

Analyse de facteurs biochimiques interagissant dans le processus de biosynthèse des TCT B

Recherche de facteurs de modulation des TCT B et analyse des mécanismes impliqués

Analysis of biochemical factors interacting with the process of TCT B biosynthesis

A search for factors modulating TCT B biosynthesis and analysis of the mechanisms implicated

Boutigny, Anne-Laure (1,2) ; Antanassova-Penichon, Vessela (2) ; Gros, Jacques (2) ; Christian, Barreau (2) ; Florence, Forget-Richard (2)

(1) IRTAC, 67 boulevard Richard Lenoir, 75011 Paris

(2) INRA – U.R. 1264 - Mycologie et Sécurité des Aliments (MycSA) Pôle Qualis, 71 avenue Edouard Bourleaux, B.P. n° 81, F-33883, Villenave d'Ornon Cedex - mël : cbarreau@bordeaux.inra.fr

Résumé

Chez les céréales, l'accumulation des mycotoxines de *Fusarium* dans les grains peut être limitée par des mécanismes naturels comme la transformation chimique des mycotoxines sous l'action d'activités métaboliques conduisant à une dégradation/détoxification ou l'inhibition de la biosynthèse des mycotoxines sous l'action de composés endogènes du grain. Les trichothecenes étant supposés jouer un rôle de facteur d'agressivité, diminuer la contamination en toxines des grains pourrait aussi limiter l'infection fongique.

Dans une étude précédente, nous avons mis en évidence l'existence de composés biochimiques inhibiteur de la biosynthèse des TCT B localisés dans les sons d'une variété de blé dur accumulant peu de mycotoxines. Dans ce contexte, la recherche de ces composés a été entreprise dans les sons de blé dur selon deux stratégies : (i) fractionnement successif des composés des sons jusqu'à purification et caractérisation d'entités inhibitrices et (ii) étude spécifique de l'effet de molécules "candidates" endogènes des sons sur la biosynthèse des TCT B par *Fusarium*

culmorum. Ces deux stratégies ont donc été menées à bien et leurs conclusions convergent. Nous avons mis en évidence que, *in vitro*, les acides phénoliques contenus dans les sons sont de puissants inhibiteurs de la biosynthèse des TCT B par *F. culmorum*. Les formes dimérisées seraient les plus efficaces pour remplir ce rôle. De plus, afin d'étudier les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la biosynthèse des TCT B, nous avons analysé par RT-PCR l'effet des acides phénoliques du son sur l'expression de gènes *Tri* impliqués dans la voie de biosynthèse des TCT B par *F.culmorum* et mis en évidence un effet au niveau transcriptionnel.

Mots clés : Céréale, fusariose, *Fusarium culmorum*, trichothécènes, composés phénoliques, voie de biosynthèse.

Abstract

In cereals, mycotoxins accumulation in kernels can be limited by some natural mechanisms such as chemical transformation of the toxins by metabolic activities leading to their degradation/detoxification or reduction of mycotoxins accumulation by inhibition of their biosynthesis by specific grain endogenous compounds. As trichothecenes have been described to act as virulence factors, reducing the toxin contamination of kernels could also limit fungal infection.

*In a previous study, 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. In this context, we decided to focus on the characterisation of such biochemical compounds using bran of a durum wheat variety less sensitive to mycotoxin accumulation and following two strategies: (i) successive fractionation of bran compound until purification and characterisation of inhibitory entities and (ii) specific study of the effect of "candidate" molecules contained in bran on TCT B biosynthesis. The two strategies were carried out leading to convergent conclusions. We demonstrated, at least in vitro, the inhibitory role of phenolic acids contained in bran on TCT B biosynthesis by *F. culmorum*. Moreover, the results obtained may suggest that the dimerized forms lead to a stronger inhibition. In order to study the mechanisms involved in toxin biosynthesis inhibition, we analysed by RT-PCR the effect of bran phenolic acids on the expression of various *Tri* genes involved in the TCT B biosynthetic pathway and found an effect at transcriptional level.*

Keywords: Cereal, FHB disease, Fusarium culmorum, trichothecenes, phenolic compounds, biosynthesis pathway.

Introduction

La fusariose du blé est un fléau conduisant à des pertes importantes sur les récoltes de céréales à travers le monde (Parry et al., 1995). L'impact de ce fléau, tant sur le plan économique que sociétal, a été considérablement renforcé ces derniers temps par la découverte que la plupart des espèces fongiques du genre *Fusarium* associées à la fusariose sont productrices de diverses mycotoxines qui s'accumulent dans les céréales (Desjardins and Proctor, 2007; Goswami and Kistler, 2004). Ces mycotoxines ont des effets toxicologiques néfastes sur l'homme et les animaux consommateurs de céréales contaminées (Bennett and Klich, 2003). En Europe, le risque d'occurrence de ces mycotoxines a été évalué au cours des dernières années (Bottalico and Perrone, 2002; Xu et al., 2005) et en prévention de ce risque, la Communauté Européenne a récemment élaboré une réglementation (EC No1126/2007) et publié des recommandations (576/2006/CE) concernant les céréales destinées à l'alimentation dans l'espace communautaire. Il est donc essentiel maintenant de pouvoir maîtriser l'accumulation de mycotoxines dans les céréales récoltées en Europe.

Les fongicides permettent de réduire l'occurrence de mycotoxines dans les céréales mais ne peuvent pas garantir l'absence de fusariotoxines (Champeil et al., 2004; Simpson and Weston, 2001). De plus, l'orientation actuelle est de limiter l'utilisation de produits phytosanitaires. Il faut donc trouver de nouvelles voies, utilisant des processus naturels, pour limiter cette accumulation de fusariotoxines dans les céréales. La sélection de variétés résistantes à la fusariose est la voie la plus prometteuse pour maîtriser le problème. Cependant, indépendamment de la résistance, il semble aussi qu'il y ait une très grande diversité entre variétés quand à l'accumulation de fusariotoxines dans les grains. Ainsi, sélectionner des variétés qui présenteraient à la fois une bonne résistance au développement du pathogène et permettraient en plus de limiter l'accumulation de mycotoxines dans les grains infectés représente un enjeu majeur.

Les différents processus naturels connus qui permettraient de limiter l'accumulation de toxines dans les grains sont décrits en partie dans l'article de M. Lemmens dans cette même issue et ont récemment fait l'objet d'une revue (Boutigny et al., 2008). Deux voies principales peuvent conduire à diminuer l'accumulation de déoxynivalénol dans le grain. La première découle de mécanismes de détoxification par modification de la toxine soit par voie naturelle (Lemmens et al., 2005) soit suite à la modification de la céréale par l'introduction d'un gène (OGM) de détoxification (Manoharan et al., 2006). La deuxième voie résulterait d'une moindre accumulation de trichothécènes B (TCT B) dans certaines variétés due à une composition biochimique du grain (composés inhibiteurs; effet substrat) limitant leur biosynthèse (Boutigny et al., 2008).

Au champ, la biosynthèse des fusariotoxines a lieu dans le grain pendant les phases de remplissage. La composition biochimique des grains à ce moment peut donc être déterminante. Des variations dans la composition pourraient expliquer les différences de sensibilité à l'accumulation de TCT B telles qu'elles avaient été observées pour des lignés de blé dur inoculés avec une souche de *Fusarium culmorum* (Favre et al., 2004). La présence de composés biochimiques, présents dans les sons de blé dur de variétés résistantes à l'accumulation de trichothécènes, et capables de réduire la synthèse de TCT B *in vitro* a été suggérée par la suite (Pinson-Gadais et al., 2007). Les sons de blé sont riches en acides phénols et l'hypothèse que ces composés pourraient interférer avec la biosynthèse de TCT B a été émise (Boutigny et al., 2008). Nous avons donc étudié la composition des sons de blé dur en acides phénols et analysé l'effet de différents monomères d'acides phénols sur la biosynthèse de trichothécènes *in vitro*. Les résultats de cette étude sont reportés ci-dessous.

D'autres composés présents dans les sons de blé pourraient aussi interférer avec la biosynthèse de trichothécènes. Nous avons parallèlement utilisé une approche sans *a priori* pour rechercher à partir d'extraits de sons de variétés résistantes à l'accumulation de mycotoxines, de tels composés naturels capables d'inhiber la biosynthèse de TCT B *in vitro*. Les résultats obtenus au cours de cette approche sont décrits dans la publication par Atanassova *et al.* dans cette même issue.

Afin de comprendre par quels mécanismes les composés phénoliques du grain modulent la toxigenèse, nous avons initié une étude de l'expression des gènes « Tri » de la voie de biosynthèse des trichothécènes. Les premiers résultats décrits ici montrent que *in vitro*, un traitement par certains composés phénoliques est capable réprimer fortement l'expression de ces gènes.

Matériels et Méthodes

1. Matériel biologique

Les variétés de blé dur (*Triticum turgidum* L. Subsp.*durum*) Orjaune et Nefer ont été choisies pour cette étude. La variété Nefer est sensible à l'accumulation de mycotoxines alors que la variété Orjaune est beaucoup moins sensible (Favre *et al.* 2004). Des sons de ces deux variétés nous ont été fournis par la Grande Semoulerie de l'Ouest. Plusieurs souches de *Fusarium culmorum* ont été utilisées au cours de ce travail. Ces souches sont toutes des souches référencées dans la collection du laboratoire MycSA (tableau 1) dont le chemotype et le potentiel de production de trichothécène sur grain avaient été précédemment déterminés.

Tableau 1 : Souches de *Fusarium* utilisées au cours de l'étude

Code INRA	Espèce	Chémotype	Potentiel toxinogène ^a
INRA 117	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	60,95
INRA 124	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	317,56
INRA 233	<i>F. culmorum</i>	DON/ADON	27,72
INRA 130	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	63,56
INRA 319	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	8,71
INRA 132	<i>F. culmorum</i>	NIV/FX	119,73

^a potentiel toxinogène exprimé en µg de TCT B par g de grain sec après 3 semaines de culture à 25°C

Le milieu de culture SM utilisé a été mis au point par A.L. Boutigny (Boutigny, 2007). Ce milieu contient 0,5 g/L de KH₂PO₄, 0,6 g/L de K₂HPO₄, 0,017 g/L de MgSO₄, 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,1 mg/L de biotine, 20g/L de glucose, et 0,1 mL/L de la solution d'éléments trace décrite par Vogel (Vogel, 1956). Ce milieu de culture synthétique est pauvre et ainsi permet l'induction rapide de la toxinogénèse lors de culture *in vitro* de souches de *Fusarium*.

Les cultures ont été réalisées dans huit millilitres de milieu dans des boîtes de Petri de cinq centimètres de diamètre à 25 °C à l'obscurité sans agitation. Les cultures ont été inoculées avec une suspension de spores de façon à obtenir une concentration finale de 4x10⁶ spores/ml. Le mycélium a été récupéré par centrifugation et lyophilisé pour déterminer la biomasse sèche et les surnageants de culture utilisés pour le dosage de toxine.

2. Méthodes

2.1. Méthodes analytiques

Les TCT B ont été extraits du milieu de culture selon la méthode décrite par N. Ponts (Ponts et al. 2003) sauf que tous les volumes ont été adaptés pour l'extraction de cinq millilitres de surnageant de culture. Les acides phénoliques liés à la paroi ont été extraits selon la méthode décrite par B. Bakan (Bakan et al., 2003).

2.2. Méthodes moléculaires

Pour l'extraction d'ARN, les cultures ont été filtrées sous vide à l'aide d'un système VISIPREP™ DL (Supelco) sur des filtres en polyéthylène stériles (Supelco). Les mycéliums ont été rincés deux fois avec de l'eau MilliQ stérile et congelés dans de l'azote liquide puis placés à -80°C. Les ARN ont été extraits et convertis par réverse transcription en ADNc comme décrit précédemment (Ponts et al., 2007). Les 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 MgCl₂, 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 2. Les conditions de la PCR étaient : 94°C pendant 2 min, 28 x (95°C pendant 15 s, T_m°C pendant 30 s, 72°C pendant 30 s), puis conservation à 4°C. Les produits d'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (w/v).

Tableau 2 : Amorces utilisées pour amplifier les gènes *Ef2*, *β-tub*, *Gapdh*, *Tri4*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri101*, *Tri6* et *Tri10* 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 CCATACCGGCGCCGTACCACCACC	63	FG09530
<i>Gapdh</i>	Gapdh-F CCTTTTCATTGAGCCTCAC	Gapdh-R CGTACATGGGAGCGTC	60	FG06257
<i>L15</i>	L15-F GGGTGCCCTCAAGTACGTCG	L15-R GGCCGACACGCTCCTCGGCCG	59	FG00845
<i>Tri4</i>	Tri4-F* TATTGTTGGCTACCCCAAGG	Tri4-R* TGTCAGATGCGCCTTACAAA	58	FG03535
<i>Tri5</i>	Tri5-F GACCCTAAGCGACTACAG	Tri5-R GTGCTACGGATAAGGTTT	58	FG03537
<i>Tri11</i>	Tri11-F AGCCGTCTACTTCCTATG	Tri11-R ACTACTGAAACGCGCA	60	FG03540
<i>Tri12</i>	Tri12-F ATTCGGTACATGGGCT	Tri12-R GCAGTGTGTTCTGCTCA	57	FG12013
<i>Tri101</i>	Tri101-F* AGGGCATTAGCGAGGAAACACA	Tri101-R* ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC	59	AB011417
<i>Tri6</i>	Tri6-F* AGCGCCTTGCCCTCTTTG	Tri6-R* AGCCTTTGGTGCCGACTTCTTG	58	FG03536
<i>Tri10</i>	Tri10-F* TCTGAACAGGGGATGGTATGGA	Tri10-R* CTGCGGCGAGTGAGTTTGACA	58	FG03538
<i>Fpps</i>	Fpps-F CATGATCGCCATTAACGAC	Fpps-R CAATGTGTTCCGGGCTT	57	FG06784

Résultats

1. Analyse de la composition en acides phénoliques des sons de blé dur de deux variétés

Dans les grains, plusieurs acides phénoliques sont présents simultanément et à des concentrations différentes. Ces acides phénoliques existent sous une forme soluble ou sous une forme insoluble liée aux parois cellulaires et sont à la base de la lignine. Les acides phénoliques sont majoritairement présents sous formes insolubles (McCallum and Walker, 1991). Au cours de l'interaction entre *Fusarium* et le blé, les acides phénoliques liés aux parois cellulaires pourraient être libérés progressivement (Siranidou et al., 2002) et participer à l'interaction avec la toxigenèse. Les compositions en acides phénoliques de deux variétés de blé dur, la variété Orjaune qui accumule peu de mycotoxines et la variété Nefer qui est plus sensible à l'accumulation de mycotoxines, ont été analysées.

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 ci-dessus. 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 de Matière Sèche (MS)) que dans les sons de la variété Nefer (4,5 µg/g MS).

Tableau 3 : Contenu en acides phénoliques solubles libres des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer.

acides phenoliques solubles libres	Contenu (µg/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

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 ci-dessous. Il est à noter que les concentrations en acides phénoliques insolubles liés sont environ 300 fois supérieures aux concentrations en acides phénoliques solubles chez les 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 (Mpofu et al., 2006; Parker et al., 2005; Zhou et al., 2004). 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 MS dans les sons de la variété Orjaune et de 1699 µg/g dans les sons de la variété Nefer.

Tableau 4 : Contenu en acides phénoliques (monomères) insolubles liés des sons de blé dur des variétés Orjaune et Nefer.

acides phenoliques liés	Contenu (µg/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

2. Effet d'acides phénoliques sur la mycotoxinogénèse

2.1. Effet de monomères d'acides phénoliques

Divers monomères acides phénoliques 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*-hydroxybenzoïque, 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 and 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 1a et 1b) en utilisant un milieu de culture synthétique SM (Boutigny, 2007). 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).

Les résultats obtenus montrent que, dans ces conditions de culture, les acides sinapique et caféique inhibent totalement la biosynthèse de TCT B par la souche INRA 117 (figure 1a). 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.

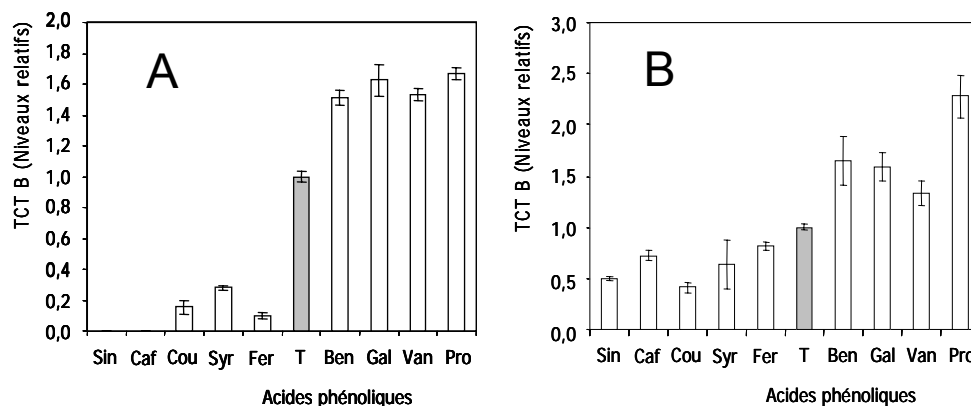


Figure 1: Niveaux relatifs de TCT B produits par les souches de *F. culmorum* INRA 117 (A) et INRA 319 (B) sur milieu MS supplémenté ou non avec différents acides phénoliques.

Les niveaux de TCT B produits sont analysés après 10 jours de culture. Les acides phénoliques ont été ajoutés 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 protocatéchuique. L'effet des acides phénoliques est analysé après 10 jours de culture. 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 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 1b). 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 montrent que certains acides phénoliques sont capables d'inhiber la biosynthèse de TCT B *in vitro*. Cependant il semble que cette sensibilité aux acides phénoliques soit souche dépendante.

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 (effet anti-mycotoxine) alors que les acides p-hydroxybenzoïque, gallique, vanillique et protocatéchuique ont un effet activateur.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces effets différents 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.

2.2. 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 2 ci-dessous. 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.

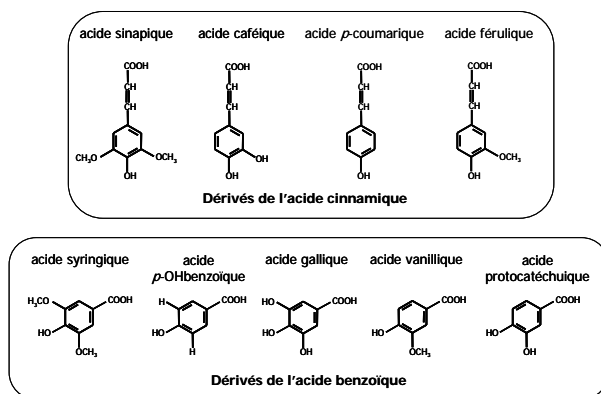


Figure 2 : Structures chimiques des acides phénoliques de l'étude

La présence du motif $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ 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 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ 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* suggérait que les dérivés de l'acide cinnamique ont une action inhibitrice de la croissance plus importante que les dérivés de l'acide benzoïque (Favre, 2004). Dans cette étude, il a 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 ($-\text{OCH}_3$) 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.

2.3. Relation propriétés anti-oxydantes 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'H₂O₂ stimulait la production de DON/ADON (Ponts et al., 2007; Ponts et al., 2006). Au contraire, d'autres études ont montré que des composés antioxydants pouvaient avoir un effet inhibiteur de la production de mycotoxines, telles que les aflatoxines (Passone et al., 2005; Thompson, 1996) ou encore les fumonisines (Etcheverry et al., 2002; Reynoso et al., 2002; Torres et al., 2003).

Tableau 5 : 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 (Kim and Lee, 2004) selon la méthode VCEAC (vitamin C equivalent antioxidant capacity).

** Le temps de rétention en HPLC sert d'indicateur de lipophilicité.

Les potentiels antioxydants des acides phénoliques de notre étude sont présentés dans le tableau 5. 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 3).

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 du 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 (2005) 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.

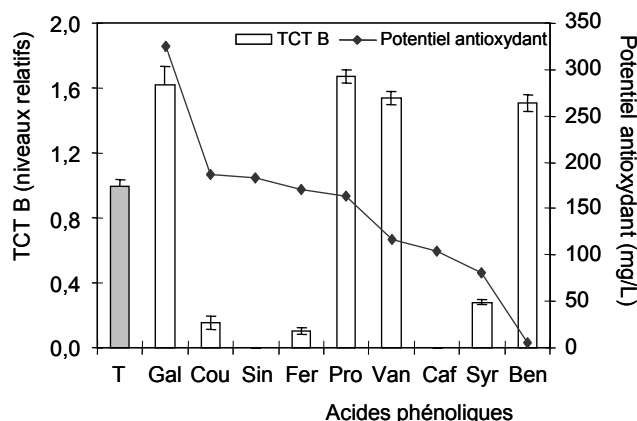


Figure 3 : Relation entre le potentiel antioxydant des acides phénoliques et leur effet sur la biosynthèse de toxines par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée en milieu SM. Sin : acide sinapique, Caf : acide caféique, Cou : acide p-coumarique, Syr : acide syringique, Fer : acide férulique, T : témoin, Ben : acide p-OH benzoïque, Gal : acide gallique, Van : acide vanillique, Pro : acide protocatéchuïque.

2.4. 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 pourrait dépendre 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, peuvent être caractérisées par le temps de rétention de ces acides phénoliques en HPLC. Les valeurs sont données dans le tableau 5 ci-avant.

Nous avons comparé la lipophilicité évaluée par cette méthode avec les niveaux de TCT B produits par la souche INRA 117 en culture en présence de ces composés (figure 4). 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.

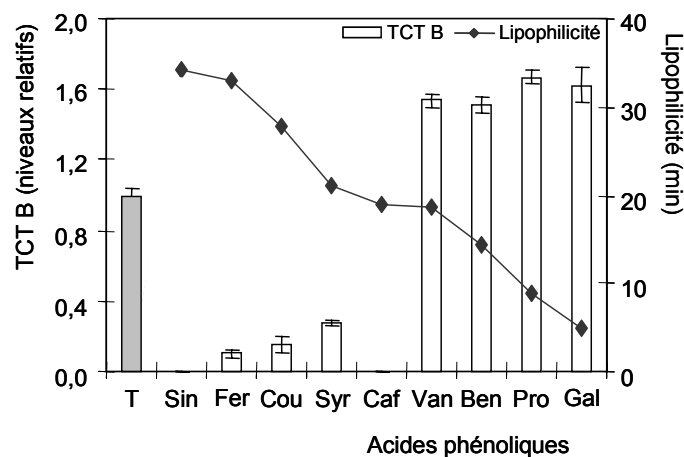


Figure 4 : Relation entre la lipophilicité des acides phénoliques et leur effet sur la biosynthèse de toxines par la souche de *F. culmorum* INRA 117 cultivée en milieu SM. Sin : acide sinapique, Caf : acide caféique, Cou : acide p-coumarique, Syr : acide syringique, Fer : acide férulique, T : témoin, Ben : acide p-OH benzoïque, Gal : acide gallique, Van : acide vanillique, Pro : acide protocatéchuique.

Nos résultats montrent aussi 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 effet stimulateur de la mycotoxinogénèse. Ceci suggère que la lipophilicité ne serait pas la seule caractéristique permettant d'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 à l'intérieur des cellules, les acides phénoliques pourraient avoir des mécanismes d'action différents.

2.5. Bilan des effets des acides phénoliques sur six souches de *F. culmorum*

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. Les résultats regroupés avec ceux des deux souches précédentes sont synthétisés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Bilan des effets observés sur la production de TCT B pour six 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 grise (-) représente un effet inhibiteur ; une case hachurée (+), un effet activateur et une case blanche (0), un effet non significatif sur la biosynthèse des trichothécènes B.

Ces résultats permettent de généraliser que les acides sinapique, caféique, p-coumarique, syringique et férulique ont un effet inhibiteur de la mycotoxinogénèse des six souches de *Fusarium*, excepté pour l'acide syringique pour lequel il n'a pas été observé d'effet significatif sur la production de TCT B par la souche INRA 124. En ce qui concerne les acides p-hydroxybenzoïque, gallique, vanillique et protocatéchuique, les effets observés sur la mycotoxinogénèse des six souches correspondent soit à une activation soit n'ont pas d'effet significatif sauf pour la souche INRA 132 où une inhibition par les acides p-hydroxybenzoïque, gallique et vanillique est observée.

En conclusion, nous avons mis en évidence des effets sur la mycotoxinogénèse acides phénoliques dépendants. Il semble que d'une façon générale, nos résultats suggèrent que les effets modulateurs de la mycotoxinogénèse des acides phénoliques sont liés à leur structure chimique ainsi qu'à leur pouvoir lipophile. Les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique ont plus généralement un effet inhibiteur alors que, excepté pour l'acide syringique, ceux dérivés de l'acide benzoïque, n'ont pas d'effet ou ont un effet activateur. Cependant, il faut remarquer que l'effet souche reste très important. Il faut noter aussi que l'effet observé pourrait être très dépendant du milieu de culture dans lequel l'action des acides phénoliques est analysée. Ainsi, il a été précédemment observé par N. Ponts (Ponts 2005) que, pour des souches de *F. graminearum* cultivées in vitro dans du milieu GYEP, c'est l'acide p-hydroxybenzoïque qui présentait un effet inhibiteur alors que les acides férulique et p-coumarique montraient un effet activateur de la toxinogénèse. Ainsi, de par leurs propriétés anti-oxydante et/ou lipophile, les monomères d'acides phénols, à des doses qui n'affectent pas la croissance, agiraient sur la physiologie du champignon et modifieraient son métabolisme secondaire.

3. Effet de composés extraits de son blé dur sur la mycotoxinogénèse

Les acides phénols ajoutés individuellement sont capables d'inhiber *in vitro* la biosynthèse des trichothécènes. Cependant, nous avons vu que dans les grains, les acides phénols sont présents sous forme de mélange. De plus, dans les grains, il pourrait exister différentes entités présentant un effet inhibiteur.

3.1. Effet d'acides phénoliques extraits des sons de blé dur

En premier lieu, l'effet d'un mélange naturel d'acides phénols extraits à partir de sons de blé sur la biosynthèse de toxine a été analysé. Cet effet a été comparé avec celui obtenu avec un mélange reconstitué avec des acides phénols purs de façon à avoir la même composition en monomères que le mélange naturel. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article soumis pour publication (Boutigny et al. soumis; Boutigny 2007). Le mélange naturel d'acides phénoliques extrait des sons de blé de la variété Orjaune a un effet inhibiteur nettement supérieur à celui de l'effet du mélange reconstitué, suggérant que d'autres composés que le mélange de monomères d'acides phénoliques participent à l'effet anti-mycotoxine. L'analyse par HPLC/MS de ce mélange naturel a montré la présence en quantités relativement importantes de plusieurs formes d'acide di-férulique qui pourraient renforcer l'effet inhibiteur (voir Atanassova-Penichon et al. dans cette même issue).

3.2. Effet de fractions purifiées à partir de sons de blé dur

Une approche sans *a priori* a été utilisée pour rechercher des composés du grain qui présenteraient une activité inhibitrice de la mycotoxinogénèse. Un extrait polaire obtenu à partir de son de blé de la variété Orjaune a été fractionné par une série de chromatographies sur différents supports afin de rechercher des fractions présentant un effet anti-mycotoxine sur la biosynthèse de trichothécènes. Une fraction présentant une activité inhibitrice importante a été obtenue. Par analyse HPLC, trois pics majeurs ont été mis en évidence dans cette fraction (voir l'article par Atanassova-Penichon et al. dans cette même issue).

Le premier pic renferme un composé qui a été identifié comme étant du tryptophane. Le tryptophane entre aussi dans la composition du troisième pic puisque l'analyse en spectre de masse en mode d'ionisation positif montre qu'un des fragments est similaire à celui du tryptophane. Malheureusement, l'autre partie de cette molécule de nature peptidique n'a pu être identifiée pour l'instant. L'effet des composés contenus dans ces deux fractions sur la biosynthèse de trichothécènes a été analysé sans qu'aucune inhibition n'ait été observée. Parallèlement, l'effet de concentrations croissantes de tryptophane pur sur la biosynthèse de TCT B a été analysé (Figure 4).

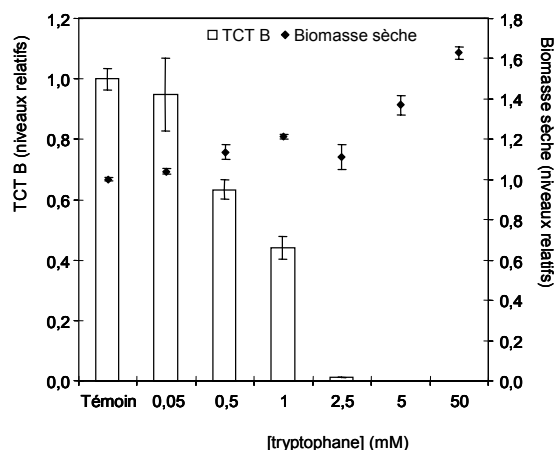


Figure 4 : Production de biomasse sèche et biosynthèse de TCT B par *F. culmorum*. La souche INRA 117 a été cultivée sur milieu MS supplémenté avec différentes concentrations en tryptophane. Les niveaux de TCT B produits ont été analysés après 10 jours de culture. Les niveaux de biomasse sèche produite et de TCT B sont exprimés en niveaux relatifs par rapport aux niveaux dans le témoin.

Jusqu'à 2,5 mM en tryptophane, il n'y a pas d'effet sur l'accumulation de biomasse. Pour des concentrations plus élevées, une augmentation de la biomasse produite est observée. A partir de 0,5 mM une inhibition significative de la biosynthèse de TCT B est constatée, et l'inhibition quasi-totale est obtenue à 2,5 mM. Le tryptophane a donc une action inhibitrice de la mycotoxinogénèse. Cependant, la concentration en tryptophane estimée dans les fractions correspondant aux deux pics un et trois est très faible (<0,3 mM). Ceci expliquerait que l'on n'ait pas observé d'effet inhibiteur avec ces fractions.

Le deuxième pic présente un effet inhibiteur très important (environ 90% d'inhibition) sur la synthèse de trichothécènes. L'analyse en spectrométrie de masse suggère que ce deuxième pic contient une molécule présentant une structure dimérique dérivé d'une molécule d'acide férulique (voir l'article par Atanassova-Penichon et al. dans cette même issue). Bien que l'identification complète de cette molécule n'ait pu être réalisée à ce jour, cette méthode sans a priori nous a conduit à nouveau à mettre en évidence une molécule de nature phénolique. Cette molécule s'avère être un puissant inhibiteur car sa concentration estimée dans l'essai d'inhibition conduisant à une réduction de 90% de la biosynthèse de TCT B serait inférieure à 0,07 mM.

4. Etude du mécanisme d'action des acides phénols

4.1. Effet de l'acide férulique sur la biosynthèse des TCT B

Nous avons étudié plus en détail l'effet de l'acide férulique sur la biosynthèse de TCT B. Les résultats de cette étude, décrits par ailleurs (Boutigny et al. Soumis pour publication) ont montré que l'addition d'acide férulique au moment de l'inoculation ou après trois jours de culture conduit à un même niveau d'inhibition de la biosynthèse des TCT B. De plus, l'effet de l'acide férulique est cumulatif lorsqu'il est ajouté avant l'inoculation et une deuxième addition à lieu trois jours après le début de la culture. Cette étude a permis aussi de montrer que le traitement des cultures par l'acide férulique conduisait à une réduction significative de l'expression des gènes « Tri » de la voie de biosynthèses de trichothécènes, suggérant que l'effet inhibiteur observé pourrait résulter au moins en partie d'une régulation au niveau transcriptionnel des gènes impliqués dans la biosynthèse des TCT B.

4.2. Les acides phénols extraits des sons de blé sont de puissants inhibiteurs de la transcription des gènes « Tri »

Afin de vérifier si l'inhibition de la biosynthèse des TCT B par les acides phénols extrait des sons de blé pouvaient aussi résulter d'une inhibition de la transcription des gènes « Tri », nous avons analysé l'expression de plusieurs de ces gènes par RT-PCR après traitement par le mélange naturel d'acides phénols extrait des sons (Figure 1A) ou après traitement par le composé dimère du Pic 2 purifié par chromatographie (Figure 1B) en comparaison avec le témoin non traité.

Les résultats obtenus montrent que le mélange d'acides phénols totaux extrait du son ainsi que le composé à base d'acide férulique purifié à partir d'un extrait soluble de son sont tous les deux capables d'inhiber fortement la transcription de tous les gènes « *Tri* », alors que l'expression des gènes de ménage *EF2alpha* (Fig.1A) ou *GAPDH* (Fig.1B) n'est pas affecté par les traitements.

Les acides phénols présents dans les sons de blé, que ce soit sous forme de monomères, de dimères ou en mélange de monomères et dimères, se révèlent être in vitro de puissants inhibiteurs de la transcription des gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes. Bien que ce stade de notre étude, un effet inhibiteur direct de ces composés phénoliques au niveau des activités enzymatiques responsables de la synthèse des trichothécènes ne soit pas à exclure, cette régulation au niveau transcriptionnel pourrait parfaitement à elle seule expliquer l'effet inhibiteur exercé par ces molécules sur la biosynthèse des trichothécènes.

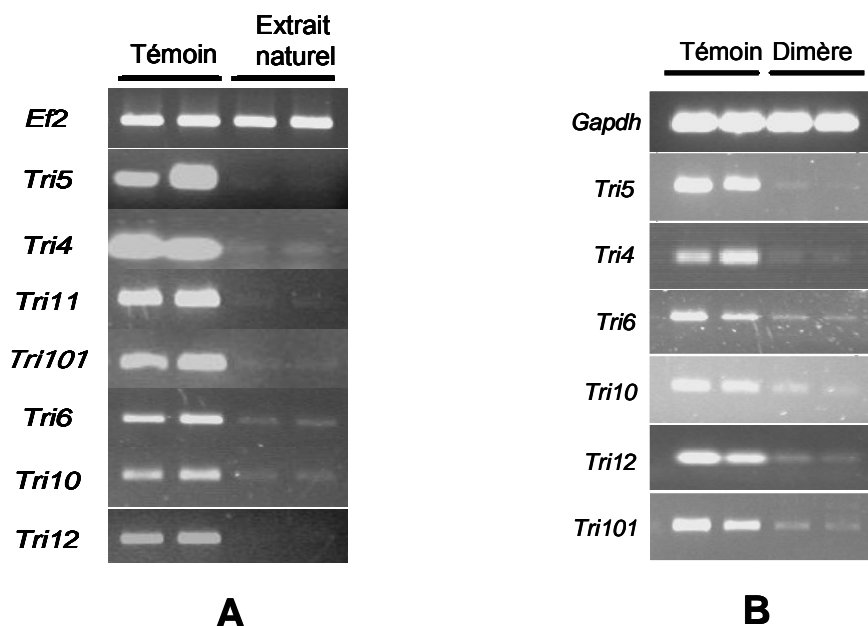


Figure 5 : Analyse de l'effet de traitements par les acides phénols extrait de sons de blé sur l'expression de gènes « Tri » de la voie de biosynthèse des TCT B de *F. culmorum*. Les analyses ont été réalisées au 5ème jour de culture de la souche INRA 117 cultivée en milieu SM pour deux répétitions biologiques. (A) Traitement avec les acides phénols totaux extraits de sons de blé. La quantité d'extrait ajouté a été ajustée de façon que la concentration finale de l'acide férulique soit égale à 0,5 mM. (B) Traitement avec le composé du Pic2 purifié à partir de sons de blé. La concentration dans l'essai du composé purifié a été estimée à environ 0,070 mM.

Conclusion

Les deux stratégies suivies ont démontré que des composants biochimiques entrant dans la composition des grains de blé dur sont capables d'inhiber *in vitro* la biosynthèse de TCTB par *F. culmorum*. Les deux approches ont conduit à identifier des composés de nature phénolique, soit sous forme monomères d'acides phénoliques, soit sous des formes plus complexes. Ces molécules sont observées dans le grain à la récolte. Cependant, nous avons par ailleurs montré que chez le blé tendre, ils sont déjà abondamment présents dès 10 jours après la floraison (Boutigny, 2007), c'est-à-dire pendant la période où les trichothécènes s'accumulent dans les grains contaminés par *Fusarium*. Il pourraient donc, en fonction de leur disponibilité au moment où s'initie la biosynthèse de TCT B, moduler l'accumulation de la toxine dans les grains en formation.

Les monomères d'acides phénols, issus de la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes, existent sous forme libre dans le grain, mais les quantités disponibles

sont probablement trop faibles pour pouvoir interférer avec la toxigenèse. Par contre, ils sont abondamment présents sous forme liés dans les parois cellulaires, en particulier dans les chaînes de polysaccharide et dans la lignine. Dans le grain, c'est dans les sons de blé qu'ils sont les plus abondants. Ces acides phénols liés pourraient être libérés par des hydrolases du pathogène, lors de l'attaque du grain. De même leur biosynthèse pourrait être modifiée en réponse à l'agression du pathogène. Dans ces conditions, il est possible que des différences variétales au niveau des acides phénols liés puissent conduire à des gradations dans la sensibilité à l'accumulation de toxine. L'étude des formes phénoliques, libérées des grains de blé par des hydrolases du type feruloyl estérase de *Fusarium*, au stade où la biosynthèse des trichothécènes est induite dans le grain, pourrait permettre de caractériser les composés phénoliques libérés à ce stade critique.

Des formes dimériques d'acide phénol pourraient avoir une action anti-mycotoxinogène encore plus importantes que leurs formes monomériques. Bily et al. (2003) avait pour la première fois identifié une relation possible entre le contenu en grain de maïs en dimères d'acide férulique et la résistance à la fusariose. Notre étude à nouveau identifie une forme dimérique comme un puissant inhibiteur de la toxigenèse *in vitro* et laisse suggérer que, dans les extraits d'acides phénols de sons de blé, les formes oligomériques pourraient renforcer l'effet anti-mycotoxinogène du mélange de monomères. Il serait particulièrement intéressant de purifier chacune de ces formes pour étudier directement leur effet sur la toxigenèse *in vitro*.

Les premiers éléments obtenus en ce qui concerne le mécanisme possible d'action des acides phénols suggèrent un effet en relation avec leur lipophilicité, couplé éventuellement avec leur capacité antioxydante. L'efficacité de ces molécules comme inhibiteur de la biosynthèse de toxine pourrait en premier lieu dépendre de leur capacité à traverser la membrane cellulaire du champignon. Une fois à l'intérieur, les acides phénols agiraient comme antioxydants, perturbant l'équilibre rédox du champignon et modulant ainsi la toxigenèse. Ponts et al. (2007) ont en effet montré que le niveau d'induction de la synthèse de TCT B était très dépendant de la présence de l'espèce oxydante H₂O₂ dans le milieu de culture et que ce composé est capable d'induire des régulations au niveau transcriptionnel. L'analyse du niveau d'expression de gènes « Tri » de la voie de biosynthèse de trichothécènes en réponse aux traitements par les molécules de nature phénolique montre que l'effet passe aussi par une forte régulation au niveau transcriptionnel. Cependant, les mécanismes exacts de régulation impliqués restent encore à déterminer.

Les composés du grain de nature phénolique pourraient jouer un rôle important dans la sensibilité à l'accumulation de trichothécènes. Sachant qu'il peut exister des différences importantes de ces molécules au niveau variétal, il reste à confirmer que *in planta*, ces différences jouent un rôle dans l'accumulation de toxines. Une fois cette étape franchie, le contenu en certains acides phénoliques ou dimères d'acide phénolique pourra servir de critère pour la sélection de variétés résistantes à l'accumulation de trichothécènes.

Remerciements

Cette étude a été réalisée avec le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale de la Recherche et de L'innovation (Réseau de recherche et d'innovation technologiques Alimentation Référence Europe). A.L.B. a bénéficié d'une bourse CIFRE financée par l'ANRT et l'IRTAC.

Références

- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:2826-2831.
- Bennett, J.W., and M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16:497-516.
- Bily, A.C., L.M. Reid, and J.H. Taylor. 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*. 93:712-719.
- Bottalico, A., and G. Perrone. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*. 108:611-624.
- Boutigny, A.L. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. In Doctoral thesis. Université de Bordeaux 1, Bordeaux. 202 pages.
- Boutigny, A.L., F. Richard-Forget, and C. Barreau. 2008. Natural mechanism for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology*. 121:411-423.
- 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 Science*. 166:1389-1415.
- Desjardins, A.E., T.M. Hohn, and S.P. McCormick. 1993. Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species - Chemistry, Genetics, and Significance. *Microbiological Reviews*. 57:595-604.
- Desjardins, A.E., and R.H. Proctor. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024.
- 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*. 92:624-32.
- 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 2nd International Symposium on *Fusarium* Head Blight., Orlando, Florida, USA.
- Goswami, R.S., and H.C. Kistler. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*. 5:515-525.
- Guiraud, P., R. Steiman, F. Seiglemurandi, and J.L. Benoitguyod. 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.
- Kim, D.O., and C.Y. Lee. 2004. Comprehensive study an vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44:253-273.

Colloque Fusariotoxines des Céréales – Arcachon - 11–13 septembre 2007
www.symposcience.org

- 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 Chemistry*. 95:466-473.
- Lemmens, M., U. Scholz, F. Berthiller, C. Dall'Asta, A. Koutnik, R. Schuhmacher, G. Adam, H. Buerstmayr, A. Mesterhazy, R. Krska, and P. Ruckebauer. 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.
- Manoharan, M., L.S. Dahleen, T.M. Hohn, S.M. Neate, X.H. Yu, N.J. Alexander, S.P. McCormick, P. Bregitzer, P.B. Schwarz, and R.D. Horsley. 2006. Expression of 3-OH trichothecene acetyltransferase in barley (*Hordeum vulgare* L.) and effects on deoxynivalenol. *Plant Science*. 171:699-706.
- McCallum, J.A., and J.R.L. Walker. 1991. Phenolic biosynthesis during grain development in wheat (*Triticum aestivum* L.) III. Changes in hydroxycinnamic acids during grain development. *Journal of Cereal Science*. 13.
- Mpofu, A., H.D. Sapirstein, and T. Beta. 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.
- Onyeneho, S.N., and N.S. Hettiarachchy. 1992. Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:1496-1500.
- 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85:2539-2547.
- Parry, D.W., P. Jenkinson, and L. McLeod. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*. 44:207-238.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*. 99:682-691.
- 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 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. . Université Bordeaux 1, Bordeaux. 415.
- Ponts, N., L. Pinson-Gadais, C. Barreau, F. Richard-Forget, and T. Ouellet. 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of Fusarium graminearum. *Febs Letters*. 581:443-447.
- 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 Microbiology Letters*. 258:102-107.
- Reynoso, M.M., A.M. Torres, and M.L. Ramirez. 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.
- Simpson, and Weston. 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology*. 107:421-431.

- Siranidou, E., Z. Kang, and H. Buchenauer. 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.
- Thompson, D.P. 1996. Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection*. 59:412 - 415.
- 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.
- Vogel, H.J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*. 13:42-43.
- Xu, X.M., D.W. Parry, P. Nicholson, M.A. Thomsett, D. Simpson, S.G. Edwards, B.M. Cooke, F.M. Doohan, J.M. Brennan, A. Moretti, G. Tocco, G. Mule, L. Hornok, G. Giczey, and J. Tatnell. 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology*. 112:143-154.
- Zhou, K., L. Su, and L.L. Yu. 2004. Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:6108-6114.