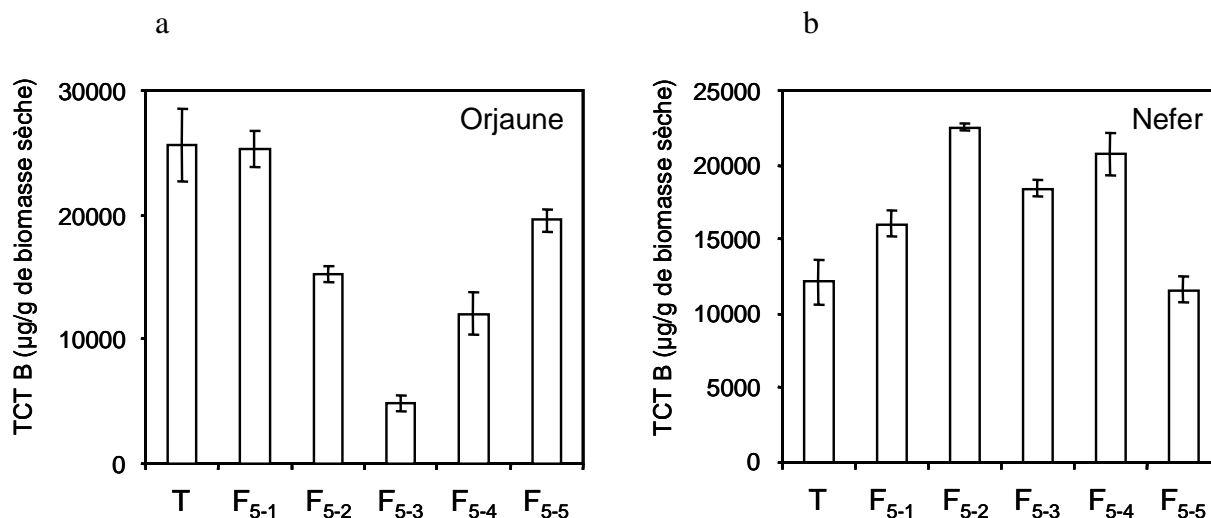
### **a. Profil chromatographique**

Après dépôt des fractions F<sub>5</sub> (19 mg de F<sub>5</sub> lyophilisée Orjaune et Nefer dissout dans 5 mL de la solution d'éluion) en tête de colonne, l'éluion des extraits a été réalisée avec une solution de tampon acétate (cf. Matériel et Méthodes, p. 60). En sortie de colonne, l'absorbance des éluats collectés est mesurée à 230, 260, 280 et 320 nm et conduit au profil chromatographique présenté sur la figure 65. En se basant sur le profil chromatographique obtenu, cinq sous fractions nommées de F<sub>5-1</sub> à F<sub>5-5</sub> ont été déterminées. Le fractionnement des fractions F<sub>5</sub> des sons de Nefer a donné un profil chromatographique similaire. Cependant, le bilan du fractionnement est différent entre Orjaune et Nefer (tableau 24). Il ne sera pas possible de comparer Orjaune et Nefer au cours de cette expérimentation.

### **b. Effet des sous fractions F<sub>5-1</sub> à F<sub>5-5</sub> sur la mycotoxinogénèse**

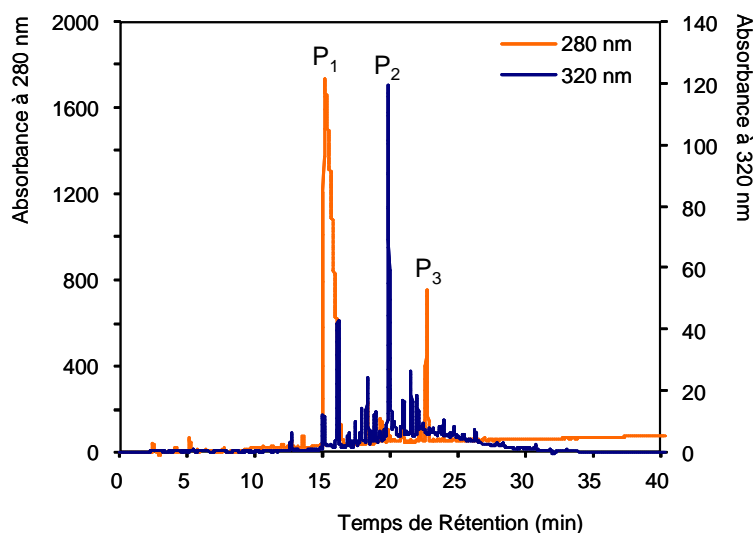
Les cinq sous fractions issues du fractionnement de la fraction F<sub>5</sub> de Orjaune ont été testées *in vitro* vis-à-vis de la biosynthèse de mycotoxines par *F. culmorum* (INRA 117). Comme précédemment, chacune des sous fractions lyophilisées a été individuellement supplémentée au milieu de culture (quantités supplémentées, tableau 25) et leur effet sur la production de biomasse sèche et sur la biosynthèse de toxines a été évalué après 10 jours de culture (figure 66a). Comme témoin de culture, nous avons supplémenté aux cultures une sous fraction lyophilisée éluee en fin de chromatographie et ne présentant aucune absorbance (figure 65). Les niveaux de TCT B produits lorsque F<sub>5-1</sub> est supplémenté au milieu de culture ne sont pas significativement différents du témoin. Par contre, les sous fractions F<sub>5-2</sub>, F<sub>5-3</sub>, F<sub>5-4</sub> et F<sub>5-5</sub> ont un effet inhibiteur de la biosynthèse des TCT B de 41% avec F<sub>5-2</sub>, 81% avec F<sub>5-3</sub>, 53% avec F<sub>5-4</sub> et 24% avec F<sub>5-5</sub>. Un ou des composés ayant une forte activité inhibitrice semblent donc présents majoritairement dans la sous fraction F<sub>5-3</sub> de Orjaune.

La même expérimentation a été réalisée avec les cinq sous fractions issues du fractionnement des fractions F<sub>5</sub> de Nefer (quantités supplémentées, tableau 25) (figure 66b). Les niveaux de TCT B produits lorsque la sous fraction F<sub>5-5</sub> est supplémentée au milieu de culture ne sont pas différents du témoin. Aucune des autres sous fractions n'a d'effet inhibiteur, les sous fractions F<sub>5-1</sub>, F<sub>5-2</sub>, F<sub>5-3</sub> et F<sub>5-4</sub> semblent plutôt avoir un effet activateur de la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum*.



**Figure 66 : Effet des sous fractions F<sub>5-1</sub> à F<sub>5-5</sub>, issues des fractionnements des sons des variétés Orjaune (a) et Nefer (b), sur la biosynthèse des TCT B par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée sur milieu MS.**

Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. La production de biomasse sèche est peu modifiée par la supplémentation des sous fractions aux milieux de culture (données non représentées). Les sous fractions F<sub>5-1</sub> à F<sub>5-5</sub> sont issues du fractionnement par chromatographie d'exclusion sur gel de Biogel P-2 des fractions F<sub>5</sub> elles-mêmes issues du fractionnement des extraits polaires des sons des variétés Orjaune et Nefer. T : Témoin



**Figure 67 : Profil chromatographique obtenu après analyse par HPLC-DAD de la sous fraction F<sub>5-3</sub> issue des sons de la variété Orjaune.**

Trois pics ont été identifiés et nommés P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub>.



Ces résultats suggèrent la présence de composés activateurs de la biosynthèse des TCT B dans les sous fractions de Nefer. Cependant, comme les cultures n'ont pas été supplémentées par les mêmes quantités de matériel des sous fractions issues de Orjaune et de Nefer, il n'est pas possible de comparer les résultats. Cependant, contrairement à ce qui a été observé pour Orjaune, aucune des sous fractions de Nefer n'a un effet inhibiteur de la biosynthèse des toxines, ce qui va dans le même sens que l'observation du peu d'effet de la fraction F<sub>5</sub> de Nefer (figure 64).

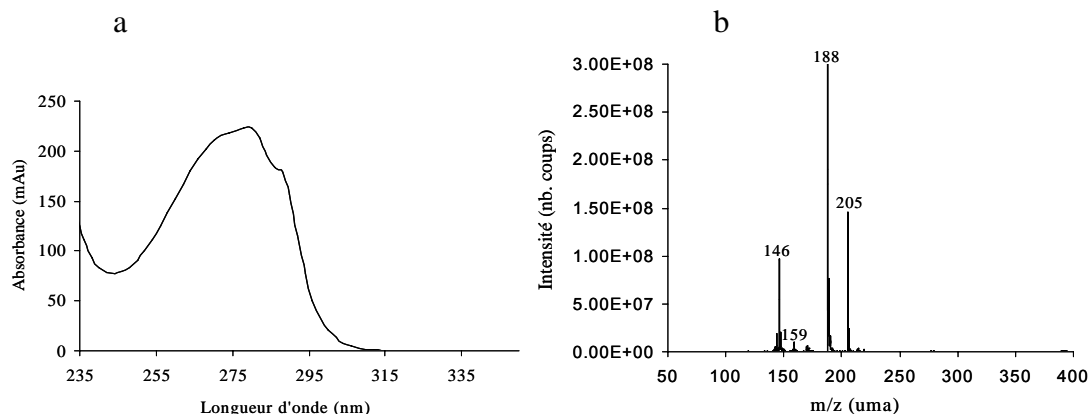
### c. Analyse des sous fractions par HPLC-DAD

Un aliquot de 2 mg de chaque lyophilisat des sous fraction F<sub>5-2</sub>, F<sub>5-3</sub> et F<sub>5-4</sub> issues des sons des variétés Orjaune et Nefer a été analysé par HPLC-DAD et les chromatogrammes obtenus ont été comparés. La figure 67 présente le chromatogramme obtenu pour l'échantillon de la sous fraction F<sub>5-3</sub> issue des sons de la variété Orjaune. Le chromatogramme révèle la présence de trois pics ; pour l'instant nommés P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub>. Les pics 1 et 3 ont un maximum d'absorption à 280 nm alors que le pic 2 a un maximum d'absorption à 320 nm. Ces trois pics sont également présents dans les sous fractions F<sub>5-2</sub> et F<sub>5-4</sub> de Orjaune. Dans les sous fractions F<sub>5-2</sub>, F<sub>5-3</sub> et F<sub>5-4</sub> de Nefer, ces trois pics sont présents mais à des concentrations plus faibles. La concentration des composés présents dans P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub> a été estimée à partir de la surface des pics. Si l'on considère F<sub>5-2</sub>, F<sub>5-3</sub> et F<sub>5-4</sub>, nous avons estimé que le composé du pic 1 était 1,5 fois, le pic 2 6,7 fois et le pic 3 2,8 fois plus concentré dans les sons de Orjaune que dans les sons de Nefer.

#### IV. 1. 2. 4. HPLC semi-préparative

Les composés correspondant au pic 1, au pic 2 et au pic 3 de la variété Orjaune ont été purifiés à partir d'une grande quantité de F<sub>5-3</sub> (12 mg) par HPLC semi-préparative.

Les composés purifiés ont ensuite été caractérisés par spectrométrie de masse.



**Figure 68 : Spectre UV (a) et spectre de masse en mode d'ionisation positif (b) du composé correspondant au pic 1.**

**Tableau 26 : Caractéristiques et fragments obtenus pour le composé du pic 1 en mode d'ionisation positif.**

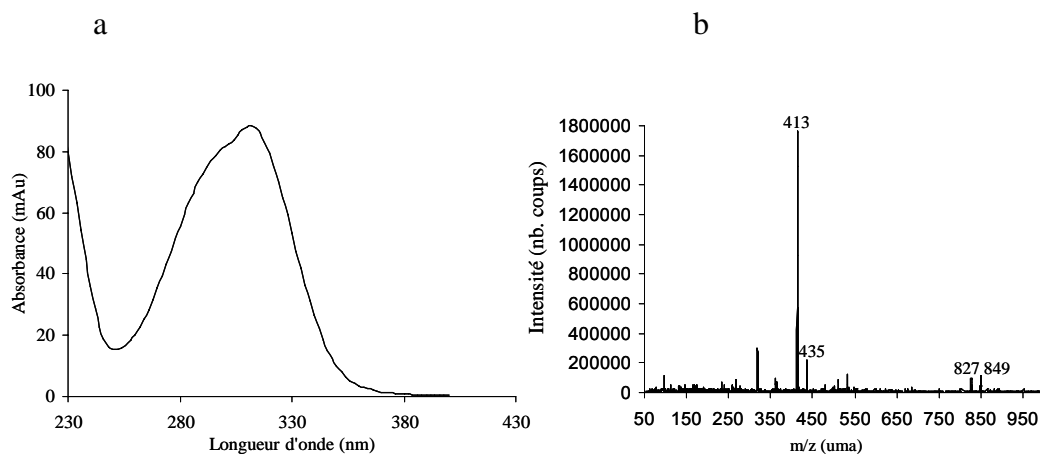
Caractéristiques composé du pic 1		
tr (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	MM (g/mol)
15,3	280	204

MS Ionisation positive		
m/z	différence de masse	identification
205	+1	$[M+H]^+$
188	+1-17	$[M+H-NH_3]^+$
159	+1-46	$[M+H-H_2O-CO]^+$
146	+1-59	$[M+H-NH_3-CH_2CO]^+$

Conclusion: composé du pic 1 = <b>tryptophane</b>		
---	--	--



**Figure 69 : Spectre UV (a) et spectre de masse en mode d'ionisation négatif (b) du composé correspondant au pic 2.**

## IV. 2. Caractérisation par HPLC-MS/MS des entités candidates isolées des sons de la variété Orjaune

La caractérisation des composés purifiés a été réalisée par analyse en HPLC-UV/MS, sur la base de leur temps de rétention, de leur spectre UV-VIS et de leur spectre de masse.

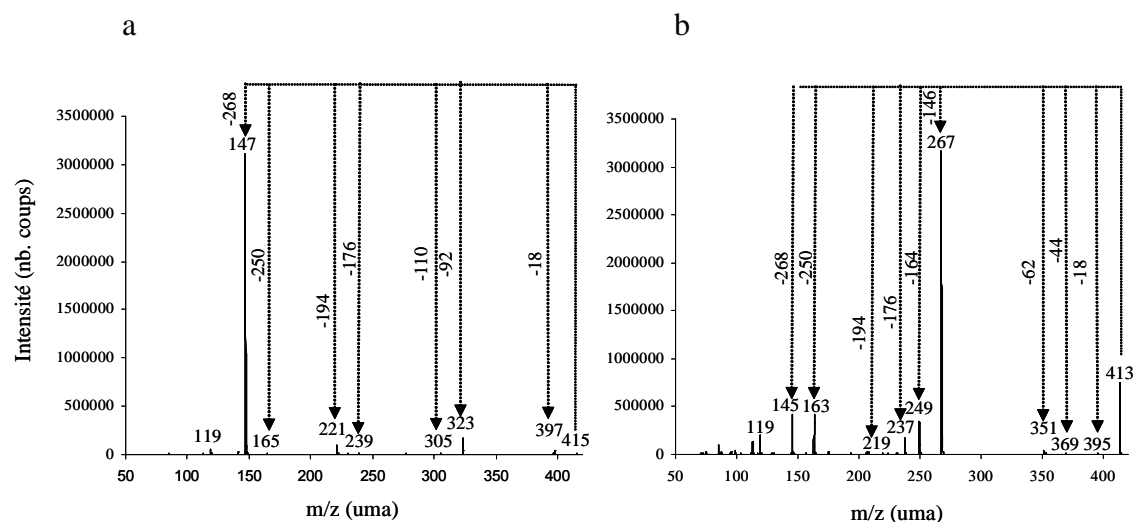
### IV. 2. 1. Caractérisation du composé présent dans le pic 1

Le composé du pic 1 est élué à 15,3 min. Son spectre UV-VIS, obtenu par HPLC-DAD est présenté sur la figure 68a. Ce spectre est caractéristique des molécules possédant un noyau aromatique ( $\lambda_{\max} = 280$  nm). Le spectre de masse du composé du pic 1, obtenu par HPLC-UV/MS en mode d'ionisation positif, est présenté sur la figure 68b. L'analyse de ce composé donne un signal à  $m/z$  205 pour l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  et montre la présence des fragments à  $m/z$  188, 159 et 146 correspondant respectivement à la perte des groupements  $NH_3$  (-17 uma),  $H_2O+CO$  (-46 uma) et  $NH_3+CH_2CO$  (-59 uma) (tableau 26). Ces fragments sont caractéristiques des acides aminés (Bourcier *et al.*, 2006). La masse moléculaire de 204 correspond à l'acide aminé tryptophane. Ce résultat a été confirmé par l'analyse en HPLC-MS/MS d'un standard de tryptophane (poudre commerciale) qui montre des caractéristiques (temps de rétention, spectre UV-VIS et spectre de masse) identiques au composé du pic 1. Le pic 1 correspond donc au tryptophane.

### IV. 2. 2. Caractérisation du composé présent dans le pic 2

Le composé du pic 2 est élué à 19,9 min. Son spectre UV-VIS, obtenu par HPLC-DAD, est présenté sur la figure 69a. Ce spectre est caractéristique des acides phénoliques et plus particulièrement des acides cinnamiques avec un maximum d'absorption à 312 nm et un léger épaulement à 295 nm.

Le spectre de masse du composé du pic 2, obtenu par HPLC-UV/MS en mode d'ionisation négatif, est présenté sur la figure 69b. L'analyse de ce composé donne des signaux à  $m/z$  413 et 435 que l'on attribue respectivement à l'ion moléculaire  $[M-H]^-$  et à son adduit sodium  $[M-H+Na]^-$ . Cette hypothèse est confirmée par la présence des signaux à  $m/z$



**Figure 70 : Spectres de fragmentation MS<sup>2</sup> de la molécule de masse 414 en mode d'ionisation positif (a) et négatif (b).**

**Tableau 27 : Caractéristiques et fragments obtenus pour le composé du pic 2 en mode d'ionisation positif.**

Caractéristiques composé du pic 2		
tr (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	MM (g/mol)
19,9	312	414
MS <sup>2</sup> Ionisation positive		
m/z	différence de masse	identification / hypothèse
397	+1-18	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
323	+1-92	dimère <i>p</i> -coumarique (-H <sub>2</sub> O) / férulique (-H <sub>2</sub> O) ou dimère férulique (-H <sub>2</sub> O) / férulique (-H <sub>2</sub> O-OCH <sub>3</sub> )
305	+1-92-18	dimère 323 -H <sub>2</sub> O
239	+1-176	[M+H-férulique-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
221	+1-194	[M+H-férulique] <sup>+</sup>
165	+1-250	acide <i>p</i> -coumarique (+H) ou ferulique (+H-OCH <sub>3</sub> )
147	+1-176	acide <i>p</i> -coumarique (+H-H <sub>2</sub> O) ou férulique (+H-OCH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O)
Composé du pic 2 = dimère férulique/férulique + 28 ou dimère férulique / <i>p</i> -coumarique + 58		

827 et 849 qui ne correspondent pas à des dimères mais à des empilements des ions moléculaires  $[M-H]^- + M$  et  $[M-H+Na]^- + M$  respectivement.

Des informations supplémentaires sont obtenues après fragmentation MS/MS (ou MS<sup>2</sup>) en mode d'ionisation positif et négatif (figure 70a et 70b). La fragmentation MS<sup>2</sup> de l'ion à  $m/z$  415 en mode d'ionisation positif (figure 70a, tableau 27) montre la présence des ions à  $m/z$  397, 323, 305, 239, 221, 165 et 147, ce qui indique que plusieurs schémas de fragmentation sont possibles. L'ion à  $m/z$  397 correspond à la perte d'une molécule d'eau. L'ion à  $m/z$  323 pourrait correspondre à un dimère constitué d'une unité d'acide *p*-coumarique déshydraté et d'une unité d'acide férulique déshydraté ou un dimère d'acide férulique déshydraté qui aurait perdu un groupement méthoxy (OCH<sub>3</sub>). Quant aux ions à  $m/z$  239 et 221, ils résultent probablement de la perte de l'acide férulique. L'ion  $m/z$  221 résulte de la perte du fragment C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> et l'ion  $m/z$  239 résulte de la perte du fragment C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>. Les ions à  $m/z$  165 et 147 pourraient correspondre à l'acide *p*-coumarique  $[M+H]^+$  et  $[M+H-H_2O]^+$  ou à l'acide férulique ayant perdu le groupement méthoxy  $[M+H-OCH_3]^+$  et  $[M+H-OCH_3-H_2O]^+$ .

La fragmentation MS<sup>2</sup> de l'ion à  $m/z$  413 en mode d'ionisation négatif (figure 70b) confirme la présence des acides férulique et/ou *p*-coumarique dans le composé du pic 2. Cette fragmentation MS<sup>2</sup> montre les mêmes voies de fragmentation qu'en mode positif, mais certaines voies sont favorisées.

Concernant le composé présent dans le pic 2, les résultats obtenus suggèrent que ce composé serait constitué de deux molécules d'acide phénolique. Il s'agirait soit d'un hétérodimère d'acide férulique et d'acide *p*-coumarique soit d'un dimère d'acide férulique. Si l'on considère la première hypothèse, un hétérodimère d'acide férulique et d'acide *p*-coumarique présente une différence de masse de 58 par rapport à la masse molaire du composé du pic 2. Un tel dimère n'a pas été décrit dans la littérature, cependant, d'autres composés tels des hétérodimères d'acide férulique/acide sinapique ont été identifiés dans les céréales (Bunzel *et al.*, 2003). Par conséquent, l'existence d'un hétérodimère d'acide férulique/acide *p*-coumarique n'est pas à exclure. Actuellement, nous n'avons pas pu associer la masse de 58 à un quelconque radical. Au regard de la bibliographie, plusieurs dimères d'acides férulique identifiés chez le blé sont présentés sur la figure 71. Tous sont des dimères constitués de deux molécules d'acide férulique et ont une masse molaire de 386. Si l'on considère notre deuxième hypothèse, un dimère d'acide férulique présente une différence de masse de 28 par rapport à la masse molaire du composé du pic 2. Cette différence pourrait correspondre à une liaison plus complexe entre les deux monomères d'acide férulique ou à l'ajout d'un radical sur un ou les deux monomères. Par exemple, cette masse de 28 pourrait

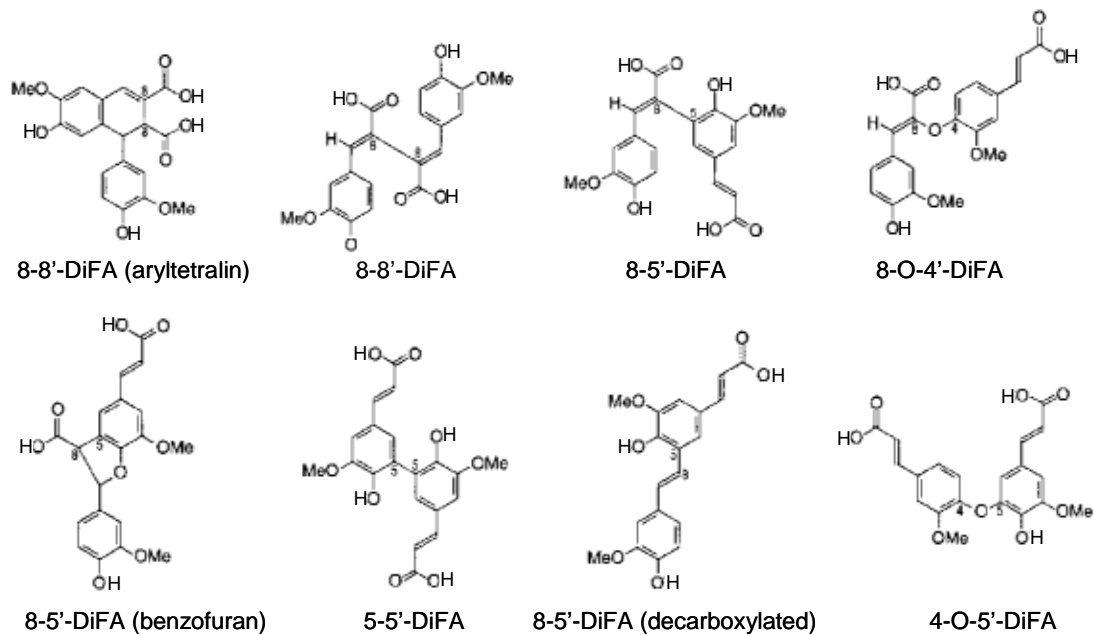


Figure 71 : Dimères d'acide férulique du blé (Bunzel *et al.*, 2001).

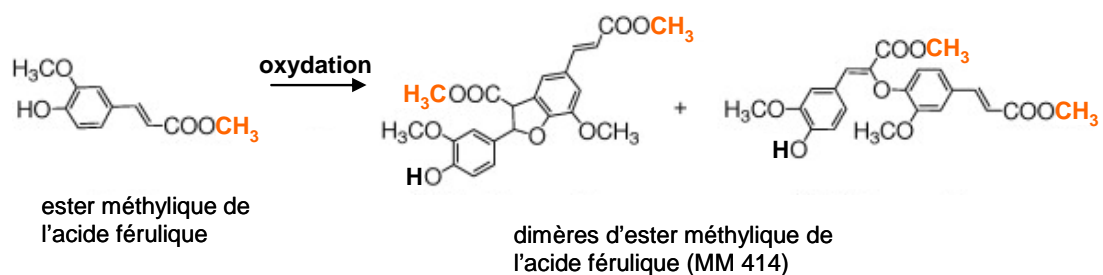


Figure 72 : Dimères d'ester méthylique de l'acide férulique obtenus après synthèse chimique (Rakotondramanana *et al.*, 2007).

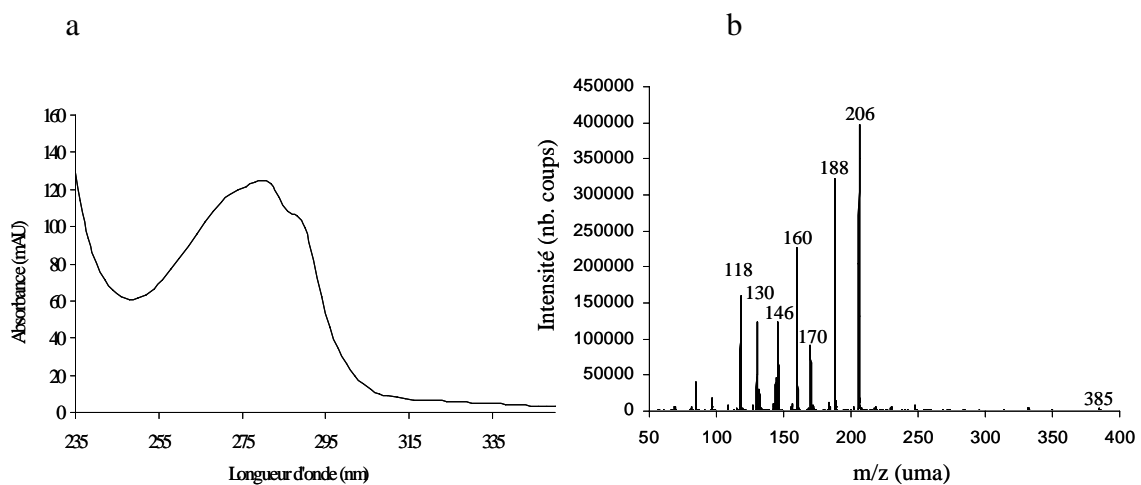


Figure 73 : Spectre UV-VIS du composé correspondant au pic 3 (a) et spectre de fragmentation MS<sup>2</sup> de l'ion à m/z 385 en mode d'ionisation positif (b).

correspondre à l'ajout d'un groupement cétone (C=O) ou à l'ajout de deux groupements méthyles (CH<sub>3</sub>). Une structure correspondante à ce deuxième type (présence de deux groupements méthylés CH<sub>3</sub>) a été récemment décrite dans la littérature (Rakotondramanana *et al.*, 2007). Ce dimère d'acide férulique a une masse molaire de 414 et pourrait donc correspondre à notre dimère. Ce dimère a été synthétisé par oxydation au dioxyde d'argent de l'ester méthylique de l'acide férulique (figure 72). La présence de ce dimère dans la plante est fortement probable du fait que des monomères d'acide férulique méthylée ont été identifiés dans l'oignon vert (Xiao et Parkin, 2007). Les dimères décrits chez le blé ont été obtenus après dégradation des parois cellulaires. Cette étape hydrolyse les liaisons ester ce qui expliquerait que ce type de dimère n'a pas été mis en évidence jusqu'à présent. Dans notre étude, ce dimère est issu d'une fraction soluble, il n'y a donc pas eu d'hydrolyse ce qui pourrait expliquer la présence de ces groupements méthylés. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier notre hypothèse.

#### IV. 2. 3. Caractérisation du composé présent dans le pic 3

Le composé du pic 3 est élué à 22,7 min. Son spectre UV-VIS, obtenu par HPLC-DAD, est présenté sur la figure 73a. Ce spectre est caractéristique des molécules possédant un noyau aromatique ( $\lambda_{\max} = 280$  nm) et est proche de celui du composé du pic 1, le tryptophane.

Le spectre de masse du composé du pic 3, obtenu par HPLC-UV/MS en mode d'ionisation positif, montre un signal à  $m/z$  385 pour l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  et la présence des fragments à  $m/z$  368, 206, 188 et 146 (tableau 28). L'ion à  $m/z$  368 est attribué à la perte d'un groupement NH<sub>3</sub> (-17 uma). Les ions à  $m/z$  206, 188 et 146 sont similaires aux fragments obtenus lors de la fragmentation du composé du pic 1, confirmant la présence du tryptophane.

La fragmentation MS<sup>2</sup> de l'ion à  $m/z$  385 en mode d'ionisation positif confirme cette hypothèse (figure 73b). Le spectre de fragmentation MS<sup>2</sup> obtenu est identique à celui du tryptophane.

Le composé du pic 3 a une masse molaire de 384 et contient du tryptophane dont la masse molaire est 204. Il existe donc une différence de masse de 180 dont nous n'avons pas pu déterminer la nature. Des analyses supplémentaires sont nécessaires.

Les composés purifiés et caractérisés ont parallèlement été testés *in vitro* pour leur effet sur la biosynthèse de TCT B par *F. culmorum*.

**Tableau 28 : Caractéristiques et fragments obtenus pour le composé du pic 3 en mode d'ionisation positif.**

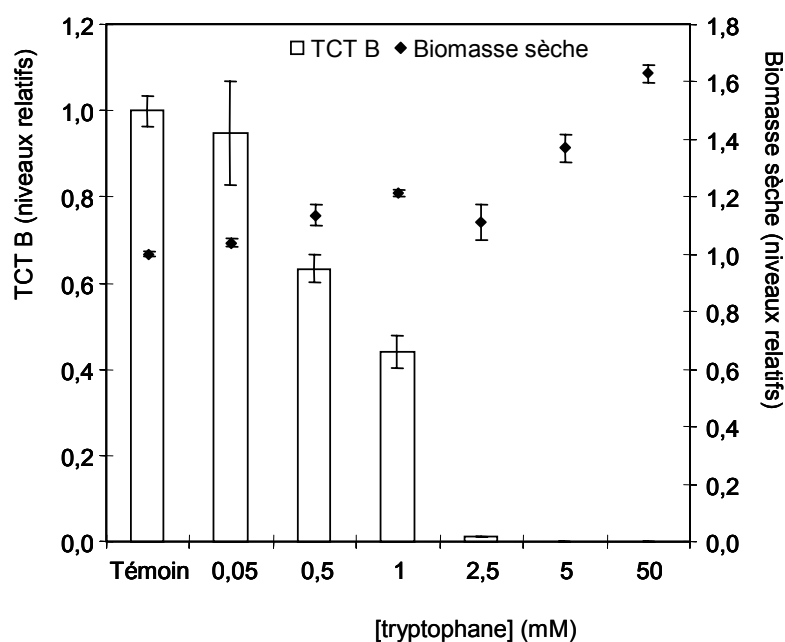
Caractéristiques composé du pic 3		
tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	MM (g/mol)
22,7	280	384

MS Ionisation positive		
m/z	différence de masse	identification
385	+1	$[M+H]^+$
368	+1-17	$[M+H-NH_3]^+$
206	+1-179	tryptophane +2
188	+1-197	tryptophane +1-17
146	+1-239	tryptophane +1-59

Composé du pic 3 = <b>tryptophane + autre (MM 180)</b>		
--	--	--



**Figure 74 : Production de biomasse sèche et biosynthèse de TCT B par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée sur milieu MS supplémenté ou non par différentes concentrations en tryptophane.**

Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. Les niveaux de biomasse sèche produite et de TCT B sont exprimés en niveaux relatifs par rapport aux niveaux dans le témoin.



### **IV. 3. Effet des entités candidates isolées des sons de la variété Orjaune sur la mycotoxinogénèse**

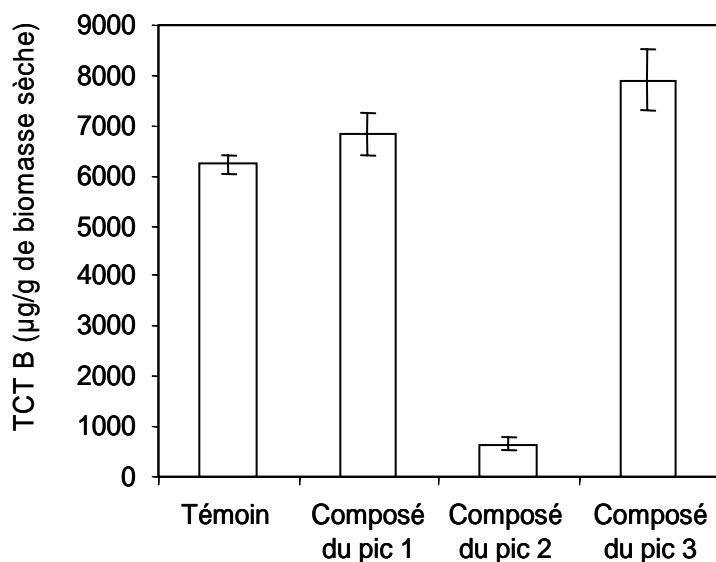
#### **IV. 3. 1. Effet du tryptophane, "molécule candidate"**

Le composé du pic 1 est du tryptophane et le composé du pic 3 contient un radical de tryptophane. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons voulu évaluer l'effet du tryptophane (poudre commerciale) sur la mycotoxinogénèse. Du tryptophane a été supplémenté au milieu de culture à différentes concentrations (concentration finale de 0 à 50 mM) et son effet sur la production de biomasse sèche et sur la biosynthèse de toxines a été évalué après 10 jours de culture (figure 74). La production de biomasse sèche est peu affectée par la supplémentation des milieux de culture en tryptophane pour les concentrations de 0,05 ; 0,5 ; 1 et 2,5 mM. Pour des concentrations en tryptophane de 5 et 50 mM, la production de biomasse fongique sèche est augmentée. En ce qui concerne les niveaux de TCT B accumulés dans les milieux de culture, le tryptophane, à une concentration égale et supérieure à 0,5 mM, a un effet inhibiteur effectif de la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum*.

Le tryptophane, testé ici à différentes concentrations, semble avoir un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse sans affecter la croissance de *Fusarium* pour des concentrations comprises entre 0,5 et 2,5 mM. Dans l'essai avec la fraction F<sub>5-3</sub> Orjaune, la concentration en tryptophane a été estimée égale à environ 0,05 mM. Compte tenu des résultats obtenus sur l'effet du tryptophane (poudre commerciale) sur la mycotoxinogénèse, une concentration de 0,05 mM en tryptophane n'a pas d'effet sur la biosynthèse de toxines (figure 74). Par conséquent, ce résultat suggère que le tryptophane contenu dans la sous fraction F<sub>5-3</sub> Orjaune ne serait pas assez concentré pour participer à l'inhibition de la biosynthèse des toxines observée avec cette sous fraction.

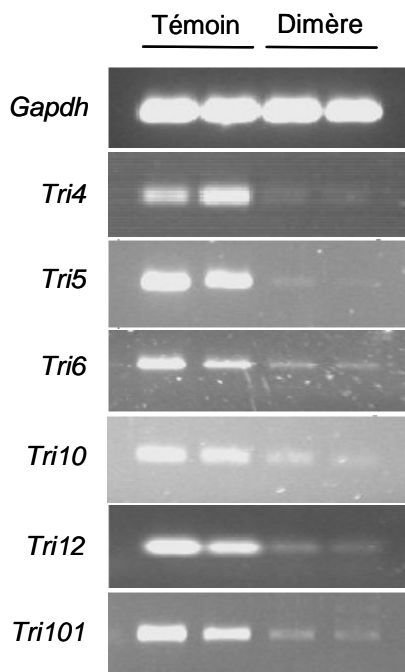
#### **IV. 3. 2. Effet des molécules purifiées après HPLC semi-préparative**

Les trois composés correspondant au pic 1, au pic 2 et au pic 3 issus des fractionnements des sons de la variété Orjaune ont été testés *in vitro* vis-à-vis de la biosynthèse de mycotoxines par *F. culmorum* (INRA 117). Les composés 1 (0,071 mg/mL), 2 (<0,029 mg/mL) et 3 (<0,029 mg/mL) ont été individuellement supplémentés au milieu de culture



**Figure 75 : Effet des composés correspondant aux pics 1, 2 et 3 sur la biosynthèse des TCT B par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée sur milieu MS.**

Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. Les composés des pics 1, 2 et 3 ont été purifiés par HPLC semi-préparative à partir de la sous fraction F<sub>5-3</sub> issues du fractionnement des sons de la variété Orjaune.



**Figure 76 : Evaluation sur gel d'agarose des produits obtenus après PCR pour les gènes *Gapdh*, *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Tri101* en condition témoin et en condition de cultures supplémentées par le dimère d'acides phénoliques.**

avant inoculation et leur effet sur la production de biomasse sèche et sur la biosynthèse de toxines a été évalué après 10 jours de culture (figure 75). La supplémentation des milieux de culture par les composés 1, 2 et 3 n'affecte pas la production de biomasse sèche (données non représentées). En ce qui concerne l'accumulation de toxines dans les milieux de culture, le composé du pic 1 (le tryptophane à 0,3 mM) n'a pas d'effet sur les niveaux de TCT B produits. Ceci est en accord avec nos résultats précédents montrant qu'un effet inhibiteur de la toxinogénèse n'était observé qu'à partir de 0,5 mM de tryptophane supplémenté aux cultures. Le composé présent dans le pic 3, de nature peptidique, montre un effet légèrement activateur de la biosynthèse de TCT B. Par contre, les niveaux de TCT B produits lorsque le composé correspondant au pic 2, le dimère d'acides phénoliques, est supplémenté au milieu de culture sont fortement inhibés (90% d'inhibition). Connaissant la masse supplémentée au milieu de culture et le poids moléculaire du composé 2 (414), la concentration du dimère d'acides phénoliques dans le milieu de culture a été estimée inférieure à 70  $\mu$ M.

En conclusion, nous avons donc attribué un pouvoir inhibiteur important de la mycotoxinogénèse au composé ayant une structure de dimère d'acides phénoliques, présent dans le pic 2. L'inhibition de la mycotoxinogénèse observée précédemment avec la fraction F<sub>5-3</sub> pourrait être attribuée à l'action de ce dimère d'acides phénoliques. L'identification définitive et la synthèse chimique de ce composé permettraient de confirmer cette hypothèse.

#### **IV. 4. Effet du dimère d'acides phénoliques sur l'expression de certains gènes *Tri* impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B**

Le dimère d'acides phénoliques a un effet inhibiteur important de la biosynthèse des TCT B. Afin d'analyser un possible contrôle transcriptionnel impliqué dans cette inhibition de la biosynthèse des TCT B, l'expression de certains gènes *Tri* impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B a été étudié par PCR. Les extractions d'ARN ont été réalisées sur des mycéliums âgés de cinq jours. L'expression de la *Gapdh*, un gène de référence, de *Tri5*, *Tri4*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12* et *Tri101* a été comparée dans les cultures témoin et dans les cultures supplémentées avec le dimère.

Pour chaque condition, les produits obtenus après PCR sont estimés sur gel d'agarose (figure 76). L'expression de la *Gapdh* ne semble pas varier entre la condition témoin et la condition traitée. L'expression des gènes *Tri* semble bien moins importante dans la condition traitée que dans la condition témoin puisque la quantité de produits obtenus après 28 cycles



lors de la PCR sur les ADNc est beaucoup plus faible. Ces résultats sont en accord avec nos résultats précédents montrant un effet inhibiteur des acides phénoliques sur la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum* concordant avec une réduction significative de l'expression de divers gènes *Tri* (cf. Chapitre II et III).

Nos résultats suggèrent que dans les cultures supplémentées avec le dimère, l'inhibition de la biosynthèse des TCT B pourrait être reliée à une diminution de l'expression des gènes *Tri* étudiés. Ces résultats doivent être confirmés par une analyse par PCR quantitative.

#### **IV. 5. Purification et identification de composés inhibiteurs présents dans les sons de blé dur : Conclusions**

L'objectif du quatrième chapitre de cette thèse était de rechercher des composés modulateurs de la biosynthèse des TCT B présents dans les sons de blé dur à l'aide d'une démarche sans a priori sur la nature de ces composés. Nous avons identifié un composé avec un fort effet "anti mycotoxines". Ce composé est en fait un dimère d'acides phénoliques. Il s'agirait soit d'un dimère d'acide férulique soit d'un hétérodimère d'acide férulique et d'acide *p*-coumarique. La liaison reliant ces deux acides phénoliques est à ce jour de nature inconnue. Ce composé a une masse molaire de 414. La caractérisation exacte de ce composé devra être réalisée. Elle nécessitera pour cela la purification d'environ 10 mg de cette molécule pour pouvoir réaliser une analyse en RMN. Lorsque ce dimère sera définitivement identifié, il conviendra d'étudier les mécanismes de l'inhibition de la toxinogénèse.

Ce dimère d'acides phénoliques a été isolé de la fraction soluble des sons. Cependant, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que ce dimère ait pu se former au cours des étapes de fractionnement des sons. La quantité de ce dimère d'acides phénoliques a été estimée inférieure à 3,8 µg/g de sons pour la variété Orjaune. A titre de comparaison, l'acide férulique soluble libre est présent à des concentrations de 3,9 µg/g de sons pour la variété Orjaune. Il semble donc que les sons de la variété Orjaune contiennent autant d'acide férulique soluble que de ce dimère soluble. Une concentration de 0,5 mM en acide férulique induit une inhibition de 90% de la biosynthèse des toxines par la souche de *F. culmorum* INRA 117 (cf. Chapitre II, p 106). Le dimère d'acides phénoliques a un effet inhibiteur puissant de la biosynthèse des TCT B par *Fusarium* puisqu'à une concentration estimée inférieure à 70 µM, il inhibe à 90 % la production de TCT B par la souche INRA 117. Par conséquent, il semble qu'à quantités équivalentes dans les sons, le dimère d'acides phénoliques aurait une efficacité



inhibitrice de la mycotoxinogénèse environ 10 fois supérieure que l'acide férulique. L'inhibition de la biosynthèse des TCT B par ce dimère d'acides phénoliques serait liée à une diminution globale du niveau d'expression de divers gènes *Tri* impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B.

Ce dimère d'acides phénoliques serait présent dans les sons des variétés Orjaune mais également dans les sons des variétés Nefer. Cependant, nos résultats ont montré que ce composé était 6,7 fois plus concentré dans les sons de Orjaune que dans les sons de Nefer. Le pouvoir inhibiteur de ce dimère d'acides phénoliques associé à une importante différence de concentration entre les variétés Orjaune et Nefer est en faveur de notre hypothèse initiale d'une différence quantitative d'un ou plusieurs composés inhibiteurs entre les variétés et non celle de la présence ou de l'absence d'une entité inhibitrice ou activatrice. La différence de sensibilité à l'accumulation de mycotoxines entre les variétés Orjaune et Nefer pourrait être reliée à la différence de teneurs en ce dimère d'acides phénoliques.

Dans ses travaux, Bily (2003) avait démontré un rôle des dimères d'acides phénoliques dans les mécanismes de résistance à la fusariose chez le maïs. Par contre, un rôle des dimères d'acides phénoliques vis à vis de la mycotoxinogénèse n'avait jamais été rapporté. Dans le chapitre III de cette thèse, nous suggérions que les formes oligomériques de l'acide férulique liés aux parois pourraient être des inhibiteurs potentiels de la mycotoxinogénèse. Dans ce chapitre, après avoir mené une démarche "sans à priori", nous avons à nouveau identifié un dimère d'acides phénoliques avec un puissant effet "anti mycotoxines". Ceci est un nouvel argument en faveur de l'action de dimères d'acides phénoliques comme composé de la plante pouvant avoir un effet potentiel sur l'accumulation de toxines dans les grains fusariés.





## **Discussion générale et Perspectives**



Au cours de ce travail de thèse, la recherche dans les sons de blé dur de composés modulateurs de la mycotoxinogénèse a été entreprise. Deux avancées majeures ressortent de cette étude. Tout d'abord, nous avons montré que les acides phénoliques interfèrent avec la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. En particulier, les acides férulique, *p*-coumarique et sinapique, qui constituent les acides phénoliques majoritaires des sons de blé inhibent la toxino-génèse de *Fusarium* dans nos conditions de culture. Ensuite, nous avons mis en évidence que des dimères d'acides phénoliques extraits des sons de blé dur sont également de puissants inhibiteurs de la biosynthèse des toxines. Nos résultats permettent même de suggérer que leur efficacité "anti mycotoxines" serait plus importante que celle des acides phénoliques.

### **1. L'étude *in vitro* en cultures liquides de la régulation de la mycotoxinogénèse de *Fusarium* nécessite des conditions expérimentales adaptées**

Afin de rechercher des composés ayant un effet sur la production de toxines par *Fusarium*, il était indispensable de disposer de conditions expérimentales adaptées pour l'étude *in vitro* de la régulation de la mycotoxinogénèse. Pour cela, il était nécessaire de limiter les fluctuations inter expérimentations et surtout intra expérimentations du potentiel toxino-gène en cultures liquides afin de pouvoir apprécier un éventuel effet modulateur de certains composés sur la biosynthèse des toxines par *Fusarium*. Il était également important de miniaturiser le système de culture, afin d'augmenter le nombre d'essais et de limiter les quantités de composés du grain de blé à supplémenter aux cultures.

En ce qui concerne les fluctuations inter expérimentations du potentiel toxino-gène de *Fusarium*, l'utilisation d'un milieu de culture synthétique n'a pas permis de résoudre ce problème. Les fluctuations inter expérimentations du potentiel toxino-gène existent quels que soient le milieu et le système de culture utilisés et sont de cause inconnue. Notre hypothèse est qu'elles sont liées au métabolisme fongique plutôt qu'aux conditions de culture. Le milieu de culture synthétique a été utilisé tout au long de l'étude afin d'éviter d'éventuelles interférences entre les composés individuels à tester et des composés organiques contenus dans l'extrait de levure, constituant du milieu liquide GYEP (milieu classiquement utilisé au laboratoire).

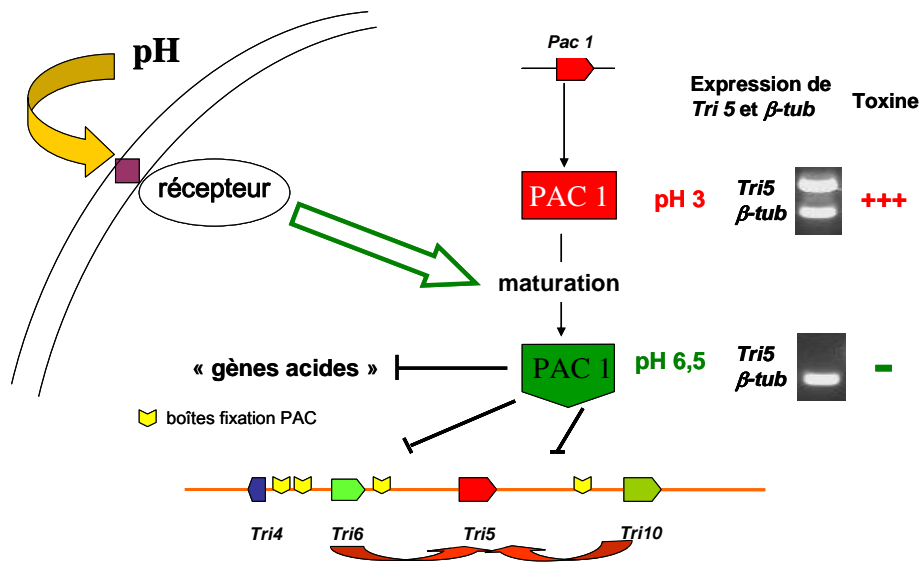
Nous avons mis au point un système de culture statique de *Fusarium* en petite boîte de Pétri sur milieu synthétique liquide afin d'étudier la toxino-génèse. Nous avons montré qu'avec un tel système de culture, les fluctuations intra expérimentations du potentiel



toxigène de *Fusarium* sont considérablement réduites, ce qui était primordial pour notre étude. L'agitation des cultures induit des développements morphologiques différents et aléatoires du mycélium selon les répétitions, qui conduiraient alors à des rendements de toxines produits différents. Nous préconisons pour les études futures de travailler en cultures statiques afin de palier ce type de problèmes.

De plus, nos résultats montrent que les niveaux de toxines produits par *Fusarium* sont plus importants en cultures statiques qu'en cultures agitées. Miller *et al.* (1983) ont également observé une production de TCT B plus importante en cultures statiques. Ils suggèrent qu'en conditions de culture statique, l'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> (due à la respiration du champignon et à la diminution des échanges) pourrait être un facteur activateur de la mycotoxinogénèse. Par ailleurs, Bakan (1998) a montré que l'immobilisation du champignon *F. graminearum* sur des mousses de polyacrylate dans les cultures standard favorisait la biosynthèse des TCT B (jusqu'à 10 fois supérieure). De plus, dans notre étude, nous avons montré l'importance de l'acidification du pH du milieu de culture concomitante avec la production de trichothécènes B. Il est possible que le pH local du milieu de culture perçu par le champignon soit différent lorsque les cultures sont agitées ou statiques. En effet, en conditions statiques, le pH "local" du milieu environnant le mycélium pourrait s'acidifier brutalement alors qu'en cultures agitées, l'acidification pourrait être plus progressive car diluée dans tout le milieu. Ceci pourrait expliquer pourquoi il y a plus de toxines produites en cultures statiques qu'en cultures agitées.

Dans notre étude, nous avons suggéré qu'il pourrait exister une relation entre l'acidification du pH du milieu de culture, l'induction de l'expression du gène *Tri5* et la production de trichothécènes B. Chez les champignons filamenteux, la régulation par le pH fait intervenir un facteur de transcription PAC (Peñalva et Arst, 2002 ; Peñalva et Arst, 2004). Chez *Aspergillus*, *Pac C* code ce facteur de transcription. Celui-ci est maturé en milieu basique ou neutre et cette forme maturée réprime la transcription de gènes exprimés seulement en condition acide (Peñalva et Arst, 2002). Lorsque le pH devient inférieur à 4, PAC C n'est plus maturé et la répression qu'il exerce est alors levée. Les "gènes acides" sont alors dé-réprimés (Arts et Peñalva, 2003). Des expériences préliminaires menées au laboratoire suggèrent un lien entre l'expression de *Pac 1* de *Fusarium* (l'homologue probable de *Pac C* chez *Aspergillus*) et l'expression de *Tri5*. En effet, en milieu basique, le gène *Pac 1* est fortement exprimé et *Tri5* n'est pas exprimé, et inversement, en milieu acide, *Pac 1* est faiblement exprimé et *Tri5* est induit. Ces résultats préliminaires restent à confirmer. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Flaherty *et al.* (2003) qui ont observé que la



**Figure 77 : Voie hypothétique de régulation des trichothécènes par le pH chez *F. graminearum* (Barreau *et al.*, 2007).**

La perception d'un pH extracellulaire basique ou neutre entraînerait la maturation de PAC 1, qui jouerait alors son rôle de répresseur de la transcription des gènes exprimés uniquement en condition acide ("gènes acides"). Dans ces conditions, PAC 1 réprimerait alors l'expression de certains gènes *Tri* possédant une boîte de fixation du facteur, bloquant l'accumulation de TCT B. A pH acide, PAC 1 serait inactif. L'expression de *Tri5* serait alors induite et les TCT B s'accumuleraient.

biosynthèse de fumonisines par *F. verticillioides* était réprimée à pH basique et induite à pH acide suggérant également l'intervention d'un facteur de transcription de type PAC en tant que répresseur de la biosynthèse des fumonisines à pH basique.

Des boîtes de fixation 5'-GCCARG-3', homologues de la séquence consensus de fixation de PAC C d'*Aspergillus*, ont été recherchées au niveau des régions promotrices des gènes *Tri*. Ce motif a effectivement été retrouvé au niveau de la région promotrice de plusieurs gènes du cluster *Tri* et en particulier dans les promoteurs des régulateurs transcriptionnels *Tri6* et *Tri10* (Barreau *et al.*, 2007). Ceci renforce l'hypothèse que chez *F. graminearum*, *Pac 1* pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes *Tri* en fonction du pH environnant et ainsi moduler la biosynthèse des TCT B (Figure 77). Cette hypothèse sera étudiée dans le cadre d'une thèse qui débute au laboratoire.

Si cette hypothèse se vérifiait, elle pourrait avoir des conséquences au niveau de l'agressivité du champignon. Lorsque *Fusarium* infecte les grains, il pourrait se produire une acidification locale, ce qui pourrait induire en retour la production de toxines et ainsi contribuer à l'agressivité du pathogène.

## **2. Les acides phénoliques modulent *in vitro* la biosynthèse de toxines par *Fusarium***

Au cours de notre étude, nous avons montré que les acides sinapique, caféique, *p*-coumarique, syringique et férulique avaient un effet inhibiteur de la toxinogénèse de six souches de *Fusarium*. Par contre, l'effet des acides *p*-OH benzoïque, gallique, vanillique et protocatéchuique sur la mycotoxinogénèse des six souches est moins évident, bien que globalement il soit plutôt activateur. Au cours d'une étude menée sur *F. graminearum*, Bily (2003) a montré un effet inhibiteur sur la biosynthèse des TCT B des acides férulique, *p*-coumarique, vanillique et 3-hydroxy benzoïque testé à 0,1 mM. Une autre étude menée sur *F. graminearum* par Ponts *et al.* (article soumis) rapporte que les acides férulique et *p*-coumarique activent, que l'acide syringique est sans effet et que l'acide *p*-OH benzoïque inhibe la biosynthèse des TCT B en cultures standard GYEP. Beekrum *et al.* (2003) ont observé que les acides caféique, férulique et vanillique pouvaient réduire la production de fumonisine B1 par *F. verticillioides*. De la même façon, la production d'aflatoxines par *Aspergillus* est inhibée par l'acide gallique (Mahoney et Molyneux, 2004), l'acide caféique (Paster *et al.*, 1988; Sinha, 1990), l'acide benzoïque (Uraih *et al.*, 1977; Sinha et Premlata, 1981), l'acide férulique (Chipley et Uraih, 1980; Sinha et Premlata, 1981), le syringaldehyde et l'acide sinapique (Hua *et al.*, 1999). Les différences observées entre les résultats cités ci-





dessus et les résultats de notre étude peuvent provenir du fait de comparer des résultats obtenus sur des champignons d'espèces différentes produisant de plus des mycotoxines différentes. De plus, les concentrations en acides phénoliques testées sont souvent différentes d'une étude à une autre. Les conditions de culture et le moment de supplémentation peuvent aussi être important.

Nos résultats montrent que les acides phénoliques ont un effet modulateur de la toxigenèse qui est acide phénolique dépendant. Cet effet acide phénolique dépendant pourrait être relié à la structure chimique et par conséquent à la lipophilicité des acides phénoliques. De plus, nous avons observé que l'intensité des effets des acides phénoliques sur la toxigenèse est souche dépendante. Bily (2003) a suivi le devenir de l'acide férulique par l'addition d'acide férulique- $^{14}\text{C}_3$ /acide férulique 1% dans une culture liquide de *F. graminearum*. Après trois jours de mise en contact, une partie de la radioactivité était incorporée à l'intérieur du mycélium. Ceci démontre que l'acide férulique est effectivement capable de pénétrer la paroi et la membrane plasmique de *F. graminearum*. De plus, il semblerait que l'acide férulique soit également transformé en deux produits : un conjugué glycosylé de l'acide férulique et un composé qui pourrait être un produit de dégradation de l'acide férulique. Dans nos conditions de culture, les acides phénoliques disparaissent du milieu de culture 48 h après inoculation des cultures par *Fusarium*. Ceci suggère que tous les acides phénoliques testés pénètrent dans les cellules fongiques assez rapidement. Leur devenir après pénétration est inconnu. Notre hypothèse est que des aptitudes différentes des souches à métaboliser les acides phénoliques pourraient expliquer les sensibilités différentes des souches aux acides phénoliques. Cette observation d'une sensibilité souche dépendante aux acides phénoliques soulève des questions *in planta*. En effet, au cours de l'infection des grains par *Fusarium*, plusieurs souches de *Fusarium* peuvent être présentes sur les grains. Il est possible que ce phénomène de sensibilité aux acides phénoliques souche dépendante confère alors un avantage aux souches les moins sensibles aux acides phénoliques.

Dans les sons de blé dur, les acides phénoliques solubles libres majoritaires sont les acides férulique et vanillique, puis, les acides *p*-OH benzoïque, *p*-coumarique et sinapique sont présents en plus faible quantité. Considérant nos résultats obtenus *in vitro*, les acides férulique, *p*-coumarique et sinapique sont inhibiteurs alors que les acides vanillique et *p*-OH benzoïque sont activateurs de la biosynthèse des toxines. Dans les grains, lorsque ces acides phénoliques sont présents simultanément, quelle est alors la résultante des effets stimulateurs et inhibiteurs sur la biosynthèse des toxines ? Il serait judicieux de tester *in vitro* l'effet d'un mélange reconstitué représentatif de la composition d'extrait naturel d'acides phénoliques



solubles vis-à-vis de la toxinogénèse de *Fusarium*. L'effet global des acides phénoliques solubles sur la toxinogénèse pourrait ainsi être apprécié. Ce mélange reconstitué pourrait être testé vis-à-vis d'une gamme de souches de *Fusarium* afin de vérifier si une intensité de l'effet souche dépendant est toujours observable avec un mélange. De plus, il serait intéressant d'étudier la composition des sons de blé dur en acides phénoliques solubles à des temps plus précoces, en particulier 10 jours après la floraison, stade critique de sensibilité à l'infection des grains par *Fusarium*.

### 3. Disponibilité des acides phénoliques dans les sons ?

Dans les sons de blé dur, les acides phénoliques solubles libres sont présents à une concentration d'environ 10 µg/g pour la variété Orjaune. Parmi les acides phénoliques solubles, en plus des acides phénoliques libres, sont également présents des acides phénoliques estérifiés et glycosylés que nous n'avons pas dosés mais qui existent à des concentrations de l'ordre de 80 µg/g (Kim *et al.*, 2006). D'après nos résultats obtenus *in vitro*, des concentrations de l'ordre de 80 à 100 µg/mL en acides phénoliques modulent la toxinogénèse. Considérant la totalité des acides phénoliques solubles (libres + estérifiés + glycosylés), il semble que les concentrations en acides phénoliques ayant un effet modulateur de la toxinogénèse *in vitro* sont représentatives des concentrations en acides phénoliques solubles existantes dans les grains de blé. Par conséquent, il est tout à fait possible que les acides phénoliques solubles des grains aient une activité modulatrice de la toxinogénèse de *Fusarium in planta*. Il serait important de tester *in vitro* l'effet d'un extrait naturel d'acides phénoliques solubles vis-à-vis de la toxinogénèse. Cependant, il sera difficile d'en obtenir suffisamment vu la faible quantité dans les sons.

Dans les sons de blé dur, les acides phénoliques insolubles liés aux parois sont beaucoup plus abondants que les acides phénoliques solubles. Les concentrations en acides phénoliques insolubles liés aux parois (3160 µg/g pour la variété Orjaune) sont bien supérieures aux concentrations fongitoxiques. En effet, McKeehen *et al.*, (1999) ont déterminé une CE<sub>50</sub> de 329 µg/g en acide férulique vis-à-vis de *F. culmorum*. Cependant, il faut se poser la question de la participation des acides phénoliques des parois lors de l'interaction. En effet, au cours de l'infection par *Fusarium*, une fraction des acides phénoliques insolubles des parois pourrait être libérée par les activités hydrolytiques du champignon. Ces acides phénoliques libérés pourraient alors être soit métabolisés, soit s'accumuler progressivement sur le site de l'infection et par conséquent, les concentrations en acides phénoliques solubles



augmenteraient localement. Bily (2003) a analysé les concentrations en acide férulique libre et soluble dans des grains de maïs infectés par *F. graminearum* ou non. Dix jours après l'infection, la concentration en acide férulique libre était plus importante (environ 3 fois) dans les grains infectés, suggérant une libération de l'acide férulique lié de la paroi au cours du processus infectieux. Cette hypothèse est compatible avec ce que nous avons observé chez le blé tendre. En effet, en réponse à l'infection, une augmentation des contenus en acides phénoliques solubles a été observée quelle que soit la variété de blé tendre considérée. Il faudrait vérifier cette hypothèse chez le blé dur.

Ainsi, dans les grains, les contenus en acides phénoliques solubles pourraient varier en réponse à l'infection. Ces contenus sont déjà initialement variables en fonction des variétés de blé. De plus, ils peuvent aussi varier en fonction des conditions environnementales. Rappelons que nos résultats montrent que la variété de blé dur Orjaune contient environ deux fois plus d'acides phénoliques solubles et d'acides phénoliques liés que la variété Nefer. Nos résultats obtenus *in vitro* ont montré que l'intensité de l'effet inhibiteur augmente avec la concentration en acide férulique supplémenté aux cultures. Par conséquent, les différences de concentrations en acide férulique selon les variétés ainsi que leur accumulation progressive sur le site de l'infection pourraient expliquer les différences de niveaux de TCT B accumulés dans les grains en fonction des variétés. De plus, nos résultats obtenus *in vitro* ont montré que la supplémentation des cultures en acide férulique lorsque les spores sont en germination ou lorsque le mycélium est en développement avait le même effet inhibiteur final sur la biosynthèse des TCT B par *Fusarium*. Ceci suggère qu'au cours de son développement sur son hôte, si *Fusarium* rencontre une source d'acides phénoliques à la germination ou au moment où il pénètre dans les grains, c'est-à-dire à l'état de mycélium, l'effet inhibiteur des acides phénoliques sur la toxigenèse pourrait être aussi efficace. Nous avons également montré *in vitro* que la supplémentation des cultures en acide férulique à deux temps aurait un effet inhibiteur cumulatif sur la biosynthèse des TCT B. Ce résultat suggère qu'au cours de l'interaction entre *Fusarium* et la plante hôte, la dégradation des parois cellulaires végétales par le champignon et ainsi la libération progressive d'acide férulique estérifié aux parois cellulaires pourrait avoir un effet inhibiteur cumulatif de la toxigenèse.

Cependant, une question importante subsiste. Quelle est l'efficacité "anti mycotoxines" des acides phénoliques *in planta* ? Afin de répondre à cette question, des études pourraient tout d'abord être menées en culture *in vitro* sur des grains enrichis en acides phénoliques. Par exemple, Sinha (1990) a observé que l'application sur du riz d'acide caféique et d'acide férulique, à une concentration de 0,01 M, inhibe la production d'aflatoxines de 61% et 56%



respectivement. Samapundo *et al.* (2007) ont étudié *in vitro* l'effet d'une application d'acide vanillique et d'acide caféique sur maïs et ont montré une diminution de la production de fumonisine B1 et d'aflatoxine B1. Une autre approche pourrait consister en la recherche de variétés possédant naturellement des contenus en acides phénoliques très différentes. Des essais *in vitro* et *in vivo* pourraient alors être menés avec ce type de variétés. Enfin, on pourrait imaginer travailler sur des lignées de blé affectées pour la biosynthèse des acides phénoliques. Les acides phénoliques étant des constituants structuraux importants des parois cellulaires, il faudrait tout d'abord vérifier si de telles lignées conservent leurs intérêts agronomiques.

#### **4. Les dimères d'acides phénoliques extraits des parois cellulaires sont des inhibiteurs potentiels de la biosynthèse de toxines par *Fusarium***

Au cours de l'infection par *Fusarium*, les acides phénoliques insolubles libérés des parois cellulaires pourraient donc interagir avec la toxinogénèse. Afin de se rapprocher de cette condition naturelle, nous avons étudié l'effet d'extraits naturels d'acides phénoliques insolubles liés aux parois isolés des sons de blé dur sur la biosynthèse des toxines par *Fusarium*. Nos résultats ont montré que ces extraits naturels ont un effet inhibiteur puissant sur la biosynthèse des toxines par *Fusarium*. De plus, l'analyse de cet extrait naturel et une comparaison de l'efficacité de cet extrait naturel et d'un mélange reconstitué nous ont conduit à suggérer que les formes oligomériques de l'acide férulique présentes dans cet extrait seraient des inhibiteurs potentiels de la toxinogénèse. Ainsi, au cours de l'interaction entre *Fusarium* et son hôte, la dégradation des parois pourrait libérer des acides phénoliques mais également des esters ou des dimères d'acide férulique ayant une activité "anti mycotoxines". On pourrait envisager de purifier chaque forme oligomérique d'acide férulique présente dans cet extrait naturel afin d'étudier leur efficacité inhibitrice vis-à-vis de la toxinogénèse.

Des études récentes ont suggéré une relation entre le contenu en dimères d'acide férulique des parois cellulaires et la résistance variétale du maïs à la fusariose de l'épi (Bily *et al.*, 2003) ou à la pourriture de la tige (Santiago *et al.*, 2007) causée par *F. graminearum*. Les dimères d'acide férulique pourraient renforcer les parois cellulaires des tissus jeunes et diminuer ainsi la dégradation des parois cellulaires par les hydrolases fongiques (Bily *et al.*, 2003). Au cours de l'infection, la libération des formes liées à la paroi de l'acide férulique pourrait être reliée à une inhibition de la biosynthèse des toxines. La libération de l'acide férulique des parois végétales est sous contrôle enzymatique (xylanases, estérases). En





particulier, l'activité féruloyl estérase d'*Aspergillus niger* permet la libération d'acide férulique des sons de blé (Faulds et Williamson, 1995). Chez *F. culmorum*, l'activité féruloyl estérase n'a pas encore été caractérisée. Cependant, l'existence de cette activité enzymatique chez cette espèce est très probable. En effet, les enzymes de dégradation des parois sont communément produites par les champignons phytopathogènes, et, l'activité féruloyl estérase a déjà été caractérisée chez *F. oxysporum* et chez *F. proliferatum* (Topakas *et al.*, 2003 ; Shin et Chen, 2006). Il serait intéressant de caractériser cette enzyme chez *F. culmorum* et d'étudier l'effet "anti mycotoxines" des composés issus de la dégradation des sons de blé dur par cette enzyme. On peut émettre l'hypothèse que les différentes variétés de blé dur pourraient présenter des sensibilités différentes à l'activité de cette enzyme.

Les dimères d'acide férulique ont précédemment été montrés comme facteur de résistance variétale à la fusariose chez le maïs (Bily, 2003). En effet, la comparaison des cartes des QTL des phénylpropanoïdes de type acide diférulique et des QTL de la résistance à la fusariose met en évidence des colocalisations suggérant un lien entre acide diférulique et résistance (Bily, 2003). Il serait primordial de pouvoir montrer qu'une telle colocalisation persiste lorsque l'on considère plus particulièrement la résistance à l'accumulation de mycotoxines. Cette relation devra être recherchée chez le blé.

### **5. Caractérisation d'un dimère d'acides phénoliques, présent dans la fraction soluble des sons, à fort pouvoir inhibiteur de la mycotoxinogénèse**

La méthode "sans à priori" que nous avons menée afin de rechercher des composés inhibiteurs de la toxino-génèse dans les sons de blé dur nous a conduit à la purification d'un dimère d'acides phénoliques. Au regard de la bibliographie, les études recherchant à isoler à partir des plantes des composés inhibiteurs de la biosynthèse des mycotoxines ont souvent isolé des composés de nature protéique ou des composés de nature phénolique. En effet, des composés de nature protéique inhibiteurs de la biosynthèse d'aflatoxines ont été isolés à partir de maïs (Nagarajan et Bhat, 1972 ; Huang *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 2006) et de coton (McCormick *et al.*, 1988). Ces composés ont été isolés à partir de grains de variétés résistantes à l'accumulation d'aflatoxines. Des composés de nature phénolique, isolé d'extrait de plantes, ont montré des effets inhibiteurs de la biosynthèse d'aflatoxines par *Aspergillus* (Paster *et al.*, 1988 ; Sinha, 1990) des trichothécènes par *Fusarium* (Desjardins *et al.*, 1988 ; Miller *et al.*, 1996 ; Bakan *et al.*, 2003). Miller *et al.* (1996) ont fractionné un extrait de maïs d'une variété résistante à fusariose et ont isolé une fraction inhibitrice de la production de



mycotoxines par *Fusarium*. Un composé phénolique isolé de cette fraction, le 4-acetylbenzoxazolin-2-one (4-ABOA), inhibe la biosynthèse de trichothécènes et des aflatoxines. Une concentration de 4  $\mu$ M de 4-ABOA inhibe à 50% la production de 3-ADON avec peu ou pas d'effet sur la croissance fongique. Dans notre étude, le dimère que nous avons purifié est présent dans la fraction soluble des sons et, à une concentration estimée inférieure à 70  $\mu$ M, inhibe 90% de la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum*. Il serait important de vérifier l'activité inhibitrice de la toxinogénèse de ce dimère sur un plus grand nombre de souches de *Fusarium*.

Ce dimère est présent dans la fraction soluble des sons. Il est différent des dimères extraits des sons par une hydrolyse des parois cellulaires. Ce dimère est soit présent naturellement dans la fraction soluble soit il s'est formé au cours de la préparation des extraits. En effet, des formes oxydées des acides phénoliques ont pu se dimériser sous l'action d'oxydases (peroxydase en particulier) libérées au cours du broyage des sons. Afin d'écartier cette hypothèse, il sera alors important de rechercher ce dimère dans les extraits d'acides phénoliques solubles des sons.

Dans nos travaux, nous avons isolé ce dimère à partir des sons de la variété Orjaune, variété qui accumule peu de mycotoxines dans ses grains. Et, nous avons montré que ce dimère était également présent dans les sons de la variété Nefer, variété sensible à l'accumulation de mycotoxines. Cependant, ce composé est 6,7 fois plus concentré dans les sons de la variété Orjaune que dans les sons de la variété Nefer. Nos résultats sont à rapprocher d'études où, il a été montré que des facteurs biochimiques (de nature protéique) inhibiteurs de l'accumulation d'aflatoxines par *Aspergillus* isolés de grains de maïs étaient en quantité plus importante dans les variétés résistantes que dans les variétés sensibles à l'accumulation d'aflatoxines (Nagarajan et Bhat, 1972 ; Chen *et al.*, 2006). Par exemple, la protéine identifiée par Chen *et al.* (2006) serait exprimée cinq fois plus dans les lignées résistantes que dans variétés sensibles à l'accumulation d'aflatoxines. Le pouvoir inhibiteur de notre dimère d'acides phénoliques associé à une importante différence de concentration entre les variétés Orjaune et Nefer suggère que la différence de sensibilité à l'accumulation de mycotoxines de ces deux variétés pourrait être liée à la différence de teneurs en ce dimère d'acides phénoliques. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudra tout d'abord définir la nature exacte de ce dimère, vérifier qu'il est présent naturellement et qu'il ne s'est pas formé au cours de la purification.



## 6. Mécanismes impliqués dans l'inhibition de la toxinogénèse par les acides phénoliques

Les propriétés antioxydantes des acides phénoliques pourraient jouer un rôle dans leur effet modulateur de la mycotoxinogénèse. Les modifications des paramètres oxydatifs du milieu de culture pourraient interférer avec le métabolisme secondaire du champignon, et en particulier avec la voie de biosynthèse des trichothécènes, voie qui contient de nombreuses étapes d'oxydations. Les travaux de Ponts (2005) ont montré que la supplémentation de cultures de *F. graminearum* par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulait la toxinogénèse. D'autres études ont montré que des composés antioxydants inhibaient la production d'aflatoxines (Thompson, 1996 ; Passone *et al.*, 2005) ou des fumonisines (Etcheverry *et al.*, 2002 ; Reynoso *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2003). Il a été suggéré par Adams et Moss (1995) que les composés antioxydants agiraient au niveau de la membrane cellulaire en altérant le fonctionnement de sa perméabilité. Le caractère antioxydant des acides phénoliques pourrait perturber la fonction membranaire et interférer avec le métabolisme secondaire du champignon et ainsi moduler la production de trichothécènes. L'effet modulateur de la toxinogénèse des acides phénoliques pourrait aussi être relié à leur interaction avec diverses enzymes fongiques intra ou extracellulaires, incluant les phénol oxydases (Guiraud *et al.*, 1995) ainsi que diverses activités hydrolytiques (Jecu, 1997 ; El Modafar *et al.*, 2000 ; Paul *et al.*, 2003).

Nos résultats suggèrent que les dimères d'acides phénoliques auraient une efficacité inhibitrice de la toxinogénèse plus importante que les monomères d'acides phénoliques. On peut se poser la question du devenir des dimères lorsqu'ils ont traversé les membranes fongiques, sont-ils hydrolysés et alors transformés en deux monomères qui auraient alors un effet inhibiteur plus important sur la toxinogénèse ?

Nos résultats montrent clairement que dans des cultures de *Fusarium* supplémentée en acide férulique, la diminution des teneurs en toxines serait associée à une plus faible expression de l'ensemble des gènes *Tri* étudiés et du gène *Fpps*. Le régulateur transcriptionnel *Tri10* pourrait jouer un rôle clé dans la régulation de la voie en réponse à l'acide férulique. Nos résultats sont en accord avec le modèle de régulation de la voie de biosynthèse des trichothécènes proposé par Tag *et al.* (2001). Nos résultats suggèrent que l'acide férulique pourrait agir sur le niveau d'induction de l'expression de *Tri10* ou sur l'expression d'un régulateur plus général en amont de *Tri10*. La plus faible expression de *Tri10* entraînerait alors une régulation en cascade avec tout d'abord une plus faible expression de *Tri6* qui



entraînerait ensuite une plus faible expression de *Fpps*, *Tri5*, *Tri4*, *Tri11*, *Tri12* et *Tri101*, gènes dont l'expression a été montrée régulée par *Tri6*.

L'acide férulique a donc un effet au niveau de l'induction de la biosynthèse des trichothécènes. Est-ce que l'acide férulique est capable de réprimer la voie de biosynthèse déjà induite ? Afin de répondre à cette question, la supplémentation des cultures de *Fusarium* en acide férulique pourrait être effectuée après que la voie de biosynthèse des toxines se soit initiée, c'est à dire à trois jours ou quatre jours après inoculation. L'analyse de l'expression des gènes dans ces conditions permettrait alors de vérifier si l'ajout de l'acide férulique provoque une répression rapide de l'expression des gènes *Tri*.

Dans des cultures de *Fusarium* supplémentées par l'extrait naturel d'acides phénoliques, la biosynthèse des toxines est totalement inhibée et elle est associée à une réduction spectaculaire de l'expression de certains gènes *Tri*. Si on compare l'inhibition de la toxinogénèse par l'acide férulique ou par l'extrait naturel d'acides phénoliques, on peut penser que des différences dans le mécanisme d'action pourraient exister. En effet, dans les cultures supplémentées par l'extrait naturel, l'expression de *Tri6* et *Tri10* est réduite à peu près autant que dans les cultures supplémentées par l'acide férulique. Par contre, en cultures traitées par l'extrait naturel, l'expression des gènes *Tri5*, *Tri4*, *Tri11* et *Tri101* est beaucoup plus fortement réduite (réduction d'expression d'un facteur 19 à 239) que en cultures traitées par l'acide férulique (réduction d'expression d'un facteur 2,3 à 5,4). Ce résultat suggère que la réduction du niveau d'expression des gènes *Tri* étudiés n'est pas uniquement dépendante du niveau d'expression des régulateurs. Notre hypothèse est donc que *TRI6* et *TRI10* ne seraient pas les seuls facteurs de régulation des gènes *Tri*. Nous suggérons que les gènes *Tri* pourraient être sous le contrôle d'autres facteurs de transcription spécifique ou sous le contrôle d'un régulateur plus général. En particulier, l'hypothèse d'un répresseur agissant spécifiquement sur ces gènes de biosynthèse pourrait être émise. L'existence d'un tel régulateur reste à démontrer. Pour l'instant, un seul répresseur a été décrit, le gène *Tri15* code un facteur de transcription qui régulerait négativement la voie de biosynthèse (Alexander *et al.*, 2004). Cependant, nos résultats préliminaires montrent que l'expression de *Tri15* n'est pas activée dans nos conditions de culture. Ceci suggère qu'un autre régulateur pourrait exister.

Si l'effet des acides phénoliques au niveau transcriptionnel est indéniable, on ne peut exclure à ce stade qu'ils puissent aussi agir à d'autres niveaux. De par leur caractère antioxydant, ces acides phénoliques pourraient agir directement sur l'activité de certaines enzymes de la voie de biosynthèse. Par ailleurs, des mécanismes de régulation post transcriptionnelle ne sont pas à exclure, par des modifications des facteurs de transcription.





A notre connaissance, les mécanismes de régulation associés à l'inhibition de la biosynthèse des TCT B par les acides phénoliques ont ici été étudiés pour la première fois. Afin d'identifier de nouveaux régulateurs de cette voie, il sera intéressant de suivre l'expression d'un plus grand nombre de gènes associés à l'inhibition de la toxinogénèse par les acides phénoliques. L'utilisation de microarrays devra être envisagée dans les études à venir ce qui permettra de préciser les voies métaboliques affectées par les acides phénoliques.

## 7. Conclusion générale

Lorsque *Fusarium* attaque les grains de blé en développement, il va rencontrer ou libérer des composés indispensables à sa croissance mais va également être en contact avec des composés néfastes pour son développement et qui pourraient influencer son métabolisme secondaire.

Les composés solubles du blé pourraient constituer un premier pool de composés rencontré par *Fusarium* à activité "anti mycotoxines". Les résultats de notre étude nous permettent de conclure définitivement que les acides cinnamiques et l'acide syringique inhibent la toxinogénèse de *Fusarium*. Pour l'acide férulique, nous avons mis clairement en évidence un effet au niveau de la transcription des gènes *Tri*. De plus, nous avons montré que d'autres composés, tels le tryptophane ou les caroténoïdes ont également une activité modulatrice de la toxinogénèse. Il est possible que *Fusarium* ne soit pas en contact avec tous ces composés en même temps. La question est maintenant de savoir le plus précisément possible quelles sont les substances chimiques rencontrées par *Fusarium* au moment de l'infection du grain ? Nos résultats renforcent l'idée que la composition des grains de blé en acides phénoliques et en molécules modulatrices aux premiers stades de développement du grain est primordiale. Un résultat original a été obtenu par notre approche sans a priori : un dimère d'acides phénoliques présents dans la fraction soluble des sons de blé dur est un puissant inhibiteur de la toxinogénèse. Ce dimère serait environ 10 fois plus actif que l'acide férulique. Des dimères d'acide férulique avait auparavant été corrélés avec la résistance à la fusariose chez le maïs, nous démontrons pour la première fois leur capacité à inhiber fortement la toxinogénèse.

Puis nos résultats laissent supposer que, au cours de l'interaction avec *Fusarium*, les composés phénoliques issus de la dégradation des parois cellulaires pourraient constituer un deuxième pool de composés à activité "anti mycotoxines". En effet, des extraits naturels d'acides phénoliques liés inhibent totalement la biosynthèse de toxines par *Fusarium*. Cette



inhibition de la production de toxines résulterait d'une régulation au niveau transcriptionnel, l'expression de certains gènes *Tri* pouvant être réduite jusqu'à 200 fois ! Ceci démontre que la voie de biosynthèse des trichothécènes peut être bloquée par des molécules naturellement présentes dans le grain.

Dans le grain, nous avons observé que le contenu en ces composés "anti mycotoxines" est différent entre deux variétés de blé de sensibilité distincte à la toxinogénèse. Ceci conforte notre hypothèse de départ d'un rôle de composés du grain capables de limiter la toxinogénèse. Il serait judicieux de pouvoir disposer de variétés modifiées spécifiquement pour certains de ces composés et de rechercher un effet sur la sensibilité à l'accumulation de mycotoxines. Chez le blé, deux activités cinnamoyl-CoA réductase impliquées dans la biosynthèse de la lignine ont été caractérisées récemment (Ma et Tian, 2005 ; Ma, 2007). En modifiant l'activité de ces gènes, on pourrait modifier la composition en acides phénoliques libres et liés du blé et ainsi étudier les conséquences de cette perturbation du point de vue de l'accumulation de toxines.

Suite à ce travail, deux perspectives majeures de recherche se dégagent. Tout d'abord, la caractérisation du dimère soluble devra être finalisée. Il sera possible d'envisager de le synthétiser chimiquement. Ceci permettrait d'étudier de façon détaillée son effet sur les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la toxinogénèse. En particulier, l'étude moléculaire de la régulation transcriptionnelle pourra être poursuivie afin d'identifier le ou les régulateurs mis en jeu. En parallèle, une relation entre la présence du dimère chez les différentes variétés de blé et la sensibilité à l'accumulation de toxines pourra être recherchée afin de confirmer son rôle *in planta*. Une deuxième perspective serait d'étudier l'effet des acides phénoliques libérés des parois vis-à-vis de la toxinogénèse lors de l'interaction entre le champignon et le grain. Dans un premier temps, il faudrait identifier les composés phénoliques libérés des parois par l'action du champignon selon les variétés de blé. Une étude des activités estérase du champignon pourrait être envisagée ainsi que la comparaison de ces activités entre différentes souches de *Fusarium*. Il faudrait par la suite vérifier si ces composés sont bien libérés au premier stade de développement du grain lors d'une contamination au champ.

Actuellement, l'utilisation de variétés résistantes à l'accumulation de mycotoxines constitue la voie préférentielle pour limiter la contamination des céréales par les toxines de *Fusarium*. Nos études ouvrent de nouvelles perspectives pour la sélection de variétés résistantes à l'accumulation de trichothécènes.



## **Références bibliographiques**



- Abbas H.K., Mirocha C.J., Rosiles R. & Carvajal M. (1988) Decomposition of zearalenone and deoxynivalenol in the process of making tortillas from corn. *Cereal Chemistry*, 65, 15-19.
- Abdel-Aal E.S.M., Young J.C., Rabalski I., Hucl P. & Fregeau-Reid J. (2007) Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 787-794.
- Adams M.R. & Moss M.O. (1995) Food Microbiology. In: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 498 p.
- Akin D.E. (1995) Microspectrophotometric characterization of aromatic constituents in cell walls of hard and soft wheats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68, 207-214.
- Alexander N.J., Hohn T.M. & McCormick S.P. (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.
- Alexander N.J., McCormick S.P. & Hohn T.M. (1999) TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular and General Genetics*, 261, 977-984.
- Alexander N.J., McCormick S.P., Larson T.M. & Jurgenson J.E. (2004) Expression of *Tri15* in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics*, 45, 157-162.
- Arseniuk E., Goral G. & Czembor H.J. (1993) Reaction of triticale, wheat and rye accessions to graminaceous *Fusarium spp.* infection at the seedling and adult plant growth stages. *Euphytica*, 70, 175-183.
- Arseniuk E., Foremska E., Goral T. & Chelkowski J. (1999) *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *Journal of Phytopathology*, 147, 577-590.
- Arst H.N. & Penalva M.A. (2003) pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends in Genetics*, 19, 224-231.
- Assabgui R.A., Reid L.M., Hamilton R.I. & Arnason J.T. (1993) Correlation of kernel (E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 83, 949-953.
- Atanassova-Pénichon V., Ponts N., Pinson-Gadais L., Barreau C. & Richard-Forget F. (2006) Biosynthesis of deoxynivalenol and its acetylated forms requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is modulated by *Tri101* gene product. In: 9th European *Fusarium* Seminar, Wageningen, Netherlands.
- Bakan B. (1998) Approche physiologique de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium*. Thèse, Université Paris-Grignon, France, 150 p.
- Bakan B., Pinson L., Cahagnier B., Melcion D., Semon E. & Richard-Molard D. (2001) Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives and Contaminants*, 18, 998-1003.
- 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.





- Bakan B., Bily A.C., Melcion D., Cahagnier B., Regnault-Roger C., Philogene B.J.R. & Richard-Molard D. (2003) Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2826-2831.
- Barreau C., Bernarde, C., Boutigny, A.-L., Pinson-Gadais, L. & Forget-Richard, F. (2007) Biosynthèse des mycotoxines par *Fusarium graminearum*: Effet du pH sur la voie des trichothécènes. In: Colloque Mycotoxines fusariennes des céréales, 11-13 Septembre 2007, Arcachon, France.
- Bartolome B., Faulds C.B., Kroon P.A., Waldron K., Gilbert H.J., Hazlewood G. & Williamson G. (1997) An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* esterase (XylD) release a 5-5' ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 208-212.
- Bechtel D.B., Kaleikau L.A., Gaines R.L. & Seitz L.M. (1985) The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chemistry*, 62, 191-197.
- Beekrum S., Govinden R., Padayachee T. & Odhav B. (2003) Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B<sub>1</sub>. *Food Additives and Contaminants*, 20, 490-493.
- Bell A.A. (1981) Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology*, 32, 21-81.
- Bennett G.A. & Richard J.L. (1996) Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. *Food Technology*, 50, 235-238.
- Bennett J.W. & Klich M. (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.
- Betina V. (1989) Mycotoxins Chemical, biological and environmental aspects. In: Elsevier, Amsterdam Netherlands., pp. 63-281.
- Bilgrami K.S., Sahay S.S. & Rahman M.F. (1990) *In vivo* production of fusarial mycotoxins on wheat and maize grains. *National Academy Science Letters*, 13, 405-407.
- 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. Thèse, Université de Pau et des Pays de l'Adour, France, 172 p.
- Bily A.C., Reid L.M., Taylor J.H., Johnston D., Malouin C., Burt A.J., Bakan B., Regnault-Roger C., Pauls K.P., Arnason J.T. & Philogene B.J.R. (2003) Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 93, 712-719.
- 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. & Regnault-Roger C. (2004) Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia*, 157, 117-126.
- Bottalico A. & Perrone G. (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611-624.
- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H. & Desjardins A.E. (2001) A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 32, 121-133.



- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H. & Desjardins A.E. (2002) Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, 36, 224-233.
- Brown D.W., Proctor R.H., Dyer R.B. & Plattner R.D. (2003) Characterization of a *Fusarium* 2-gene cluster involved in trichothecene C-8 modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7936-7944.
- Brown D.W., Dyer R.B., McCormick S.P., Kendra D.F. & Plattner R.D. (2004) Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 454-462.
- Bunzel M., Ralph J., Marita J. & Steinhart H. (2000) Identification of 4-O-5 '-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3166-3169.
- Bunzel M., Ralph J., Marita J.M., Hatfield R.D. & Steinhart H. (2001) Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 653-660.
- Bunzel M., Ralph J., Funk C. & Steinhart H. (2003a) Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *European Food Research and Technology*, 217, 128-133.
- Bunzel M., Ralph J., Kim H., Lu F.C., Ralph S.A., Marita J.M., Hatfield R.D. & Steinhart H. (2003b) Sinapate dehydrodimers and sinapate-ferulate heterodimers in cereal dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1427-1434.
- Bunzel M., Ralph J., Lu F., Hatfield R.D. & Steinhart H. (2004) Lignins and ferulate-coniferyl alcohol cross-coupling products in cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6496-6502.
- Caron D., Dupont De Dinechin L. & Malavergne D. (2006) *Fusarium graminearum* sur les résidus de culture des blés et des maïs et en fonction du travail du sol. In: CR 8ème CIMA AFPP, Tours, France, pp. 293-303.
- Champeil A., Dore T. & Fourbet J.F. (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.
- Chen Z.Y., Brown R.L., Rajasekaran K., Damann K.E. & Cleveland T.E. (2006) Identification of a maize kernel pathogenesis-related protein and evidence for its involvement in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Phytopathology*, 96, 87-95.
- Chipley J.R. & Uraih N. (1980) Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 352-357.
- Covarelli L., Turner A.S. & Nicholson P. (2004) Repression of deoxynivalenol accumulation and expression of *Tri* genes in *Fusarium culmorum* by fungicides in vitro. *Plant Pathology*, 53, 22-28.
- Cuero R.G., Smith J.E. & Lacey J. (1987) Interaction of water activity, temperature and substrate in mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains. *Transactions of the British Mycological Society*, 89, 221-226.



- Cuomo C.A., Guldener U., Xu J.-R., Trail F., Turgeon B.G., Di Pietro A., Walton J.D., Ma L.-J., Baker S.E., Rep M., Adam G., Antoniw J., Baldwin T., Calvo S., Chang Y.-L., Decaprio D., Gale L.R., Gnerre S., Goswami R.S., Hammond-Kosack K., Harris L.J., Hilburn K., Kennell J.C., Kroken S., Magnuson J.K., Mannhaupt G., Mauceli E., Mewes H.-W., Mitterbauer R., Muehlbauer G., Munsterkotter M., Nelson D., O'Donnell K., Ouellet T., Qi W., Quesneville H., Roncero M.I.G., Seong K.-Y., Tetko I.V., Urban M., Waalwijk C., Ward T.J., Yao J., Birren B.W. & Kistler H.C. (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317, 1400-1402.
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M. & 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.
- Desjardins A.E., Plattner R.D. & Spencer G.F. (1988) Inhibition of trichothecene toxin biosynthesis by naturally occurring shikimate aromatics. *Phytochemistry*, 27, 767-771.
- Desjardins A.E., Hohn T.M. & McCormick S.P. (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiological Reviews*, 57, 595-604.
- Desjardins A.E., Proctor R.H., Bai G., McCormick S.P., Shaner G., Buechley G. & Hohn T.M. (1996) Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 775-781.
- Desjardins A.E. & Hohn T.M. (1997) Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 147-152.
- Desjardins A.E. (2006) *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics, and Biology. In: APS PRESS, St. Paul, Minesota U.S.A., 259 p.
- Dexter J.E., Marchylo B.A., Clear R.M. & Clarke J.M. (1997) Effect of *Fusarium* head blight on semolina milling and pasta-making quality of durum wheat. *Cereal Chemistry*, 74, 519-525.
- Diamond H. & Cooke B.M. (2003) Preliminary studies on biological control of the *Fusarium* ear blight complex of wheat. *Crop Protection*, 22, 99-107.
- Dill-Macky R. & Jones R.K. (2000) The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease*, 84, 71-76.
- 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.
- Edwards S.G. (2004) Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153, 29-35.
- El Modafar C., Tantaoui A. & El Boustani E. (2000) Effect of caffeoylshikimic acid of date palm roots on activity and production of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* cell wall-degrading enzymes. *Journal of Phytopathology*, 148, 101-108.
- Eriksen G.S. (2003) Metabolism and toxicity of trichothecenes. In: Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Sweden, 38 p.



- Etcheverry M., Torres A., Ramirez M.L., Chulze S. & Magan N. (2002) *In vitro* control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 624-632.
- Eudes F., Comeau A., Rioux S. & Collin J. (2000) Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with the fusariosis of wheat spikelets. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 286-292.
- Faulds C.B. & Williamson G. (1995) Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 1082-1087.
- Favre L. (2004) Etude de la modulation de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium graminearum* sous l'action d'acides phénoliques des enveloppes externes du grain de blé dur. Mémoire ingénieur, INRA Bordeaux, France, 40 p.
- Favre L., Verdal-Bonnin M.N., Pinson-Gadais L., Roumet P., Barreau C. & Richard-Forget F. (2004) Does biochemical composition of durum wheat kernels influence the trichothecenes B (TCT B) contamination levels. In: 2<sup>nd</sup> International Symposium on *Fusarium* Head Blight., Orlando, Florida, USA.
- Feillet P. (2000) Le grain de blé composition et utilisation. In: INRA EDITIONS, Paris, France, 308p.
- Flaherty J.E., Pirttila A.M., Bluhm B.H. & Woloshuk C.P. (2003) *PAC1*, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5222-5227.
- Friend J. (1981) Plant phenolics, lignification and plant disease. *Progress in Phytochemistry*, 7, 197-261.
- Fry S.C., Willis S.C. & Paterson A.E.J. (2000) Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta*, 211, 679-692.
- Fulcher R.G., O'Brien T.P. & Lee J.W. (1972) Studies on the aleurone layer. I. Conventional and fluorescence microscopy of the cell wall with emphasis on phenol-carbohydrate complexes in wheat. *Australian Journal of Biological Sciences*, 25, 23-34.
- Garcia-Lara S., Bergvinson D.J., Burt A.J., Ramputh A.I., Diaz-Pontones D.M. & Arnason J.T. (2004) The role of pericarp cell wall components in maize weevil resistance. *Crop Science*, 44, 1546-1552.
- Goswami R.S. & Kistler H.C. (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- Grabber J.H., Hatfield R.D. & Ralph J. (1998) Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 193-200.
- 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.
- Guiraud P., Steiman R., Seigle-Murandi F. & Benoit-Guyod J.L. (1995) Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32, 29-33.





- Hani F. (1981) On the biology and control of *Fusarium* diseases of wheat and rye. *Phytopathologische Zeitschrift*, 100, 44-87.
- Harris L.J., Desjardins A.E., Plattner R.D., Nicholson P., Butler G., Young J.C., Weston G., Proctor R.H. & Hohn T.M. (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease*, 83, 954-960.
- Hazel C.M. & Patel S. (2004) Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters*, 153, 51-59.
- Hentschel V., Kranl K., Hollmann J., Lindhauer M.G., Bohm V. & Bitsch R. (2002) Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6663-6668.
- Hohn T.M. & Desjardins A.E. (1992) Isolation and gene disruption of the Tox5 gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 249-256.
- Hohn T.M., McCormick S.P. & Desjardins A.E. (1993a) Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics*, 24, 291-295.
- Hohn T.M., Desjardins A.E. & McCormick S.P. (1993b) Analysis of Tox5 gene expression in *Gibberella pulicaris* strains with different trichothecene production phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2359-2363.
- Hohn T.M., Desjardins A.E. & McCormick S.P. (1995) The *Tri4* gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *Molecular and General Genetics*, 248, 95-102.
- Hohn T.M., Roopa K. & Proctor R.H. (1999) Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology*, 26, 224-235.
- Hope R. & Magan N. (2003) Two-dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 70-74.
- Hope R., Aldred D. & Magan N. (2005) Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 295-300.
- Hua S.-S.T., Grosjean O.-K. & Baker J.L. (1999) Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 289-291.
- Huang Z., White D.G. & Payne G.A. (1997) Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. *Phytopathology*, 87, 622-627.
- Humphries J.M. & Khachik F. (2003) Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1322-1327.
- 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.

- Jansen C., von Wettstein D., Schafer W., Kogel K.H., Felk A. & Maier F.J. (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16892-16897.
- Jecu L. (1997) Effect of phenolic compounds on the growth of *Aspergillus niger* and activity of hydrolytic enzymes. *Revue Roumaine de Biochimie*, 34, 99-102.
- Joffe A.Z. (1983) Environmental conditions conducive to *Fusarium* toxin formation causing serious outbreaks in animals and man. *Veterinary Research Communications*, 7, 187-193.
- Jung H.G. (1989) Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agronomy Journal*, 81, 33-38.
- Keller N.P., Nesbitt C., Sarr B., Phillips T.D. & Burow G.B. (1997) pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus spp.* *Phytopathology*, 87, 643-648.
- Khan N.I., Schisler D.A., Boehm M.J., Lipps P.E. & Slininger P.J. (2004) Field testing of antagonists of *Fusarium* head blight incited by *Gibberella zeae*. *Biological Control*, 29, 245-255.
- Kim H.S., Lee T., Dawlatana M., Yun S.H. & Lee Y.W. (2003) Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol- and nivalenol-producing *Fusarium graminearum* isolates. *Mycological Research*, 107, 190-197.
- Kim D.O. & Lee C.Y. (2004) Comprehensive study on 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.
- Kim K.-H., Tsao R., Yang R. & Cui S.W. (2006) Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95, 466-473.
- Kimura M., Matsumoto G., Shingu Y., Yoneyama K. & Yamaguchi I. (1998a) The mystery of the trichothecene 3-O-acetyltransferase gene. Analysis of the region around *Tri101* and characterization of its homologue from *Fusarium sporotrichioides*. *FEBS Letters*, 435, 163-168.
- Kimura M., Kaneko I., Komiyama M., Takatsuki A., Koshino H., Yoneyama K. & Yamaguchi I. (1998b) 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.
- Kimura M., Tokai T., Takahashi-Ando N., Ohsato S. & Fujimura M. (2007) Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2105-2123.
- Klepcka J. & Fornal L. (2006) Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 639-647.
- Konopka I., Czaplicki S. & Rotkiewicz D. (2006) Differences in content and composition of free lipids and carotenoids in flour of spring and winter wheat cultivated in Poland. *Food Chemistry*, 95, 290-300.
- Labat E., Morel M.H. & Rouau X. (2000) Wheat gluten phenolic acids: occurrence and fate upon mixing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6280-6283.

- Lee T., Oh D.W., Kim H.S., Lee J., Kim Y.H., Yun S.H. & Lee Y.W. (2001) Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2966-2972.
- Lee T., Han Y., Kim K., Yun S. & Lee Y. (2002) *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2148-2154.
- Lempereur I., Rouau X. & Abecassis J. (1997) Genetic and agronomic variation in arabinoxylylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 25, 103-110.
- Lempereur I., Surget A. & Rouau X. (1998) Variability in dehydrodiferulic acid composition of durum wheat (*Triticum durum* desf.) and distribution in milling fractions. *Journal of Cereal Science*, 28, 251-258.
- Leslie J.F. & Summerell B.A. (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. In: Blackwell publishing, 388 p.
- Llorens A., Mateo R., Hinojo M.J., Valle-Algarra F.M. & 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.
- Llorens A., Hinojo M.J., Mateo R., Gonzalez-Jaen M.T., Valle-Algarra F.M., Logrieco A. & Jimenez M. (2006) Characterization of *Fusarium spp.* isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *International Journal of Food Microbiology*, 106, 297-306.
- Lori G.A., Henning C.P., Violante A., Alippi H.E. & Varsavsky E. (1990) Relation between the production of deoxynivalenol and zearalenone and the mycelium growth of *Fusarium graminearum* on natural solid substrates. *Microbiologia*, 6, 76-82.
- Lori G.A., Carranza M.R., Violante A., Rizzo I. & Alippi H.E. (1992) *Fusarium spp.* in wheat, toxicogenic capacity and chemotaxonomy of the strains isolated in Argentina. *Agronomie*, 12, 459-467.
- Ma Q. & Tian B. (2005) Biochemical characterization of a cinnamoyl-CoA reductase from wheat. *Biological Chemistry*, 386, 553-560.
- Ma Q. (2007) Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase that is associated with stem development in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2011-2021.
- Mahoney N., Molyneux R.J. & Campbell B.C. (2000) Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4418-4421.
- Mahoney N. & Molyneux R.J. (2004) Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1882-1889.
- Maier F.J., Miedaner T., Hadeler B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H. & Schafer W. (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 7, 449-461.

- Marin S., Ramos A.J. & Sanchis V. (2005) Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 329-341.
- Markwalder H.U. & Neukom H. (1976) Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry*, 15, 836-837.
- Masuda D., Ishida M., Yamaguchi K., Yamaguchi I., Kimura M. & Nishiuchi T. (2007) Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1617-1626.
- Mateo J.J., Mateo R. & Jimenez M. (2002) Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 115-123.
- Matern U. & Kneusel R.E. (1988) Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica*, 16, 153-170.
- Mathew S. & Abraham T.E. (2004) Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24, 59-83.
- McCallum J.A. & Walker J.R.L. (1991) Phenolic biosynthesis during grain development in wheat (*Triticum aestivum* L.) III. Changes in hydroxycinnamic acids during grain development. *Journal of Cereal Science*, 13, 161-172.
- McCormick S.P., Hohn T.M. & Desjardins A.E. (1996) Isolation and characterization of *Tri3*, a gene encoding 15-O-acetyltransferase from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 353-359.
- McCormick S.P., Bhatnagar D., Goynes W.R. & Lee L.S. (1988) An inhibitor of aflatoxin biosynthesis in developing cottonseed. *Canadian Journal of Botany*, 66, 998-1002.
- McCormick S.P., Alexander N.J., Trapp S.E. & Hohn T.M. (1999) Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5252-5256.
- McCormick S.P. & Alexander N.J. (2002) *Fusarium Tri8* encodes a trichothecene C-3 esterase. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2959-2964.
- McCormick S.P., Harris L.J., Alexander N.J., Ouellet T., Saparno A., Allard S. & Desjardins A.E. (2004) *Tri1* in *Fusarium graminearum* encodes a P450 oxygenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2044-2051.
- McCormick S.P., Alexander N.J. & Proctor R.H. (2006) *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 636-642.
- McKeehen J.D., Bush R.H. & Fulcher R.G. (1999) Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1476-1482.

- Meek I.B., Peplow A.W., Ake C., Jr., Phillips T.D. & Beremand M.N. (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.
- Megalla S.E., Bennett G.A., Ellis J.J. & Shotwell O.L. (1987) Production of deoxynivalenol and zearalenone by isolates of *Fusarium graminearum* Schw. *Journal of Food Protection*, 50, 826-828, 831.
- Metraux J.P. & Raskin I. (1993) Role of phenolics in plant disease resistance. *Biotechnology in plant disease control.*, 191-209.
- 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) Nutrient effects on the biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia*, 77, 130-136.
- Miller J.D. & Young J.C. (1985) Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7, 132-134.
- Miller J.D. & Arnison P.G. (1986) Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8, 147-150.
- Miller J.D., Fielder D.A., Dowd P.F., Norton R.A. & Collins F.W. (1996) Isolation of 4-acetylbenzoxazolin-2-one (4-ABOA) and diferuloylputrescine from an extract of *Gibberella* ear rot-resistant corn that blocks mycotoxin biosynthesis, and the insect toxicity of 4-ABOA and related compounds. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24, 647-658.
- Miller J.D. & Ewen M.A. (1997) Toxic effects of deoxynivalenol on ribosomes and tissues of the spring wheat cultivars Frontana and Casavant. *Natural Toxins*, 5, 234-237.
- Miller S.S., Chabot D.M.P., Ouellet T., Harris L.J. & 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.
- Moore J., Liu J.G., Zhou K.Q. & Yu L.L. (2006) Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5313-5322.
- Mpofu A., Sapirstein H.D. & Beta T. (2006) Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1265-1270.
- Mule 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.
- Nacz M. & Shahidi F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- Nagarajan V. & Bhat R.V. (1972) Factor responsible for varietal differences in aflatoxin production in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 911-914.

- Nicholson R.L. & Hammerschmidt R. (1992) Phenolic-compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369-389.
- Norton R.A. (1997) Effect of carotenoids on aflatoxin B1 synthesis by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 87, 814-821.
- Nowicki T.W., Gaba D.G., Dexter J.E., Matsuo R.R. & Clear R.M. (1988) Retention of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in wheat during processing and cooking of spaghetti and noodles. *Journal of Cereal Science*, 8, 189-202.
- O'Callaghan J., Stapleton P.C. & Dobson A.D.W. (2006) Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology*, 43, 213-221.
- O'Neill K., Damoglou A.P. & Patterson M.F. (1993) Toxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344 and *F. graminearum* NRRL 5883 on grain substrates. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 625-628.
- Onyeneho S.N. & Hettiarachchy N.S. (1992) Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1496-1500.
- Parker M.L., Ng A. & Waldron K.W. (2005) The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2539-2547.
- Parry D.W., Jenkinson P. & McLeod L. (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Passone M.A., Resnik S.L. & Etcheverry M.G. (2005) *In vitro* effect of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B1 accumulation by peanut *Aspergillus* section Flavi. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 682-691.
- Paster N., Juven B.J. & Harshemesh H. (1988) Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 64, 293-297.
- Paul S.S., Kamra D.N., Sastry V.R.B., Sahu N.P. & Kumar A. (2003) Effect of phenolic monomers on biomass and hydrolytic enzyme activities of an anaerobic fungus isolated from wild nil gai (*Baselophus tragocamelus*). *Letters in Applied Microbiology*, 36, 377-381.
- Penalva M.A. & Arst H.N. (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 426-446.
- Penalva M.A. & Arst H.N. (2004) Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual Review of Microbiology*, 58, 425-451.
- Peplow A.W., Tag A.G., Garifullina G.F. & Beremand M.N. (2003a) Identification of new genes positively regulated by *Tri10* and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2731-2736.
- Peplow A.W., Meek I.B., Wiles M.C., Phillips T.D. & Beremand M.N. (2003b) *Tri16* is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5935-5940.
- Pestka J.J., El-Bahrawy A. & Hart L.P. (1985) Deoxynivalenol and 15-monoacetyl deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* R6576 in liquid media. *Mycopathologia*, 91, 23-28.

- Peyron S., Surget A., Mabilhe F., Autran J.C., Rouau X. & Abecassis J. (2002) Evaluation of tissue dissociation of durum wheat grain (*Triticum durum* Desf.) generated by the milling process. *Journal of Cereal Science*, 36, 199-208.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002-2007.
- Pfaffl M.W., Horgan G.W. & Dempfle L. (2002) Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 1-10.
- Pinson-Gadais L., Barreau C., Chaurand M., Gregoire S., Monmarson M. & Richard-Forget F. (2007) Distribution of toxigenic *Fusarium spp.* and mycotoxin production in milling fractions of durum wheat. *Food Additives and Contaminants*, 24, 53-62.
- Pirgozliev S.R., Edwards S.G., Hare M.C. & Jenkinson P. (2003) Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 731-742.
- Ponts N. (2005) Influence de stress oxydatifs sur la biosynthèse de mycotoxines de *Fusarium spp.* contaminantes de l'épi de Maïs. Thèse, Université de Bordeaux, France, 415 p.
- Ponts N., Pinson-Gadais L., Verdal-Bonnin M.N., Barreau C. & Richard-Forget F. (2006) Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*, 258, 102-107.
- Ponts N., Pinson-Gadais L., Barreau C., Richard-Forget F. & Ouellet T. (2007) Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters*, 581, 443-447.
- Proctor R.H., Desjardins A.E., McCormick S.P., Plattner R.D., Alexander N.J. & Brown D.W. (2002) Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 691-698.
- Proctor R.H., Hohn T.M. & McCormick S.P. (1995a) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8, 593-601.
- Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P. & Desjardins A.E. (1995b) *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1923-1930.
- Ramirez M.L., Chulze S. & Magan N. (2006) Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 291-296.
- Regnier T. & Macheix J.J. (1996) Changes in wall-bound phenolic acids, phenylalanine and tyrosine ammonia-lyases, and peroxidases in developing durum wheat grains (*Triticum turgidum* L var Durum). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1727-1730.
- Reid L.M., Mather D.E., Arnason J.T., Hamilton R.I. & Bolton A.T. (1992) Changes in phenolic constituents of maize silk infected with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Botany*, 70, 1697-1702.

- Renger A. & Steinhart H. (2000) Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *European Food Research and Technology*, 211, 422-428.
- Reynoso M.M., Torres A.M., Ramirez M.L., Rodriguez M.I., Chulze S.N. & Magan N. (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.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G. (1996) Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Rocha O., Ansari K. & Doohan F.M. (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22, 369-378.
- Rohacik T. & Hudec K. (2005) Influence of agro-environmental factors on *Fusarium* infestation and population structure in wheat kernels. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12, 39-45.
- Ryu D. & Bullerman L.B. (1999) Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRRL 5883. *Journal of Food Protection*, 62, 1451-1455.
- Samapundo S., De Meulenaer B., Osei-Nimoh D., Lamboni Y., Debevere J. & Devlieghere F. (2007) Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology*, 24, 465-473.
- Santiago R., Butron A., Arnason J.T., Reid L.M., Souto X.C. & Malvar R.A. (2006a) Putative role of pith cell wall phenylpropanoids in *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2274-2279.
- Santiago R., Butron A., Reid L.M., Arnason J.T., Sandoya G., Souto X.C. & Malvar R.A. (2006b) Diferulate content of maize sheaths is associated with resistance to the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9140-9144.
- Santiago R., Reid L.M., Arnason J.T., Zhu X.Y., Martinez N. & Malvar R.A. (2007) Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to *Gibberella* stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5186-5193.
- Saraf A., Larsson L., Burge H. & Milton D. (1997) Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* amoebocyte lysate assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2554-2559.
- Schisler D.A., Khan N.I., Boehm M.J. & Slininger P.J. (2002) Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat. *Plant Disease*, 86, 1350-1356.
- Schollenberger M., Muller H.M., Ruffe M., Terry-Jara H., Suchy S., Plank S. & Drochner W. (2007) Natural occurrence of *Fusarium* toxins in soy food marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 142-146.
- Scott P.M. (1998) Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire*, 149, 543-548.



- Seitz L.M., Mohr H.E., Burroughs R. & Sauer D.B. (1977) Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chemistry*, 54, 1207-1217.
- Sen A., Miller S.S., Arnason J.T. & Fulcher R.G. (1991) Quantitative determination by high performance liquid chromatography and microspectrofluorimetry of phenolic acids in maize grain. *Phytochemical Analysis*, 2, 225-229.
- Sen A., Bergvinson D., Miller S.S., Atkinson J., Fulcher R.G. & Arnason J.T. (1994) Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids, and phenolic acid amides in maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1879-1883.
- Seyer M.-E. (2005) Les fibres alimentaires et le pain de blé entier. Thèse, Université de Laval, Canada, source: <http://www.theses.ulaval.ca/2005/23027/23027.html>.
- Shin H.D. & Chen R.R.Z. (2006) Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 478-485.
- Simmonds D.H. & O'Brien T.P. (1981) Morphological and biochemical development of the wheat endosperm. *Advances in Cereal Science and Technology*, 4, 5-70.
- Sinha K.K. & Premlata S. (1981) Effect of some phenolics on aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus*. *Indian Phytopathology*, 34, 530-531.
- Sinha K.K. (1990) Prevention of aflatoxin production in some cereals and oil-seeds by natural plant constituents. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 14, 109-120.
- Siranidou E., Kang Z. & Buchenauer H. (2002) Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *Journal of Phytopathology*, 150, 200-208.
- Snijders C.H.A. & Perkowski J. (1990) Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology*, 80, 566-570.
- Sosulski F., Krygier K. & Hogge L. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 337-340.
- Sugiura Y., Watanabe Y., Tanaka T., Yamamoto S. & Ueno Y. (1990) Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3047-3051.
- Sutton J.C. (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 195-209.
- Sypecka Z., Kelly M. & Brereton P. (2004) Deoxynivalenol and zearalenone residues in eggs of laying hens fed with a naturally contaminated diet: effects on egg production and estimation of transmission rates from feed to eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5463-5471.
- Tag A.G., Garifullina G.F., Peplow A.W., Ake C., Phillips T.D., Hohn T.M. & Beremand M.N. (2001) A novel regulatory gene, *Tri10*, controls trichothecene toxin production and gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5294-5302.

- Teich A.H. & Nelson K. (1984) Survey of *Fusarium* head blight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983. *Canadian Plant Disease Survey*, 64, 11-13.
- Teich A.H., Shugar L. & Smid A. (1987) Soft white winter wheat cultivar field-resistance to scab and deoxynivalenol accumulation. *Cereal Research Communications*, 15, 109-114.
- Thompson D.P. (1992) Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia*, 84, 791-793.
- Thompson D.P., Metevia L. & Vessel T. (1993) Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *Journal of Food Protection*, 56, 134-138.
- Thompson D.P. (1996a) Effect of butylated hydroxyanisole on intracellular components of aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycological Research*, 100, 1256-1258.
- Thompson D.P. (1996b) Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection*, 59, 412-415.
- Tokai T., Koshino H., Takahashi-Ando N., Sato M., Fujimura M. & Kimura M. (2007) *Fusarium Tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353, 412-417.
- Topakas E., Stamatis H., Biely P., Kekos D., Macris B.J. & Christakopoulos P. (2003) Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *Journal of Biotechnology*, 102, 33-44.
- Topakas E. & Christakopoulos P. (2004) Enzymic release of phenolic antioxidants from plant cell-wall material. *NutraCos*, 3, 54-57.
- Torres A.M., Ramirez M.L., Arroyo M., Chulze S.N. & Magan N. (2003) Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 319-324.
- Ueno Y., Sawano M. & Ishii K. (1975) Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Applied Microbiology*, 30, 4-9.
- Ueno Y. (1985) The toxicology of mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology*, 14, 99-132.
- Uraih N., Cassity T.R. & Chipley J.R. (1977) Partial characterization of the mode of action of benzoic acid on aflatoxin biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 1580-1584.
- VanEtten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A. & Farmer E.E. (1994) 2 classes of plant antibiotics - Phytoalexins Versus Phytoanticipins. *Plant Cell*, 6, 1191-1192.
- Vesonder R.F., Ellis J.J., Kwolek W.F. & DeMarini D.J. (1982) Production of vomitoxin on corn by *Fusarium graminearum* NRRL 5883 and *Fusarium roseum* NRRL 6101. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 967-970.
- Vogel H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, 13, 42-43.

- Waalwijk C., Kastelein P., Vries I.d., Kerényi Z., Lee T.v.d., Hesselink T., Kohl J. & Kema G. (2003) Major changes in *Fusarium spp.* in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 743-754.
- Wagacha J.M. & Muthomi J.W. (2007) *Fusarium culmorum*: infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26, 877-885.
- Waldron K.W., Parr A.J., Ng A. & Ralph J. (1996) Cell wall esterified phenolic dimers: Identification and quantification by reverse phase high performance liquid chromatography and diode array detection. *Phytochemical Analysis*, 7, 305-312.
- Wallace G. & Fry S.C. (1994) Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology*, 151, 229-267.
- Wang Y.Z. & Miller J.D. (1988) Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance. *Journal of Phytopathology*, 122, 118-125.
- Wicklow D.T., Norton R.A. & McAlpin C.E. (1998)  $\beta$ -Carotene inhibition of aflatoxin biosynthesis among *Aspergillus flavus* genotypes from Illinois corn. *Mycoscience*, 39, 167-172.
- Wood M. (2002) Gene jockey fight *Fusarium* head blight. *Agricultural Research*, 50, 12-13.
- 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.
- Xu X.-M. (2003) Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 683-689.
- Yao H., Chen L., Sun F., Chen G. & Yu G. (2005) Significant reduction in pathogenicity in *Fusarium graminearum* caused by knock-out of *Tri12*, a trichothecene efflux pump gene. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 28, 32-36.
- Zhou K., Su L. & Yu L.L. (2004) Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6108-6114.

