



Mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la production de trichothécènes de type B par *Fusarium graminearum* en réponse au stress oxydant

Mathilde Montibus

► To cite this version:

Mathilde Montibus. Mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la production de trichothécènes de type B par *Fusarium graminearum* en réponse au stress oxydant. Sciences agricoles. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR14924 . tel-00933710

HAL Id: tel-00933710

<https://theses.hal.science/tel-00933710>

Submitted on 21 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 4924

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX I

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Mathilde MONTIBUS

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline Microbiologie

**Mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation
de la production de trichothécènes de type B par *Fusarium graminearum*
en réponse au stress oxydant**

Soutenue le 29 novembre 2013, après avis de :

Massimo REVERBERI, Enseignant-Chercheur, Université de Rome, Rapporteur

Philippe SILAR, Professeur, Université Paris Diderot, Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Michel HERNOULD, Professeur, Université de Bordeaux, Président du jury

Frédéric REVERS, Chargé de Recherche, INRA de Bordeaux, Examineur

Muriel VIAUD, Chargée de Recherche, INRA de Versailles-Grignon, Examineur

Florence RICHARD-FORGET, Directeur de Recherche, INRA de Bordeaux, Directrice de thèse

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité Mycologie et Sécurité des Aliments de l'INRA de Bordeaux dans le cadre d'une bourse INRA – Région Aquitaine.

Je remercie le jury, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je remercie tout d'abord Jean-Michel Savoie, directeur de l'unité MycSA, pour m'avoir accueillie au laboratoire pendant ces trois années.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Florence Richard-Forget et Christian Barreau qui m'ont accordé leur confiance et qui m'ont encadrée pendant ces trois années. Merci pour tous les conseils que vous m'avez prodigués, pour toutes les choses que j'ai eu la chance d'apprendre grâce à vous. Vous m'avez permis de participer à des congrès internationaux, de publier une revue bibliographique en plus d'articles scientifiques, de travailler dans de très bonnes conditions. Grâce à vous j'ai également appris à ne pas trop déprimer devant un résultat négatif et à aller de l'avant, chose pas toujours évidente. Merci Florence pour avoir rendu nos déplacements toujours plus animés ! Et Merci Christian pour avoir partagé le bureau pendant trois ans, ce qui a amené de nombreuses discussions, conseils, suggestions. Merci également à toi Nadia. Malgré ton arrivée en cours de route, tu m'as permis de découvrir les joies de la transcriptomique, tu m'as initiée au RNAseq, tu m'as coachée en Anglais. Je sais que vous avez tous les trois souvent supporté mon stress et ma psychose de la répétition.

Merci à Laetitia et Vessela pour leur patience, leurs conseils et leur bonne humeur. J'ai pu apprivoiser les HPLC et la qPCR grâce à vous. Merci également pour votre gentillesse et votre humour, qui ont égayé mes pauses.

Merci à toi Marie-Noëlle pour toutes les manipulations que tu as réalisées et pour ton aide précieuse. Nous avons travaillé dans la bonne humeur, et grâce à toi, j'ai pu faire beaucoup plus d'analyses que si j'avais travaillé seule. Merci également à toi Christine, tu m'as beaucoup aidé en q-PCR, merci pour nos discussions en écoutant France Inter, mais en travaillant bien entendu. Je n'oublie pas Françoise, qui a pris soin de nos petits « Fusa ». Merci également à Gisèle pour son aide logistique, et à Enric pour son aide technique, et ses petites crises du vendredi, qui arrivaient d'ailleurs parfois plus tôt dans la semaine !

Merci à Corinne et Marie-France pour m'avoir aidée administrativement, parce que pourquoi faire simple quand on peut faire compliqué et ce n'est rien de le dire ! Merci également à Thierry pour avoir pris soin de mon ordinateur, et j'ai bien sûr une pensée pour Bernard.

Merci à tout le reste de l'équipe, Christophe, Marie, Francis, Philippe, Michèle, Nathalie, Magalie et Cathy. Merci pour votre gentillesse.

Ma vie à MycSA a été formidable durant ces trois années grâce à vous tous et je sais que j'ai eu beaucoup de chance de tomber sur une équipe aussi sympathique.

Je remercie Sybille Duret et Franck Salin qui m'ont chacun donné un peu de leur temps pour apprendre à faire un beau southern ou une belle banque pour le proton. Merci aussi à Jörg Bormann pour les manipulations de pathogénicité.

Je remercie maintenant Claire, devenue étudiante en thèse aux Pays-Bas, qui a contribué à ce travail de thèse. Merci pour avoir fait avancer mes recherches, pour ta gentillesse et ton sérieux. Tu m'as fait découvrir les joies de l'encadrement!

Je remercie également tous les gens croisés au laboratoire pour quelques semaines ou plusieurs mois. Je pense particulièrement à Jawad, Anne-Laure, Adeline, Melissa et Sophie. Merci également à mes collègues de thèse Carlitos, Ccori, Léa et Benoît. Vous êtes des collègues en or, toujours d'accord pour un kim-tao.

Merci également à mes anciens encadrants, Lionel et Christine, qui m'ont « guidée » sur la voie de la thèse.

Pour terminer, je souhaite remercier ma famille. Plus particulièrement, merci à mes parents, sans qui je n'aurais pas pu en arriver là. Je sais que vous nous avez toujours aidés financièrement et moralement, sans que ce soit toujours facile. Merci à vous Bertille et Benoît. C'est un peu grâce à vous que je suis arrivée à Bordeaux, vous m'avez soutenue quand c'était difficile. Enfin, merci à toi Orél pour ta patience, ton affection et ton support durant mes moments de stress et de doute.

Publications scientifiques

Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., and Ponts, N. **Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi.** 2013. *Critical Reviews in Microbiology*. Online.

DOI 10.3109/1040841X.2013.829416

Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M.N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*.** *Plos One*.
Accepté pour publication, Sous presse.

Montibus, M., Khosravi, C., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **Is the *Fgap1* mediated response to oxidative stress chemotype-dependent in *F. graminearum*?** *FEMS Microbiology Letters* Article rédigé pour soumission.

Communications Scientifiques

Communications orales

Montibus, M., Zehraoui, E., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **Does Fgap1 regulate *Tri* genes expression and B type trichothecene production in response to oxidative stress in *Fusarium graminearum*?** *Fusarium satellite meeting, Max-Planck Institute*. Marburg, Allemagne, 30 mars 2012.

Montibus, M., Zehraoui, E., Ducos, C., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **Fgap1-mediated response to oxidative stress in trichothecene-producing *Fusarium graminearum*.** *27th Fungal Genetics Meeting*, Assilomar, Californie, 12-17 mars 2013.

Montibus, M., Zehraoui, E., Ducos, C., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **Implication du facteur Fgap1 dans la réponse au stress oxydant chez *Fusarium graminearum*.** *Journée de l'Ecole Doctorale SVS Bordeaux, Arcachon, France*, 10 avril 2013. Prix de la meilleure communication orale.

Montibus, M., Zehraoui, E., Ducos, C., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **Fgap1-mediated response to oxidative stress in *Fusarium graminearum*.** *12th European Fusarium Seminar* Bordeaux, France, 12-16 mai 2013.

Présentations poster

Montibus, M., Zehraoui, E., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **Does *Fgap1* regulate *Tri* gene expression and trichothecene B production in response to oxidative stress in *Fusarium graminearum*?** *11th European Conference on Fungal Genetics*. Marburg, Allemagne, 30 mars – 2 avril 2012.

Montibus, M., Zehraoui, E., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **Does *Fgap1* regulate *Tri* gene expression and trichothecene B production in response to oxidative stress in *Fusarium graminearum*?** *Journées des Microbiologistes de l'INRA 2012*, L'Isle-sur-la-Sorgue, France, 13-15 novembre 2012.

Montibus, M., Zehraoui, E., Ducos, C., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. **Fgap1-mediated response to oxidative stress in trichothecene-producing *Fusarium graminearum*.** *27th Fungal Genetics Meeting*, Assilomar, Californie, 12-17 mars 2013.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADON	Acetyldeoxynivalenol
ACN	Acétonitrile
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
CD	Catéchol-dioxygénase
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CMC	Carboxymethyl cellulose
CRD	Cystein-rich domain
DAD	Diode array detector
DON	Déoxynivalénol
EC	European Commission
ET	Ethylène
FPP	Farnésyl pyrophosphate
FX	Fusarenone X
GFP	Green fluorescent protein
GYEP	Glucose yeast extract peptone
HPLC	High performance liquid chromatography
HR	Réponse hypersensible
JA	Jasmonic acid
MAP	Mitogen-activated protein
MS	Minimum synthetic
NES	Nuclear export signal
NIV	Nivalénol
OSR	Oxidative stress response
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Potatoes dextrose agar
PR	Pathogenesis related
QTL	Quantitative trait locus
ROS	Reactive oxygen species

RPKM	Reads per kilobase mapped
RPM	Rotation par minute
RT	Reverse transcription
SA	Salicylic acid
SOD	Superoxide dismutase
<i>spp.</i>	Species
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TCT	Trichothécène
TCTB	Trichothécènes de type B

Table des matières

Avant-propos	1
Introduction et contexte bibliographique	4
I- La Fusariose : une maladie fongique des cultures céréalières dévastatrice	5
II- <i>Fusarium graminearum</i> : élément central responsable de la fusariose	7
III- <i>Fusarium graminearum</i> : cycle infectieux	8
IV- Pratiques agricoles pour limiter l'apparition de la maladie	9
V- Les mycotoxines produites par le champignon <i>Fusarium graminearum</i>	11
V-1-Structure chimique des trichothécènes	11
V-2-Toxicité et réglementation	12
V-3-Biosynthèse et régulation des trichothécènes de type B	17
VI- Le dialogue plante/pathogène et le rôle des TCTB	19
VI- 1-Côté plante	20
VI- 2-Côté champignon	22
VII- Connexion entre la réponse transcriptionnelle au stress oxydant et le métabolisme secondaire chez les champignons filamenteux	23
Revue bibliographique : Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi	23
Abstract	23
I-Introduction	24
II-The antioxidant defense system	27
II-1-Non-enzymatic systems	27
II-2-Enzymatic systems	30
III-Transcriptional control of genes involved in the fungal antioxidant machinery	34
III-1-Control by nuclear localization of TFs	35
III-2-Control by phosphorylation of TFs	41
IV-What is the link between oxidative stress and secondary metabolism?	46

VIII- La modulation de la production de TCTB ne peut être déconnectée des voies métaboliques-----	50
IX-Projet de thèse -----	52
Références -----	54

Chapitre 1: Implication de <i>Fgap1</i> dans la réponse au stress oxydant	71
---	----

<u>Article 1</u> : The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in <i>Fusarium graminearum</i> -----	73
Abstract -----	73
I-Introduction -----	74
II- Materials and methods -----	76
II-1- Fungal strain and culture conditions-----	76
II-2- Bacteria and yeast strains used for cloning-----	77
II-3- Type B trichothecenes analysis -----	78
II-4- <i>In silico</i> identification of Fgap1 -----	78
II-5- Engineering of $\Delta Fgap1$, $\Delta Fgap1:ap1$ and $Fgap1^c_{trunc}$ -----	79
II-6- Fungal transformation -----	80
II-7- Southern blot analysis -----	81
II-8- RNA extraction and cDNA preparation-----	82
II-9- Gene expression analysis-----	82
II-10- Plant infection assays -----	83
II-11-Expression of results and statistical analysis -----	83
III- Results -----	84
III-1- Identification of Fgap1, a Yap1 homologue in <i>F. graminearum</i> ----	84
III-2- Stress tolerance and <i>Fgap1</i> -----	84
III-3- Trichothecene production and <i>Fgap1</i> -----	86
III-4- Pathogenicity of <i>Fgap1</i> mutants -----	87
III-5- <i>Fgap1</i> and trichothecenes B production in response to H ₂ O ₂ mediated oxidative stress -----	87
III-6- <i>Fgap1</i> and genes encoding antioxidant activities-----	88
IV- Discussion -----	89
Etude de la localisation subcellulaire de Fgap1 -----	95
I-Introduction -----	95
II- Procédures expérimentales -----	96
III- Résultats et discussion -----	99
Références -----	101

Chapitre 2 : L'implication de <i>Fgap1</i> dans la réponse au stress oxydant est-elle chémotype-dépendante ?	105
--	-----

Article 2 : Is the <i>Fgap1</i> mediated response to oxidative stress chemotype-dependent in <i>F. graminearum</i>?	107
Abstract	107
I-Introduction	108
II- Materials and methods	110
II-1- Fungal strains, media and culture conditions	110
II-2- Construction of a <i>Fgap1</i> deleted mutant	111
II-3- Fungal transformation	111
II-4- Nucleic acid manipulations, PCR and RT-PCR analysis	112
II-5- Type B trichothecene analyses	113
II-6- Preparation of cell-free extracts	113
II-7- Determination of catalase activity	113
II-8- Expression of results and statistical analysis	113
III- Results	114
III-1- Impact of H ₂ O ₂ and diamide on trichothecene B production by <i>Fusarium graminearum</i>	114
III-2- Effect of <i>Fgap1</i> deletion on TCTB production	115
III-3- <i>Fgap1</i> and the response to diamide mediated-oxidative stress	116
III-4- <i>Fgap1</i> and antioxidant activities	117
IV- Discussion	119
Références	122

Chapitre 3 : Rôle de <i>Fgap1</i> dans la modulation de la production de TCTB en réponse aux acides phénoliques	125
---	-----

I-Introduction	127
II-Procédures expérimentales	128
II-1-Souches, milieux et conditions de culture	128
II-2-Analyses HPLC	129
II-3-Manipulation des acides nucléiques et qPCR	130
III-Résultats	131
III-1-Analyse de la production de TCTB en réponse à l'acide férulique et à l'acide caféique	131
III-2-Analyse de l'expression des gènes <i>Tri</i> en réponse à l'acide férulique et à l'acide caféique	132
III-3-Analyse de l'expression des gènes de réponse aux variations redox en réponse à l'acide férulique et à l'acide caféique	133
IV-Discussion	134
Références	139

Chapitre 4: Régulation de l'expression du génome de <i>F. graminearum</i> et paramètres redox	141
---	-----

I- Introduction	143
II- Procédures expérimentales	145
II-1- Souches fongiques, conditions de culture, analyse des TCTB, préparation des ARNs et analyse q-RT-PCR	145
II-2-Préparation des banques et séquençage	146
II-3- Préparation des séquences et alignement sur le génome de référence	146
II-4- Comparaison des profils transcriptomiques	147
III- Résultats	148
III-1- Conditions biologiques utilisées pour l'analyse RNA-seq, accumulation de trichothécènes et expression des gènes <i>Tri</i> correspondant	148
III-2- Analyse transcriptomique globale par mRNA-seq : pré-traitement des lectures de séquençage	149
III-3- Expression différentielle	152
IV- Conclusion	152
Références	155

Discussion générale et perspectives	157
-------------------------------------	-----

I-Réponse aux variations rédox et chémotype	159
II-Implication de <i>Fgap1</i> dans la réponse aux variations redox	163
III- Conclusion et perspectives	169

Références bibliographiques	172
-----------------------------	-----

Annexes	193
---------	-----

Table des illustrations

Tableaux

Introduction et contexte bibliographique

Tableau 1 : Concentrations maximales autorisées en DON dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, d'après le règlement (CE) n°1126/2007-----	15
Tableau 2 : Fonction des gènes <i>Tri</i> -----	16

Chapitre 1: Implication de *Fgap1* dans la réponse au stress oxydant

Article 1 : The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*

Table S1: List of primers used for vector constructions and transformants screening -----	79
Table 1: Primers used to amplify cDNA by real-time PCR -----	82
Table 2: Toxin analysis and genes expression in the wild-type strain, the $\Delta Fgap1$ and the $\Delta Fgap1:ap1$ after 4 days of growth -----	85
Table 3: DON + 15 ADON levels in wheat ears after 21 days after point inoculation of two central spikelets -----	86
Tableau 1 : Liste des amorces utilisées pour les constructions avec la eGFP-----	96

Chapitre 2 : L'implication de *Fgap1* dans la réponse au stress oxydant est-elle chémotype-dépendante ?

Article 2 : Is the *Fgap1* mediated response to oxidative stress chemotype-dependent in *Fusarium graminearum*?

Table 1. Primers used for vector construction, transformants screening and semi-quantitative PCR analysis -----	111
Table 2. Type B trichothecene accumulation in liquid cultures after 14 days of growth of <i>Fusarium graminearum</i> strains-----	114
Table 3. Type B trichothecene accumulation in liquid cultures supplemented with diamide after 14 days of growth of <i>Fusarium graminearum</i> strains -----	116

Chapitre 3 : Rôle de *Fgap1* dans la modulation de la production de TCTB en réponse aux acides phénoliques

Table 1 : Liste des primers utilisés pour les analyses qPCR -----	130
---	-----

Chapitre 4: Régulation de l'expression du génome de *F. graminearum* et paramètres redox

Tableau 1: Amorces utilisées pour les analyses par q-RT-PCR -----	145
Tableau 2 : Résumé des conditions expérimentales testées -----	148
Tableau 3 : Rendements de séquençage -----	149
Tableau 4 : Statistiques d'alignement sur le génome de <i>F. graminearum</i> -----	150
Tableau 5 : Valeurs d'expression normalisées pour les gènes <i>Tri</i> à 4 jours de culture-----	151
Tableau 6 : Analyse d'expression différentielle entre échantillons pris deux à deux ($p \leq 0.1$; $FDR \leq 0.01$) -----	152

Figures

Introduction et contexte bibliographique

Figure 1: Fusariose de l'épi sur blé -----	5
Figure 2 : Grains de blé fusariés et sains -----	6
Figure 3 : Cycle de vie de <i>Fusarium graminearum</i> -----	8
Figure 4 : Représentation schématique de l'anatomie d'un épi de blé -----	9
Figure 5 : Observation microscopique d'une structure apparentée à un appressorium -----	9
Figure 6 : Schéma représentant les différents facteurs à maîtriser pour limiter l'apparition de la fusariose de l'épi et ses conséquences -----	10
Figure 7 : Classification des différentes familles de trichothécènes -----	12
Figure 8 : Structure chimique des trichothécènes de type B -----	12
Figure 9 : Représentation schématique du « cluster <i>Tri 5</i> », et des trois loci regroupant les gènes <i>Tri</i> chez <i>F. graminearum</i> -----	16
Figure 10 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des trichothécènes. -----	17

Revue bibliographique : Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi

Figure 1: Yap1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -----	35
Figure 2: Msn2/msn4 in <i>S. cerevisiae</i> -----	39
Figure 3: Skn7 in <i>S. cerevisiae</i> -----	41
Figure 4: Atf1 in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> -----	44
Figure 5: A link between oxidative stress and secondary metabolism -----	48

Chapitre 1: Implication de *Fgap1* dans la réponse au stress oxydant

Article 1 : The bZIP transcription factor *Fgap1* mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*

Figure S1: Multiple sequence alignment of <i>Fgap1</i> with others ap1 homologous sequences -----	83
Figure 1: Radial growth assay to evaluate stress tolerance in <i>F. graminearum</i> wild-type strain and mutants -----	84
Figure 2: <i>Fgap1</i> plays a role in toxin accumulation and <i>Tri</i> genes expression -----	85
Figure 3: Wheat ears inoculated with <i>F. graminearum</i> wild-type strain, $\Delta Fgap1$, $\Delta Fgap1:ap1$, and <i>Fgap1</i> ^{c trunc} -----	86

Figure 4: Toxin production and <i>Tri</i> genes expression in the wild-type strain and in the $\Delta Fgap1$ and <i>Fgap1^{c trunc}</i> mutants after exposure to oxidative stress by H ₂ O ₂ -----	87
Figure 5: Expression of genes encoding antioxidant activities in the wild-type strain and in the $\Delta Fgap1$ and <i>Fgap1^{c trunc}</i> mutants-----	88
Figure S2: Construction of $\Delta Fgap1$ and <i>Fgap1^{c trunc}</i> mutants-----	95
Figure 1 : Schémas des constructions envisagées avec la eGFP -----	96
Figure 2 : Western-blot montrant l'expression de l'eGFP-----	99
Figure 3 : Localisation de la fusion <i>eGFP::Fgap1</i> -----	100

Chapitre 2 : L'implication de *Fgap1* dans la réponse au stress oxydant est-elle chémotype-dépendante ?

Article 2 : Is the *Fgap1* mediated response to oxidative stress chemotype-dependent in *F. graminearum*?

Fig. 1. TCTB biosynthesis by <i>Fusarium graminearum</i> DON/ADON (I605) or NIV/FX (I91) strains after 14 days of growth in MS medium-----	115
Fig. 2. Expression of <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri101</i> and <i>GAPDH</i> analyzed by RT-PCR, at day 4 post-inoculation, for the wild-type strain (WT) and the $\Delta Fgap1$ mutant of the DON/ADON chemotype or of the NIV/FX chemotype, in a medium supplemented (+) or not (-) with diamide 0.5mM -----	116
Fig. 3. Expression of genes encoding antioxidant activities and <i>GAPDH</i> , by RT-PCR, at day 4 post-inoculation, for the wild-type strain (WT) and the $\Delta Fgap1$ mutant of the DON/ADON chemotype or of the NIV/FX chemotype, in a medium supplemented (+) or not (-) with diamide 0.5mM -----	117
Fig. 4. Ratios of catalase activities of cell-free extracts from 4 day-old fungal cultures grown in GYEP supplemented or not with diamide 0.5mM -----	118
Fig. S1. Construction of $\Delta Fgap1$ mutants-----	121

Chapitre 3 : Rôle de *Fgap1* dans la modulation de la production de TCTB en réponse aux acides phénoliques

Figure 1 : Structures chimiques de l'acide chlorogénique, de l'acide caféique et de l'acide férulique -----	127
Figure 2 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'accumulation de TCTB chez une souche DON/ADON et un mutant DON/ADON $\Delta Fgap1$ après 14 jours de culture-----	131
Figure 3 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'accumulation de TCTB chez une souche NIV/FX et un mutant NIV/FX $\Delta Fgap1$ après 14 jours de culture -----	132

Figure 4 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'expression des gènes <i>Tri</i> chez une souche DON/ADON et un mutant DON/ADON $\Delta Fgap1$ après 4 jours de culture -----	132
Figure 5 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'expression des gènes <i>Tri</i> chez une souche NIV/FX et un mutant NIV/FX $\Delta Fgap1$ après 4 jours de culture-----	133
Figure 6 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'expression des gènes de réponse aux variations rédox chez une souche DON/ADON et un mutant DON/ADON $\Delta Fgap1$ après 4 jours de culture-----	134
Figure 7 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'expression des gènes de réponse aux variations rédox chez une souche NIV/FX et un mutant NIV/FX $\Delta Fgap1$ après 4 jours de culture-----	134

Chapitre 4: Régulation de l'expression du génome de *F. graminearum* et paramètres redox

Figure 1: Production en trichothécènes pour les souches étudiées-----	149
Figure 2 : Niveau d'expression des gènes <i>Tri4</i> , <i>Tri5</i> , <i>Tri6</i> et <i>Tri101</i> après 4 jours de culture -----	150
Figure 3 : Dispersion des valeurs d'expression avant la normalisation des données-----	152
Figure 4 : Dispersion des valeurs d'expression après la normalisation des données-----	152
Figure S1 : Plan de réalisation du séquençage et de son analyse -----	153
Figure S2 : Alignements des lectures de séquençages sur le gène FGSG_088000 (<i>Fgap1</i>)-----	153

Discussion générale et perspectives

Figure 1 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de cette thèse ---	169
---	-----

Avant-propos

Fusarium est un champignon filamenteux phytopathogène qui se développe au champ sur les cultures telles que le blé, le maïs ou l'orge. La maladie associée à ce champignon, appelée fusariose, s'attaque généralement aux céréales au moment de la floraison et provoque une nécrose des épis, mais peut aussi dans certains cas provoquer une fonte des semis. Plus précisément, la fusariose des épis est désignée « *Fusarium* Head Blight » ou « FHB ». Cette maladie entraîne une diminution importante des rendements, ce qui engendre des pertes économiques importantes.

En plus de la fusariose, le champignon est souvent associé à la production de métabolites secondaires toxiques, des mycotoxines. L'espèce *F. graminearum*, majoritairement présente sur blé en Europe, produit des mycotoxines appelées trichothécènes de type B. L'occurrence de ces toxines dans les grains n'est pas corrélée à l'intensité des symptômes de fusariose. Ces molécules sont également stables chimiquement et thermiquement, et peuvent se retrouver dans des produits transformés destinés à l'alimentation humaine. Même si les risques de toxicité aigüe envers l'homme dus à des niveaux élevés de ces toxines dans les grains sont aujourd'hui bien contrôlés, les risques de toxicité chronique suite à la présence des toxines dans la chaîne alimentaire sont mal maîtrisés. Par conséquent, la maîtrise de la fusariose présente un double enjeu : sanitaire et économique.

Notre travail s'inscrit dans la lutte contre la contamination des céréales par des mycotoxines de *Fusarium*. Pour limiter au mieux la contamination, il est primordial de comprendre le processus d'infection de la plante hôte et les mécanismes induisant la biosynthèse des toxines de *Fusarium*.

Nos recherches se sont centrées sur le pathosystème *Fusarium graminearum*/blé. Nous savons que *F. graminearum* induit chez le blé un « burst » oxydatif, qui déclenche les réponses de défense de la plante et nous savons également que le peroxyde d'hydrogène induit *in vitro* une stimulation de l'accumulation de toxines chez ce même champignon. Nous avons ici étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse au stress oxydant.

Avant d'exposer nos résultats, nous débiterons par un état des lieux sur *F. graminearum* et sur ses mycotoxines. Nous nous intéresserons également à la réponse des champignons filamenteux au stress oxydant et de son lien avec le métabolisme secondaire, plus particulièrement chez *F. graminearum*.

*Introduction et
contexte
bibliographique*



Figure 1: Fusariose de l'épi sur blé
(http://www.uky.edu/Ag/Wheat/wheat_breeding/FHB).

I- La Fusariose : une maladie fongique des cultures céréalières dévastatrice

La fusariose est une maladie affectant les céréales à petits grains telles que le blé, l'orge, l'avoine ou également le maïs (Parry et al., 1995, Sutton, 1982). Elle est associée à un complexe d'espèces fongiques regroupant deux genres de champignons phytopathogènes : *Fusarium* et *Microdochium* (Arseniuk et al., 1999). La maladie peut affecter diverses parties de la plante, des racines jusqu'aux épis, et il est possible de distinguer plusieurs types de fusarioses (Parry et al., 1995):

- La fusariose des semences ou « seedling blight »
- La fusariose du collet ou « foot rot »
- La fusariose de l'épi ou « head blight »

Nos travaux sont centrés sur la fusariose de l'épi. Cette maladie (Figure 1) a été décrite pour la première fois en 1884 en Angleterre sous le terme « *Fusarium* Head Blight » ou « FHB », et a pris une ampleur considérable ces dernières années en Asie, au Canada, en Europe ou encore en Amérique du Sud (Goswami and Kistler, 2004). La maladie a été identifiée comme un facteur majeur limitant la production du blé dans plusieurs parties du monde (Stack, 2000).

Les infections peuvent dévaster des cultures entières et engendrer des pertes économiques importantes dues à une forte diminution de rendements. Aux Etats-Unis, les pertes liées à la maladie ont été estimées, entre 1998 et 2000, à 2.7 milliards de dollars (Wood, 2002). Dans les années 90, la maladie a provoqué des pertes considérables, avec en 1996, une perte estimée à 100 millions de dollars dans l'Ohio, liée à une diminution des rendements (McMullen et al., 1997).



Figure 2 : Grains de blé fusariés et sains (source Ministère de l'Agriculture et de l'Aquaculture - Canada).

Au Dakota du Nord, les rendements pour le blé et l'orge ont été particulièrement affectés par la fusariose en 1994 et 1995 (Windels, 2000). En Nouvelle-Zélande en 2000, 45% des cultures de blé de printemps étaient infectées par la maladie (Cromey et al., 2001). En Chine, la fusariose de l'épi est considérée comme la maladie la plus préjudiciable pour les cultures d'orge et de blé. De 1951 à 1990, 7 épisodes d'épidémies sévères ont eu lieu dans ce pays et ont engendré plus de 40% de pertes de rendement (Leonard and Bushnell, 2003). Au Japon, en 1998, les pertes de rendement des cultures d'orge ont été estimées de 67 à 96% (Leonard and Bushnell, 2003). En Europe, plusieurs épidémies ont également été recensées. En Roumanie, la maladie a engendré jusqu'à 40% de pertes dans les années 80. En Hongrie, en 1970, la maladie sur blé a entraîné 40 à 50% de pertes de rendement (Parry et al., 1995). Ces données illustrent clairement les pertes agronomiques et donc économiques liées à la fusariose.

La fusariose de l'épi provoque une perte de rendement liée à une altération de la qualité des grains (Pirgozliev et al., 2003). Les grains de blé fusariés sont atrophiés, ridés, décolorés et peuvent présenter un duvet blanc ou rosé (Figure 2). Des points noirs peuvent également être visibles au niveau de l'embryon du grain (Champeil et al., 2004, Christ et al., 2011, Windels, 2000). La maladie affecte également les qualités nutritives du grain, par une destruction des protéines de stockage (Bechtel et al., 1985). La qualité germinative de semences contaminées est également affectée, ce qui peut entraîner des symptômes de fusariose au niveau des tiges de jeunes plantules pouvant aller jusqu'à une fonte des semis (Pirgozliev et al., 2003).

II- *Fusarium graminearum* : élément central responsable de la fusariose

La fusariose de l'épi peut être causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* et *Microdochium nivale* (Arseniuk et al., 1999). Parmi ces espèces, cinq sont les plus fréquemment retrouvées au niveau mondial : *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* et *Microdochium nivale* (Parry et al., 1995). La distribution et la prédominance des espèces dépendent cependant du climat, de la région et de l'espèce céréalière cultivée (Leonard and Bushnell, 2003). Aux Etats-Unis, une étude sur blé dans le nord du pays a montré la prédominance de *F. graminearum* (68%) et *F. culmorum* (14%), suivis par *F. poae* (8.2%) (Wilcoxon et al., 1988). Au Canada, *F. graminearum* est remplacé graduellement par *F. avenaceum* qui deviendrait le pathogène principalement responsable de la fusariose de l'épi sur blé (Leonard and Bushnell, 2003). En Europe, trois espèces sont principalement associées avec la fusariose de l'épi : *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. avenaceum* (Bottalico and Perrone, 2002). En Italie, les espèces prédominantes sont *F. graminearum*, suivie de *F. culmorum* et *F. avenaceum* (Bottalico and Perrone, 2002). En Suisse, les espèces les plus représentées sur blé sont *F. graminearum* (jusqu'à 42% des épis atteints) et *F. avenaceum* (Schachermayr and Fried, 2000). Au Royaume-Uni, une étude réalisée en 1995 indiquait que le Sud-Ouest et l'Ecosse étaient principalement affectés par la maladie, avec une prévalence de *F. graminearum* et *F. culmorum* comme agents pathogènes (Polley and Turner, 1995). En France, sur plus de 700 échantillons de blé tendre, de blé dur ou d'orge analysés en 2000, *F. graminearum* a été retrouvé de manière prédominante (83.3%), suivi par *F. avenaceum* et *F. poae* (64.1% et 62.5% respectivement) (Ioos et al., 2004). Des résultats récents obtenus dans notre laboratoire dans le cadre du projet ANR DON&Co (CES 2010) ont confirmé la prédominance de

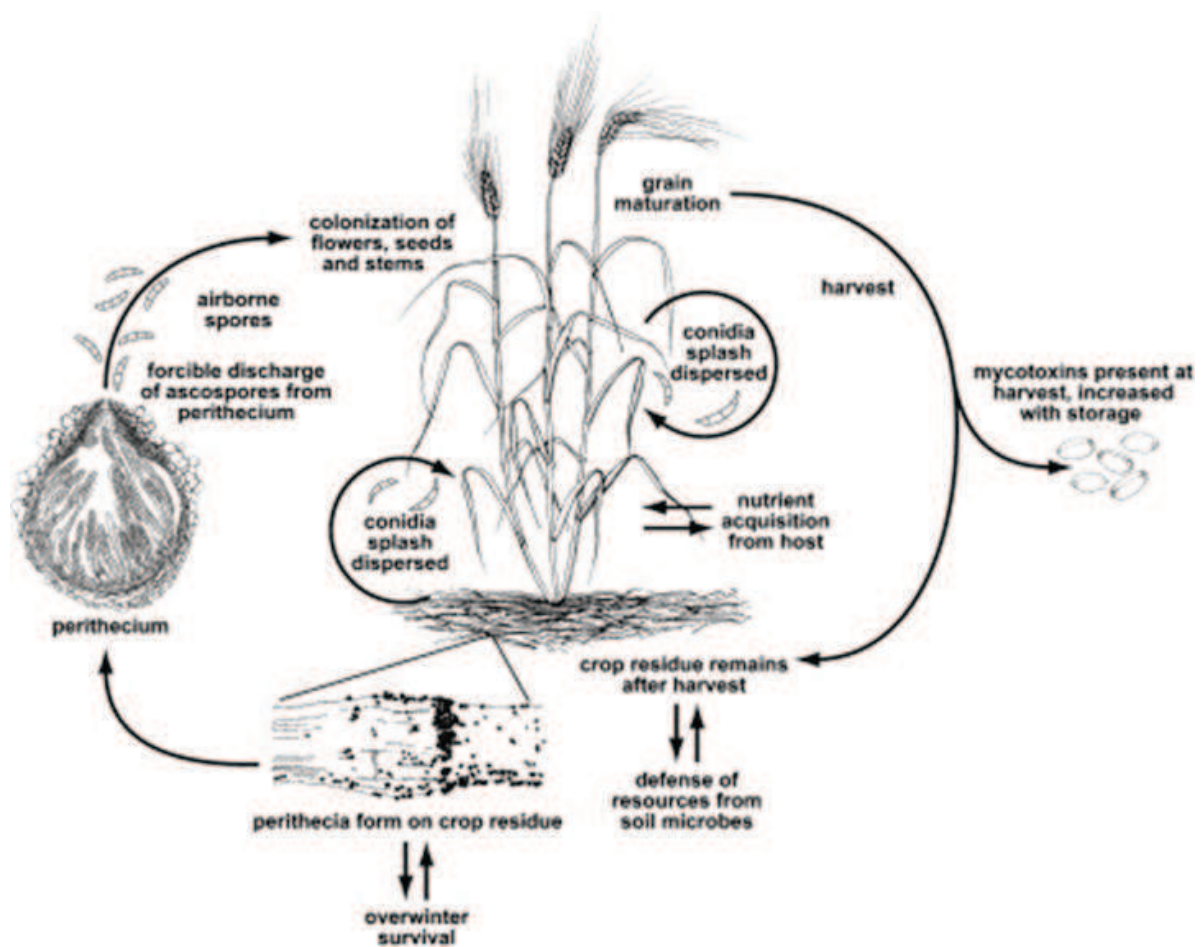


Figure 3 : Cycle de vie de *Fusarium graminearum* (Trail, 2009).

F. graminearum dans les blés français récoltés entre 2007 et 2010. Etant donnée l'occurrence de *F. graminearum* en Europe mais également dans le monde, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à cette espèce fongique pour nos études.

III- *Fusarium graminearum* : cycle infectieux

F. graminearum est un ascomycète appartenant à la classe des *Sordariomycetes*, à l'ordre des *Hypocreales* et à la famille des *Nectriaceae* (Goswami and Kistler, 2004). *F. graminearum* peut se retrouver sous deux formes en fonction de son mode de reproduction. La forme dite « téléomorphe » *Gibberella zeae* est caractéristique de la reproduction sexuée. Cette forme se distingue par la capacité à former des périthèces (i.e. organes de la reproduction sexuée contenant les asques) et à produire des ascospores. La forme « anamorphe » *Fusarium graminearum* est caractéristique de la reproduction asexuée. Cette forme se distingue par la production de macroconidies et de chlamydospores (i.e. spores de multiplication végétative avec une épaisse paroi, plus rares) (Leslie and Summerell, 2005). Nous parlerons ici de *F. graminearum*. Ce champignon est homothallique, c'est-à-dire que cette espèce peut produire des spores issues de la reproduction sexuée sans partenaire à partir d'une culture venant d'une seule spore. Ce caractère est lié au fait que tous les allèles *MAT*, correspondant aux deux types sexuels (mating type MAT) sont présents dans le génome au même locus (Leslie and Summerell, 2005).

L'inoculum primaire pour l'initiation de la maladie provient principalement de débris de plantes infectées. Il peut également provenir d'adventices ou de semences infectées (Champeil et al., 2004, Parry et al., 1995). Le champignon en conditions défavorables se comporte en organisme saprophyte sur des résidus de cultures et survit sous forme de mycélium ou de chlamydospores (Figure 3) (Sutton, 1982). Au printemps, lorsque les

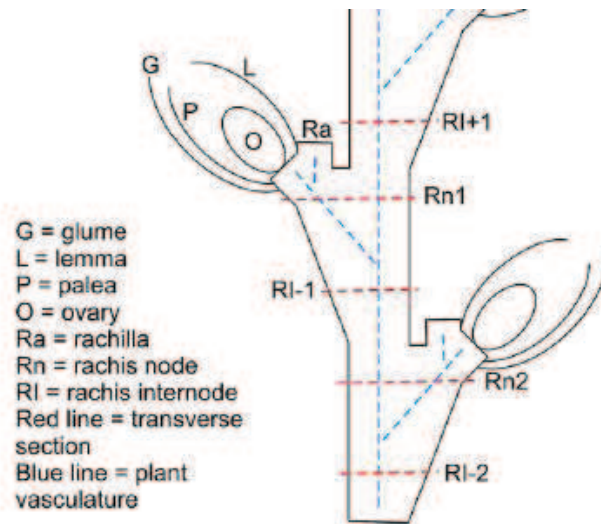


Figure 4 : Représentation schématique de l'anatomie d'un épi de blé (Brown et al, 2010).

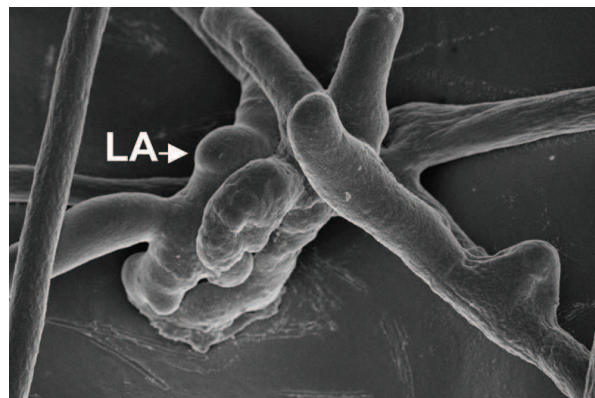


Figure 5 : Observation microscopique d'une structure apparentée à un appressorium (LA : lobate appressorium) (Boenisch and Schaefer, 2011).

conditions deviennent favorables, le champignon se développe et permet la formation de macroconidies mais également de périthèces et d'ascospores (Figure 3) (Markell and Franc, 2003, Trail, 2009). Les ascospores sont éjectés des périthèces puis dispersés par le vent, la pluie ou les insectes jusqu'aux plantes hôtes et peuvent atteindre les épis en floraison. Chez le blé, le dépôt des spores sur les épis en fleur initie le processus d'infection (Parry et al., 1995, Sutton, 1982, Trail et al., 2002). Ces spores germent dans la partie médiane de l'épi, là où l'humidité est la plus importante (Champeil et al., 2004, Walter et al., 2009). Dans un premier temps, le champignon se développe à l'extérieur des glumes, sans colonisation vasculaire ou pénètre les enveloppes *via* les stomates (Brown et al., 2010, Champeil et al., 2004). Les hyphes intercellulaires deviennent ensuite abondants puis se développent le long de l'épicarpe entre le lemme et la paléole (Figure 4). Les cellules perdent ensuite leur contenu avant la colonisation intracellulaire, à travers le péricarpe, *via* des structures spécifiques appelées « hyphes courts d'infection », et aussi des « structures d'infection » telles que des structures apparentées à des appressoria (Figure 5) (Boenisch and Schafer, 2011). Les hyphes atteignent ensuite l'endosperme puis le rachis et se propagent dans la tige pour toucher les épillets adjacents (Brown et al., 2010, Jansen et al., 2005).

IV- Pratiques agricoles pour limiter l'apparition de la maladie

Plusieurs facteurs peuvent moduler l'apparition et le développement de la maladie notamment au champ. Ces facteurs ont été hiérarchisés par Arvalis – Institut du végétal et sont regroupés dans la Figure 6.

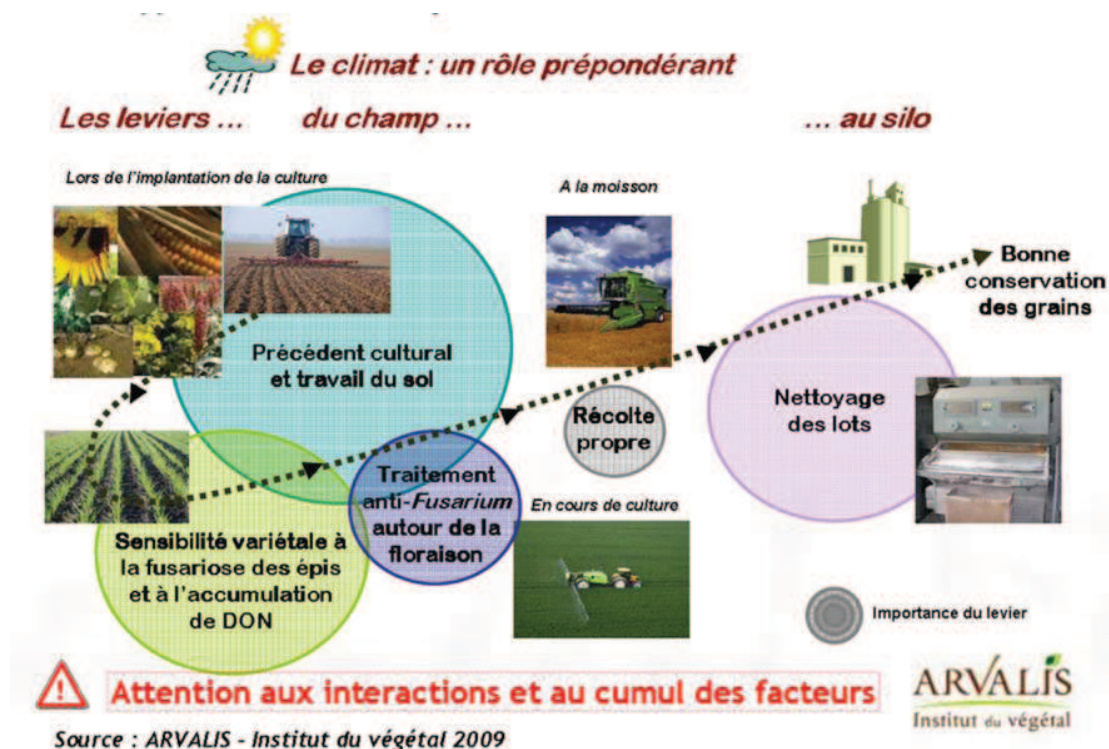


Figure 6 : Schéma représentant les différents facteurs à maîtriser pour limiter l'apparition de la fusariose de l'épi et ses conséquences (source Arvalis – Institut du végétal).

Le climat a une incidence majeure sur le développement de la maladie. Au moment de la floraison, le climat conditionne le développement de l'inoculum (Champeil et al., 2004). Des températures élevées (25°C) et un temps orageux favorisent ainsi le développement de *Fusarium* (Parry et al., 1995). Ce facteur étant incontrôlable, Arvalis place le précédent cultural et le travail du sol comme leviers majeurs pour lutter contre le développement de la maladie. La rotation des cultures permet de limiter la présence de céréales sensibles à l'infection et la survie du champignon (McMullen et al., 1997). Ainsi, la culture du soja avant une culture de blé diminue la fréquence et la sévérité de la maladie. De même, le maïs comme précédent cultural augmente la sévérité de la maladie par rapport à du blé ou de l'orge. Ceci s'expliquerait par le fait que des cultures de soja laissent moins de résidus que des cultures de blé qui elles-mêmes laissent moins de résidus que des cultures de maïs. De plus, les espèces de *Fusarium* affectant le soja ne sont pas les mêmes que celles infectant le blé et le maïs (Dill-Macky and Jones, 2000). Un travail du sol adapté permet de dégrader les résidus de cultures et de limiter la présence de sources d'inoculum responsable de la maladie (Parry et al., 1995, Sutton, 1982).

Un autre facteur primordial est la sensibilité variétale à l'infection. Certaines variétés de céréales apparaissent comme étant plus ou moins sensibles à la fusariose. Cette résistance fait l'objet de recherches portant sur l'identification de QTLs (i.e. Quantitative Trait Locus) associés à des variétés résistantes à la fusariose. Des QTLs ont ainsi été identifiés chez le blé (Buerstmayr et al., 2003). Cette résistance pourrait également être reliée au contenu en composés phénoliques des grains, aussi bien pour le blé que pour le maïs (Atanasova-Penichon et al., 2012, Siranidou et al., 2002).

Enfin, l'utilisation de fongicides apparaît comme un remède aux effets limités. En effet, leur application présente des effets variables qui dépendent de la molécule active mais également

de la date d'application et des espèces fongiques présentes sur l'épi. Il existe une sensibilité différente des espèces incriminées à la fusariose en fonction des molécules actives utilisées. Par exemple, *F. graminearum* est particulièrement sensible aux triazoles alors que *M. nivale* l'est beaucoup moins (Champeil et al., 2004, Parry et al., 1995). Une bonne activité d'une molécule contre une espèce peut ainsi masquer la croissance ultérieure d'une autre espèce.

Durant l'infection et le développement sur l'hôte, *F. graminearum* peut produire des métabolites secondaires toxiques, des mycotoxines. Parmi elles, le déoxynivalénol et le nivalénol sont produits très tôt au cours de l'invasion de l'organisme hôte et sont considérés comme des facteurs de virulence (Jansen et al., 2005, Maier et al., 2006, Proctor et al., 1995). Nous nous intéressons pour cette étude plus particulièrement à ces mycotoxines, à leurs voies de biosynthèse, et aux mécanismes qui régulent ces voies.

V- Les mycotoxines produites par le champignon *Fusarium graminearum*

Les champignons du genre *Fusarium* produisent une large gamme de mycotoxines. Les plus connues sont la famille des trichothécènes, divisée en 4 groupes A, B, C et D. Le groupe des trichothécènes A est produit principalement par *F. sporotrichoides* et *F. langsethiae*. Le groupe des trichothécènes B est produit principalement par *F. graminearum* et *F. culmorum*. Les trichothécènes de type C et D sont produits par des champignons n'appartenant pas au genre *Fusarium* (Bennett and Klich, 2003, Sweeney and Dobson, 1999).

V-1- Structure chimique des trichothécènes

Les trichothécènes sont des métabolites secondaires toxiques produits par plusieurs genres de champignons, incluant *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, et *Fusarium*.

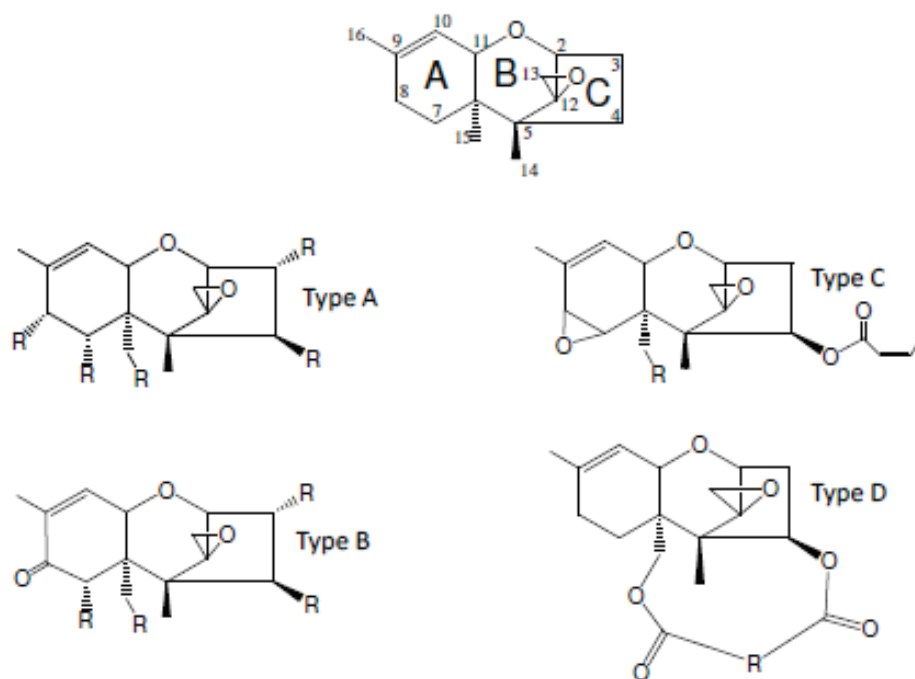
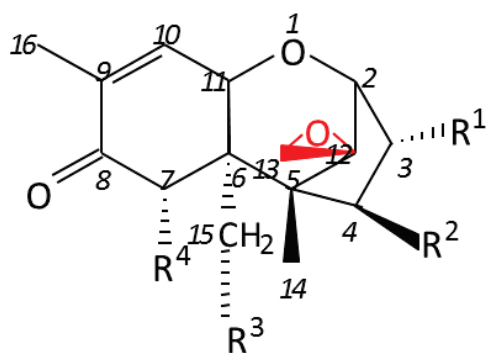


Figure 7 : Classification des différentes familles de trichothécènes (McCormick et al, 2011).



TCTB	R1	R2	R3	R4
DON	OH	H	OH	OH
15ADON	OH	H	Oac	OH
3ADON	Oac	H	OH	OH
NIV	OH	OH	OH	OH
FX	OH	Oac	OH	OH

Figure 8 : Structure chimique des trichothécènes de type B.

(McCormick et al., 2011). Les trichothécènes sont divisés en 4 groupes (Figure 7) mais présentent tous le même squelette. Ce sont des sesquiterpènes tricycliques caractérisés par la présence d'un pont époxyde entre les carbones 12 et 13, pont qui leur confère leur toxicité (Bennett and Klich, 2003).

Les groupes A, B, et C sont dits non macrocycliques (Balzer et al., 2004, Betina, 1989). Les trichothécènes A ont un groupe hydroxyle, une fonction ester ou pas de substitution en C8. La toxine T-2 est un représentant majeur des trichothécènes A. Les trichothécènes B ont une fonction cétone en C8. Les trichothécènes C présentent un pont époxyde supplémentaire entre les carbones C7 et C8. La famille des trichothécènes de type D est dite macrocyclique car ces molécules possèdent un macrocycle entre les carbones C4 et C15 (Figure 7). Nous nous intéressons ici uniquement aux trichothécènes de type B.

Les trichothécènes de type B ou TCTB sont caractérisés en plus de leur fonction époxyde par la présence d'une fonction cétone en position C8. Les molécules constituant les TCTB sont le déoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées en position C3 (3ADON) ou en position C15 (15ADON), le nivalénol (NIV) et sa forme acétylée en position C4, la fusarénone X (FX) (Balzer et al., 2004, Bennett and Klich, 2003, Sweeney and Dobson, 1999) (Figure 8). Une souche de *Fusarium* ne peut produire qu'un seul type de TCTB avec un seul type de dérivé acétylé. On parle de chémotype. Certaines souches présentent donc un chémotype DON/15ADON, ou DON/3ADON et d'autres un chémotype NIV/FX (Anderson et al., 1989).

V-2- Toxicité et réglementation

Les trichothécènes sont produits et s'accumulent au cours du développement des grains avant la récolte et ne peuvent pas être éliminés par les processus de transformation classiques des aliments. Ces molécules sont stables d'un point de vue chimique et thermique. Elles se retrouvent dans les produits bruts comme les grains mais peuvent aussi se retrouver dans les

produits transformés comme la farine, la semoule, les pâtes ou les céréales pour petit-déjeuner (Champeil et al., 2004). Les TCTB sont de petites molécules qui peuvent passivement passer à travers la membrane cellulaire. Leur toxicité envers les mammifères est bien documentée (Bennett and Klich, 2003, Eriksen et al., 2004). Depuis le début du 19^{ème} siècle, les trichothécènes ont été reconnus responsables d'intoxications alimentaires humaines en Russie, en Chine, en Inde ou encore au Japon (Eriksen, 2003). L'exposition à ces molécules entraîne comme symptômes de toxicité aiguë des nausées, des vomissements, des pertes de poids, une dérégulation du système immunitaire ainsi qu'un effet tératogène (Pestka, 2010, Rocha et al., 2005). Plusieurs cas d'intoxication du porc par le DON suite à la consommation de céréales contaminées ont été rapportés avec des symptômes comparables à ceux observés chez l'homme. Le DON est souvent utilisé pour les études de toxicité aiguë du fait de sa forte occurrence dans les céréales (AFSSA, 2009). Le porc est plus sensible que le rat, les volailles ou encore que les ruminants. Chez le porc, le DON entraîne une diminution de la consommation alimentaire. Seules des doses élevées provoquent des vomissements. Le DON peut se retrouver dans les tissus 20 minutes après ingestion de la toxine, principalement dans le foie et les reins. Les quantités retrouvées dans le muscle sont bien plus faibles. Chez les volailles, le DON est également retrouvé après ingestion principalement dans le foie, les reins et la rate. Chez les ruminants, le DON peut entraîner une baisse significative de la production de lait due à une diminution de la quantité d'aliments ingérés. Cependant, le transfert du DON ingéré dans le lait n'est pas significatif (AFSSA, 2009). Les données concernant la toxicité aiguë des trichothécènes sont bien documentées mais les effets liés à une toxicité chronique sont peu renseignés.

Au niveau moléculaire, les trichothécènes et en particulier le DON ont des conséquences variables liées à un effet dose. Ainsi pour des doses dites faibles à modérées, les trichothécènes inhibent partiellement la synthèse protéique (*via* le pont époxyde responsable de la toxicité des molécules) en interférant avec la fonction de peptidyl transférase de la sous-unité 60S du ribosome. Cette inhibition affecte l'initiation et l'élongation de la synthèse protéique (Pestka, 2010, Rocha et al., 2005). A ces concentrations, le DON induit également la transcription de gènes liés à l'immunité et l'inflammation (Pestka, 2010). Les trichothécènes affectent également la synthèse de l'ADN et de l'ARN. A des concentrations élevées capables d'inhiber totalement la synthèse protéique, les trichothécènes peuvent activer les voies des MAP kinases et peuvent entraîner la mort cellulaire (Pestka, 2010, Rocha et al., 2005).

En termes de niveaux de toxicité, il existe des différences entre les TCTB. Ces différences sont cependant à prendre en compte avec parcimonie étant donné que toutes les études n'ont pas été réalisées sur les mêmes lignées cellulaires. L'acétylation du DON semble diminuer sa toxicité sur des cellules BHK (Kimura et al., 1998). Dans une étude réalisée sur des fibroblastes 3T3 de souris, il semble que le DON et le NIV aient des niveaux de toxicité similaires. Le 3-ADON semble moins toxique que le DON et le 15-ADON ; la FX semble plus toxique que le NIV (Eriksen et al., 2004). Une étude sur des lignées cellulaires intestinales Caco-2 a été réalisée plus récemment. Ce travail montre que le DON et le 15-ADON ont une toxicité équivalente, et que le 3-ADON est moins toxique que le 15-ADON. Le NIV est plus toxique et sa forme acétylée, la FX, l'est encore plus (Alassane-Kpembi et al., 2013). En cas de co-exposition à plusieurs mycotoxines, des effets synergiques, antagonistes ou additifs sont supposés mais cet aspect est encore peu documenté. Pour les

Denrées	Mycotoxines	Valeur seuil en µg/kg
Céréales brutes autres que le blé dur, l'avoine et le maïs	DON	1250
Blé dur et avoine brute	DON	1750
Maïs brut	DON	1750
Farine de céréales et pâtes	DON	750
Pain, pâtisseries et biscuits	DON	500
Préparations à base de céréales pour nourrissons	DON	200

Tableau 1 : Concentrations maximales autorisées en DON dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, d'après le règlement (CE) n°1126/2007.

trichothécènes, il semblerait que l'effet sur plusieurs lignées cellulaires intestinales (Caco-2 et IPEC-J2) soit additif (Alassane-Kpembé et al., 2013, Wan et al., 2013).

Les trichothécènes sont également phytotoxiques. Ils causent notamment des nécroses et des retards de croissance ainsi qu'une perturbation de la germination des graines (Rocha et al., 2005). Le DON est considéré comme un facteur de virulence permettant l'extension de la maladie d'un épillet à l'autre durant l'infection de la plante, même si la production de DON n'est pas nécessaire à l'apparition des symptômes (Desjardins and Hohn, 1997, Proctor et al., 1995). Des différences de sensibilité existent chez les variétés de blé : certains supportent des concentrations plus élevées en trichothécènes par rapport à des variétés sensibles (Eudes et al., 2000, Wang and Miller, 1988). Chez le blé, la glycosylation du DON permet également de rendre ce composé moins toxique (Berthiller et al., 2007). Il a aussi été suggéré que les TCTB pourraient également jouer un rôle majeur dans la compétition avec d'autres microorganismes (Xu and Nicholson, 2009). Ce rôle éventuel reste cependant à démontrer.

De nos jours, dans les pays développés, les pratiques culturales, les bonnes conditions de stockage et les contrôles effectués par les filières céréalières limitent la présence de lots fortement contaminés dans le circuit de commercialisation des céréales et donc les risques majeurs d'intoxication. Aujourd'hui, le plus redouté concerne l'ingestion régulière de faibles quantités de mycotoxines. La consommation quotidienne de céréales et de produits dérivés faiblement contaminés en mycotoxines entraîne un risque de toxicité chronique pour le consommateur, risque non maîtrisé à l'heure actuelle. Pour pallier ce risque, l'Union Européenne a établi une réglementation rigoureuse à partir des doses journalières tolérables définies pour les mycotoxines les plus fréquemment retrouvées. En effet, le règlement (CE) n° 1126/2007 détermine les concentrations maximales en DON autorisées dans les denrées destinées à l'alimentation humaine (Tableau 1).

Gène	Fonction
<i>Tri8</i>	trichothécène-3- <i>O</i> -esterase
<i>Tri7</i>	trichothécène-4- <i>O</i> -acetyltransférase
<i>Tri3</i>	trichothécène-15- <i>O</i> -acetyltransférase
<i>Tri4</i>	trichodiène oxygénase
<i>Tri6</i>	facteur de transcription
<i>Tri5</i>	trichodiène synthase
<i>Tri10</i>	gène de régulation
<i>Tri9</i>	inconnue
<i>Tri11</i>	isotrichodermine 15-oxygénase
<i>Tri12</i>	transporteur membranaire des trichothécènes
<i>Tri13</i>	calonectrine 4-oxygénase
<i>Tri14</i>	facteur de virulence
<i>Tri1</i>	C-8 ou C-7,8 oxygénase
<i>Tri16</i>	C-8 acétyltransférase
<i>Tri101</i>	C-3 acétyltransférase

Tableau 2 : Fonction des gènes *Tri* (d'après Alexander et al, 2009).

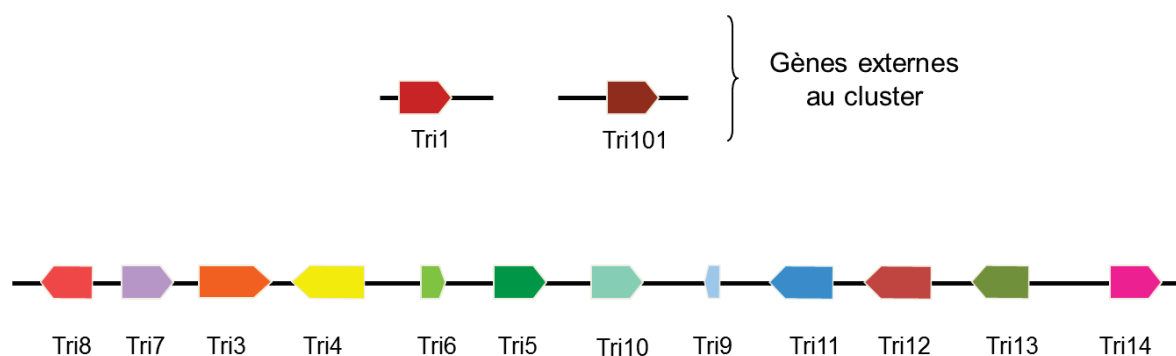


Figure 9 : Représentation schématique du « cluster *Tri 5* », et des trois loci regroupant les gènes *Tri* chez *F. graminearum*. Les gènes *Tri 6*, *Tri 10* jouent un rôle de régulation. Les gènes *Tri 7* et *Tri 13* ne sont fonctionnels que chez les souches de chémotype NIV/FX (d'après Alexander et al, 2009).

Les enquêtes en France menées par Arvalis-Institut du Végétal et France Agrimer suivent les pourcentages de récoltes céréalières contaminées par le DON. Certaines années, ces pourcentages sont plus conséquents et en particulier pour le blé dur. En 2007, 2008 et 2013, plus de 10% des récoltes de blé dur en France dépassaient la norme européenne de 1750 µg/kg de DON. Même si plusieurs leviers ont été identifiés, le « risque mycotoxines » est difficilement maîtrisable au champ. Il est difficile de prédire le taux de contamination des céréales. Des modèles de prédiction basés sur les conditions météorologiques, la sensibilité des variétés cultivées mais également le précédent cultural ont été mis au point. Un de ces modèles, le DONcast®, permet d'évaluer la nécessité d'un traitement fongicide et aide à la décision quant à la date de récolte pour anticiper le risque DON (Schaafsma and Hooker, 2006). Le modèle Myco-LIS®, mis au point par Arvalis-Institut du Végétal, ou le modèle « La Clé des Champs » mis au point par Syngenta-France permettent aux agriculteurs et aux organismes stockeurs de mieux maîtriser la qualité sanitaire du blé et d'évaluer le risque de contamination en DON en combinant les facteurs climatiques, les pratiques culturales (le précédent cultural, le travail du sol, les traitements phytosanitaires) et la variété implantée.

Cependant, malgré la définition de pratiques agronomiques permettant de limiter la contamination en mycotoxines, il est toujours impossible en 2013 de garantir une teneur inférieure au seuil réglementaire. Pour lutter au mieux contre ces mycotoxines, il est très important de mieux comprendre les événements qui conduisent à la contamination des grains, d'approfondir la compréhension de la régulation de la voie de biosynthèse des trichothécènes et la connaissance des facteurs susceptibles de la moduler.

Dans le cadre vert, sont représentés les trichothécènes de type B (McCormick et al, 2011).

V-3- Biosynthèse et régulation des trichothécènes de type B

Différentes études ont été entreprises et ont mené à la détermination des différentes étapes de la voie de biosynthèse des trichothécènes de type A et de type B, à partir de la cyclisation du farnésyl pyrophosphate, issu du métabolisme des isoprénoïdes (Alexander et al., 2009, Kimura et al., 2007, McCormick et al., 2011). Les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse sont appelés gènes *Tri* (Tableau 2). Ils sont répartis sur 3 loci chez *F. graminearum* et la majorité est regroupée dans un cluster appelé « cluster *Tri5* » localisé sur le chromosome 2 (Figure 9). Pour la biosynthèse des trichothécènes de type B, après la cyclisation du farnésyl pyrophosphate en trichodiène catabolisée par la trichodiène synthase, neuf réactions conduisent à la formation de la calonectrine (Figure 10) (McCormick et al., 2011). Par la suite, on distingue la production de NIV et de sa forme acétylée (FX) de la production de DON et de ses formes acétylées (15-ADON et 3-ADON). Ces deux chémotypes sont en effet déterminés génétiquement. Les produits des gènes *Tri7* et *Tri13* catalysent une oxygénation et une acétylation en C4 pour la synthèse vers le chémotype NIV, puis le produit du gène *Tri1* génère la FX, et enfin le produit du gène *Tri8* permet la formation de NIV (Lee et al., 2002, McCormick et al., 2011). Chez les souches de chémotype DON/ADON les gènes *Tri7* et *Tri13* ne sont pas fonctionnels. Les produits des gènes *Tri1* et *Tri8* catalysent directement la formation du 15-ADON ou du 3-ADON à partir de la calonectrine suivie par la formation du DON (McCormick et al., 2011). Une activité différentielle de l'estérase codée par *Tri8*, en fonction de la séquence nucléique, détermine la production du 15-ADON ou du 3-ADON (Alexander et al., 2011).

La voie de biosynthèse des trichothécènes possède des régulateurs spécifiques. Ainsi, *Tri6* régule positivement l'expression des autres gènes *Tri* (Seong et al., 2009). *Tri10* qui a été montré comme jouant un rôle majeur dans la régulation de *Tri6* chez *F. sporotrichioides*, joue

en fait un rôle mineur dans la régulation positive de *Tri6* chez *F. graminearum* (Seong et al., 2009). *Tri6* régule négativement l'expression de *Tri10* (Seong et al., 2009). *Tri14* code également pour un régulateur spécifique des gènes *Tri*. Sa délétion empêche la production de toxines sur blé (Alexander et al., 2009). Nous pouvons ajouter que chez *F. sporotrichioides*, un régulateur négatif de la voie de biosynthèse, *Tri15*, a été identifié. Toutefois sa disruption n'affecte pas la production de toxines chez *F. graminearum*, et il ne peut donc pas être apparenté à la voie de biosynthèse dans ce cas (Alexander et al., 2004).

En plus de ces régulateurs spécifiques, plusieurs études ont mis en évidence l'interconnexion entre la voie des TCTB et les voies du métabolisme primaire. Ainsi, il existe chez *F. graminearum* des facteurs de transcription intervenant dans des fonctions métaboliques en réponse à différents stimuli extracellulaires qui exercent un contrôle sur la voie de biosynthèse des trichothécènes (Merhej et al., 2011b). Une acidification du pH extracellulaire entraîne une production de TCTB résultant d'une activation de l'expression des gènes *Tri* (Gardiner et al., 2009b, Merhej et al., 2010). Le facteur Pac1 intervient dans cette régulation dépendante du pH en réprimant l'expression de la voie de biosynthèse à pH neutre ou basique (Merhej et al., 2011a). La réponse à la lumière est également importante puisqu'elle influence la production de métabolites secondaires chez les champignons, *via* le facteur Velvet. Chez *F. graminearum*, la disruption de ce facteur affecte la croissance, la production d'aurofusarine et bloque totalement la production des TCTB (Merhej et al., 2012). Les sources de nutriments influent fortement sur le développement du champignon. Les sources de carbone ou d'azote influencent les niveaux de TCTB produits chez *F. graminearum*. Le saccharose est notamment stimulateur de la production de toxines par rapport au glucose (Jiao et al., 2008). De même, l'agmatine ou la putrescine vont stimuler la production de TCTB (Gardiner et al., 2009a). Ces deux amines appartiennent à la voie de biosynthèse arginine-polyamine chez les plantes comme le blé. Cette voie est activée notamment lors de la fusariose de l'épi, ce qui

entraîne une production de TCTB (Gardiner et al., 2010). Les TCTB apparaissent alors comme un élément du dialogue plante/pathogène.

VI- Le dialogue plante/pathogène et le rôle des TCTB

Dès les premières minutes de l'interaction entre *Fusarium* et la plante, un dialogue moléculaire se met en place et engendre un changement massif dans l'expression des gènes. Chez le champignon *Fusarium*, des gènes liés à la virulence et à la pathogénicité ont été mis en évidence lors d'études sur l'interaction *F. graminearum*/hôte. Certains gènes *Tri* ou des gènes codant pour des lipases sont directement impliqués (Dyer et al., 2005, Nguyen et al., 2011, Proctor et al., 1995). La production de DON serait un facteur de virulence clé lors de l'infection du blé par *F. graminearum* (Jansen et al., 2005, Proctor et al., 1995). La production de trichothécènes joue un rôle dans la progression du champignon d'un épillet à l'autre. La toxine inhiberait la production de callose au niveau du rachis qui constituerait une barrière physique pour limiter la progression du champignon (Jansen et al., 2005). Ceci permettrait donc au champignon de progresser plus rapidement chez l'hôte. De plus, la production de trichothécènes semble être tissu-spécifique au moment de l'infection et fortement induite au niveau du rachis (Ilgen et al., 2009).

VI-1- Côté plante

Face aux attaques pathogènes, les plantes ont développé des systèmes de défense pouvant être des composés toxiques ou des barrières physiques. Une des réactions de défense les plus rapides chez la plante face à l'infection par le pathogène est le « burst oxydatif » qui consiste en une production massive d'espèces oxydantes ou ROS.

Ce « burst » est impliqué dans l'activation de différentes voies de signalisation, les modifications de structure de la paroi cellulaire, l'accumulation de protéines de défense mais également la réponse hypersensible de la plante qui permet l'élimination des cellules infectées (Nanda et al., 2010, Shetty et al., 2008, Wojtaszek, 1997). Ces mécanismes de défense représentent une manière de limiter l'établissement de l'infection et le développement du pathogène, mais également une façon d'activer d'autres réactions de défense chez la plante (Wojtaszek, 1997). Suite à ces événements précoces de « burst oxydatif » se met en place une signalisation intercellulaire au niveau de la plante agressée (Kachroo et al., 2003). Les phytohormones sont bien connues pour intervenir dans la mise en place des réactions de défense (Davies, 2004). Cette signalisation fait intervenir l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (ET). Chaque hormone fait intervenir des voies différentes. Le JA vient de la formation des oxylipines issues de l'oxydation des acides gras insaturés de la membrane cellulaire. Cette production passe par la voie des lipoxygenases (Blee, 2002, Blee et al., 2004). Le JA induit la synthèse de métabolites secondaires tels que les terpénoïdes qui vont être toxiques ou former une barrière structurale pour limiter la progression du champignon (Turner et al., 2002). Le SA permet la synthèse de protéines associées à la pathogénicité ou protéines PR, et joue un rôle dans l'induction de la réponse hypersensible (HR) de la plante. Cette HR induit une mort cellulaire au niveau du site initial de l'infection, qui va limiter la propagation de l'infection (Smith et al., 2009). Le ET intervient également dans l'induction des réponses de défense de la plante face aux stress biotiques. Il permet

probablement une réduction du développement de la maladie, notamment de la FHB chez le blé (Li and Yen, 2008). Ainsi, ces trois hormones, en lien avec la production de ROS, jouent un rôle important dans l'induction des défenses de la plante face à l'attaque par le pathogène. Une rapide production de ROS dans les tissus a ainsi été décrite chez plusieurs plantes infectées par divers pathogènes et notamment par des champignons filamenteux (Kachroo et al., 2003, Yang et al., 2011, Zhou et al., 2005). Chez le riz, le « burst oxydatif » permet l'activation de gènes de défense et augmente la résistance à *Magnaporthe oryzae* (Kachroo et al., 2003). Le pathogène *Botrytis cinerea* déclenche un stress oxydant chez *Arabidopsis*. Le champignon est capable d'exploiter les mécanismes de défense de la plante pour sa propre pathogénicité (Govrin and Levine, 2000). Le pathogène *F. graminearum* déclenche ce phénomène de « burst oxydatif ». Durant l'infection de grains d'orge, une accumulation d'enzymes du métabolisme primaire et d' H_2O_2 chez la plante est déclenchée. Ce phénomène suggère un lien entre le métabolisme primaire et la réaction de défense à l'infection (Yang et al., 2011). Durant l'infection du blé, un « burst oxydatif » d' H_2O_2 dans les tissus de l'épi est suggéré. Cette production induite par le pathogène peut freiner sa pénétration, le stresser et peut agir comme un signal auprès de la plante pour déclencher une résistance systémique (Zhou et al., 2005). Un autre mécanisme de défense de la plante face à l'infection est la modification de la paroi cellulaire. En réponse à l'infection, des acides phénoliques seraient synthétisés rapidement et polymérisés dans la paroi cellulaire pour la renforcer (Siranidou et al., 2002). Lors de l'infection, la paroi est dégradée par le pathogène et les lysats ainsi libérés peuvent jouer le rôle d'éliciteurs des mécanismes de défense de la plante (Bily et al., 2003).

VI-2- Côté champignon

Des études *in vitro* ont été réalisées pour analyser l'effet du stress oxydant sur le champignon *F. graminearum*. Ainsi, l'ajout de molécules pro-oxydantes telles que l' H_2O_2 dans le milieu de culture augmente significativement la production de TCTB par le champignon (Ponts et al., 2006). Cette réponse est chémotype-dépendante puisque seule la production de DON semble être activée en présence d' H_2O_2 (Ponts et al., 2009). Ces résultats sont en corrélation avec le niveau d'expression des gènes *Tri*. En présence de stress oxydant, ces gènes sont surexprimés (Ponts et al., 2007). D'autres études *in vitro* ont également analysé l'effet de composés antioxydants tels que les acides phénoliques sur le champignon *Fusarium*. L'acide férulique, présent abondamment dans le son de blé, inhibe fortement la production de toxines mais également l'expression des gènes *Tri* chez le champignon *F. culmorum* (Boutigny et al., 2009). Des extraits naturels de son de blé contenant une mixture de composés phénoliques présentent un très fort effet inhibiteur de la toxinogénèse de ce champignon (Boutigny et al., 2010). Ces résultats montrent que l'équilibre redox interfère probablement avec le métabolisme secondaire du champignon. Ainsi, le champignon *Fusarium* semble capable, en fonction de son environnement redox, d'adapter sa production de trichothécènes.

Ce lien entre réponse au stress oxydant et métabolisme secondaire a été étudié chez plusieurs champignons filamenteux et est détaillé dans la revue bibliographique ci-après. Cet article met en évidence comment la production de toxines et plus généralement le métabolisme secondaire sont intégrés dans la réponse au stress oxydant.

VII- Connexion entre la réponse transcriptionnelle au stress oxydant et le métabolisme secondaire chez les champignons filamenteux

Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi

M. Montibus^{1,*}, L. Pinson-Gadais¹, F. Richard-Forget¹, C. Barreau¹, and N. Ponts¹.

¹INRA, UR1264 MycSA, 71, Avenue Edouard Bourlaux, CS20032, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex,

Publiée Online dans “Critical Reviews in Microbiology”

DOI 10.3109/1040841X.2013.829416

Keywords: oxidant, antioxidant, gene expression, transcription factor, mycotoxins,

Abstract

To survive sudden and potentially lethal changes in their environment, filamentous fungi must sense and respond to a vast array of stresses, including oxidative stresses. The generation of reactive oxygen species, or ROS, is an inevitable aspect of existence under aerobic conditions. In addition, in the case of fungi with pathogenic lifestyles, ROS are produced by the infected hosts and serve as defense weapons *via* direct toxicity, as well as effectors in fungal cell death mechanisms. Filamentous fungi have thus developed complex and sophisticated responses to evade oxidative killing. Several steps are determinant in these responses, including the activation of transcriptional regulators involved in the control of the antioxidant machinery. Gathering and integrating the most recent advances in knowledge of oxidative stress responses in fungi are the main objectives of this review. Most of the knowledge coming from two models, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and fungi of the genus *Aspergillus*, is summarized. Nonetheless, recent information on various other fungi is delivered when available. Finally, special attention is given on the potential link between the functional interaction between oxidative stress and secondary metabolism that has been suggested in recent reports, including the production of mycotoxins.

This is the pre-peer reviewed version of the following article “Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi” which has been published in final form at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/1040841X.2013.829416>

I- Introduction

Toxic radicals leading to reactive oxygen species, or ROS, are mandatory by-products of many metabolic pathways related to an aerobic lifestyle (Davies et al., 1995, Hampton et al., 1998, Lambeth, 2004). ROS comprise both free radical oxygen intermediates, such as peroxide anions (O^{2-}) and hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$), and non-free ones including hydrogen peroxide (H_2O_2) and hypochlorous acid ($HOCl$) (Halliwell, 2001). These ROS can react instantaneously and nonspecifically with essential biological molecules, and lead to an alteration of cellular functions by inducing damages such as mutations in DNA, oxidation of proteins, or peroxidation of lipids. These damages are generally deleterious; ROS have shown to be involved in apoptosis and their role in aging has been widely reviewed (Beckman and Ames, 1998, Halliwell, 2001, Klotz, 2002). As a consequence, maintenance detoxification of ROS is paramount to the survival of all aerobic life forms. A number of biological defense mechanisms have evolved to scavenge ROS, combining the action of antioxidant enzymes such as catalase and superoxide dismutase with non-enzymatic small antioxidant molecules among which glutathione plays a central role (Harris, 1992). The balance between production and scavenging of ROS is under the influence of numerous biotic and abiotic factors. Disturbances leading to a sudden increase in intracellular levels of ROS would cause oxidative stress and trigger antioxidant defense mechanisms. Indeed, ROS can also act as signaling molecules in cascades leading to gene expression modulations and subsequent adaptation. An increasing body of work emphasizes that ROS play multiple roles in filamentous fungi physiology. For example, tightly controlled concentrations of ROS and fluctuations in redox potential are important mediators of fungal cell signaling processes, including differentiation and development (Heller and Tudzynski, 2011). Moreover, there is growing suspicion that oxidative stress and secondary metabolism could be linked (Hong et al., 2013a). Yet, little information is currently available on how oxidants and antioxidants

are temporally and spatially balanced to provide the specificity required for such regulations.

Besides their implication in intracellular signaling, ROS also play a central role in the molecular cross talk that occurs during the interaction between different organisms, leading to recognition and eventually the activation of defense reactions. Documentation is particularly abundant in the context of plant defense response to pathogen aggressions. Among the broad range of plant defense responses, the generation of ROS is one of the earliest events (Nanda et al., 2010, Shetty et al., 2008). This rapid and transient production of important amounts of ROS, so-called oxidative burst, can restrict pathogen growth and limit the establishment of infection, and is a signal to activate further plant defense reactions (Nanda et al., 2010, Shetty et al., 2008). Among others, for example, the oxidative burst is known to trigger the hypersensitive cell death or hypersensitive response (Govrin and Levine, 2000, Wojtaszek, 1997). The actual occurrence of such an oxidative burst in plants challenged with pathogenic filamentous fungi has been demonstrated (Kachroo et al., 2003, Yang et al., 2011, Zhou et al., 2005). In some instances, the occurrence of an oxidative burst can be beneficial to some fungal pathogens and their ability to invade plant tissue. For example, in the pathosystem *Botrytis cinerea/Arabidopsis*, Govrin and Levine (2000) demonstrated that the necrotrophic fungus can exploit the oxidative burst triggered upon invasion for its own pathogenicity. Similarly, it has been reported that peroxide stress stimulates the production of the mycotoxin deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*, a toxin with a demonstrated role in pathogenesis on wheat (Ponts et al., 2007). Likewise during infections of mammalian tissues, yeast and fungal pathogens must cope with ROS generated by phagocytes to partially evade the innate immune system.

This has been illustrated for *Aspergilli* during aspergillosis (Brakhage et al., 2010, Hasenberg et al., 2011) and also for different yeast species (Abegg et al., 2010). These examples illustrate the well-documented key role of ROS in innate response to pathogen and in phagocyte function (Bogdan et al., 2000, Ferrari et al., 2011, Kvietys and Granger, 2012). They also show the inevitable and frequent exposure of fungi to high levels of ROS, generated either as by-products of their metabolism primarily through respiration, or as defense weapons (oxidative burst) for plant tissues, or by phagocytic cells of the hosts they invade. To cope with this stressful environment, fungal cells activate their detoxification machinery, which consists of enzymatic as well as non-enzymatic defense systems. Both transcriptional and post-transcriptional mechanisms are involved. Among them, the modulation of the activity of transcriptional regulators that control the expression of detoxification genes has been the subject of intensive investigations.

Transcriptional response to oxidative stress in filamentous fungi is mediated *via* two modes; regulation can occur *via* nuclear sequestration of specific transcription factors, and *via* protein phosphorylation signaling pathways.

The present review aims at discussing the current state of knowledge underlying the ability of fungal cells to respond to oxidative stress mediated by the activation of specific transcription factors that control the expression of genes involved in detoxification. Most information on the subject has been initially obtained from yeast species, mainly *Saccharomyces cerevisiae*. During the last decade, however, *Aspergillus* species have been increasingly investigated regarding the response pathways that are activated by oxidative stress in filamentous fungi. In particular, a direct link between oxidative stress response and secondary metabolism has been demonstrated, and involves transcriptional regulations (Hong et al., 2013b). This recent finding is of paramount importance. Indeed, many fungal secondary metabolites present

specific interest for industry, and their production is constantly in need for improvements. In addition, various phytopathogenic fungi (*e.g. Fusaria*) can produce secondary metabolites that are toxic, so-called mycotoxins, and are regular contaminants of food and feed. The present review specifically emphasizes on the relationship between transcriptional control of oxidative stress response and secondary metabolism, and the strategies that are used to exert this control. Here, the antioxidant defense system in fungi is outlined, and the best known transcription factors involved in its control are described. Ultimately, our analysis uncovers elements of the nature of the coupling between ROS signaling, antioxidant activation, and secondary metabolism.

II-The antioxidant defense system

Fungal cells possess enzymatic and non-enzymatic defense systems for protection against ROS. Non-enzymatic systems consist mainly of small molecules acting as radical scavengers. The best examples are glutathione and thioredoxin (Jamieson, 1998). On the enzymatic side, the most studied defense systems are catalases and superoxide dismutases.

II-1-Non-enzymatic systems

The glutathione system

Glutathione is the central and best-known non-enzymatic system protecting cells from oxidative stress. The redox scavenging activity of this tripeptide γ -L-glutamyl-L-cystinylglycine (gsh) results from its redox-active sulphhydryl group that reacts with various oxidant molecules, leading to reduced glutathione (gssg) (Jamieson, 1998). In *S. cerevisiae*, the genes involved in the gsh biosynthetic pathway have been well characterized. *Gsh1* encodes a γ -glutamylcysteine synthetase, and *gsh2* encodes a glutathione synthetase (Suzuki et al., 2011, Wu and Moye-Rowley, 1994). Furthermore, in the cell, equilibrium between

gsh and gssg is maintained due to a glutathione reductase activity, encoded by *glr1*, which reduces gsh to gssg (Collinson and Dawes, 1995). In *S. cerevisiae*, mutants affected in the glutathione cycle have been shown to be hypersensitive to H₂O₂, and to the synthetic thiol-oxidizing agents menadione and diamide (Muller, 1996, Stephen and Jamieson, 1996). Those deficient for *gsh1* were nevertheless still able to develop an adaptive stress response to oxidants (Stephen and Jamieson, 1996). *C. albicans* was also demonstrated to possess an efficient transport pathway for glutathione, involved in homeostasis of redox status (Desai et al., 2011).

Glutathione acts as a scavenging molecule and is used as substrates for a large number of cellular reactions. For example, H₂O₂ is reduced by a glutathione peroxidase using gsh as a reductant (Li et al., 2008). Also, glutathione can be conjugated to many xenobiotic compounds to reduce their toxicity, catalyzed by a glutathione-S-transferase (gst). A large range of harmful molecules, such as zinc, cadmium or mercury, can therefore be conjugated to glutathione, leading to less reactive and more soluble compounds (Choi et al., 1998, Shin et al., 2002, Veal et al., 2002). Several isoforms of gst have been identified in numerous yeasts and filamentous fungi. The two gst proteins gtt1 and gtt2 have been characterized in *S. cerevisiae* (Choi et al., 1998). In *Schizosaccharomyces pombe*, Veal et al., (2002) reported the induction of three glutathione-s-transferases in response to oxidative stress, *i.e.* gst1, gst2, and gst3 (Shin et al., 2002). Strains of *S. pombe* lacking any of the three *gst* genes are more sensitive to H₂O₂ and to the catalase inhibitor ter-butyl hydroperoxide (t-BOOH), but also more resistant to diamide (Veal et al., 2002). Here it seems that the role of gsh system in yeast is extremely diverse. In *Aspergillus nidulans*, a gst, designated gstA, was shown to actively contribute to the resistance to multiple xenobiotics and heavy metals, and deleted mutants were sensitive to diamide, contrary to what was shown in *S. pombe* (Fraser et al., 2002, Pusztahelyi et al., 2011).

Similar to *S. pombe*, three genes encoding *gst* were identified in *Aspergillus fumigatus*, encoded by *gstA*, *gstB* and *gstC* (Burns et al., 2005). They were shown to play a role in the response to xenobiotics, as well as the response to oxidative stress with the exception of *gstB* (Burns et al., 2005). In *Aspergillus niger*, glutathione reductase and glutathione peroxidase activities were demonstrated to participate to the response to H₂O₂ (Li et al., 2008). According to the results of Sato et al., (2011), the glutathione reductase *glrA* identified in *Fusarium oxysporum* confers tolerance to cytotoxic elemental sulphur by reducing it into less harmful sulphide (Sato et al., 2011). In addition, in *Acremonium chrysogenum*, Long et al., (2012) described the involvement of a glutathione reductase encoded by *glrA* in oxidative stress response, and indirectly in cephalosporin production (Long et al., 2012). The function of *gsh* system seems to be well retained among filamentous fungi and this system has a vast role in response to xenobiotics.

The thioredoxin system

The second non-enzymatic antioxidant system that significantly participates in oxidative stress response in filamentous fungi and yeasts is centered on the sulphydryl-rich small protein thioredoxin. Thioredoxin has a redox active site and functions as a ROS scavenger (Jamieson, 1998). Two genes, *trx1* and *trx2* have been reported to code for thioredoxin proteins in *S. cerevisiae* (Jamieson, 1998, Muller, 1996). These two variants of thioredoxin were shown to be involved in oxidative stress response induced by H₂O₂ but not diamide, certainly due to the fact that diamide is a thiol oxidizing agent (Muller, 1996). In the cell, thioredoxins are maintained reduced by thioredoxin reductases in an NADPH-dependent reaction, and can be oxidized by thioredoxin peroxidases in the presence of H₂O₂ (Jamieson, 1998).

With regards to thioredoxin systems in filamentous fungi, data are incomplete and mostly descriptive. In *A. fumigatus*, five genes encoding putative thioredoxins have been identified (Leal et al., 2012). They are required for hypha survival during oxidative stress mediated by H_2O_2 (Leal et al., 2012). In *Podospora anserina*, Malagnac et al., (2007) reported five genes coding for thioredoxins. Among them, *trx1* seems to be the major thioredoxin with a significant role in sulphur metabolism but not in peroxide resistance (Malagnac et al., 2007). In *F. oxysporum*, Sato et al., (2011) reported the involvement of thioredoxin in sulphur reduction and identified a *trx* gene designated as *trxA*. The exact function of thioredoxin in filamentous fungi and its link with ROS and oxidative stress remain to be analyzed in depth. Thioredoxin seems to be more restricted to response to sulphur.

II-2-Enzymatic systems

Catalases

Catalases play a central role in defense against oxidative stress. They catalyze the breakdown of H_2O_2 into O_2 and H_2O . In the presence of ROS, catalases in *S. cerevisiae* protect proteins from oxidation (Lushchak and Gospodaryov, 2005). In *S. cerevisiae* the genes *cta1* and *ctl1* encode two catalases, A and T respectively (Jamieson, 1998). Catalase A is located in the peroxisome and removes H_2O_2 produced by β -oxidation. Catalase T is cytosolic and is involved in the responses to oxidative and osmotic stress (Jamieson, 1998).

From a phylogenetic point of view, the number of catalases found in a genome varies among species, ranging from two for *S. cerevisiae* to five for *P. anserina*, namely *catA*, *catB*, *catP1*, *catP2* and *cat2* (Bourdais et al., 2012, Hansberg et al., 2012, Zintel et al., 2011). *Cat2* and *catB* are the key factors responsible for H_2O_2 detoxification, but minor roles for the other three catalases are not excluded (Bourdais et al., 2012).

This may reflect adaptation of these fungi to their specific environment. In *A. nidulans*, the catalase-encoding genes *catA* and *catB* were first characterized by Navarro et al (1996). Catalase A and catalase B are not redundant and provide protection against oxidative stress at different phases of the fungus asexual cycle (Kawasaki et al., 1997). Expression of *catA* is induced during sporulation (Navarro et al., 1996). On the other hand, catalase B activity starts to accumulate 10 hours after spore inoculation and is regulated at the transcript accumulation level (Navarro et al., 1996). Two others catalase genes, *catC* and *catD* have also been described (Kawasaki and Aguirre, 2001). In *Aspergillus oryzae*, only two catalase genes have been identified to date, namely *catA* and *catB* (Hisada et al., 2005). In liquid cultures, H₂O₂ induces *catB* gene but not *catA*, consistent with the fact that, as in *A. nidulans* catB reduces toxic effects of oxidative stress whereas catA is required during sporulation (Hisada et al., 2005).

In *Neurospora crassa*, the three catalases cat1, cat2, and cat3, show different specific activities in response to superoxide stress (Chary and Natvig, 1989). Cat1 is the predominant enzyme in rapidly growing mycelium. Cat1, very resistant to inactivation by various denaturants or by temperature, is not inhibited by molar concentrations of H₂O₂, showing the importance of this catalase's ability to cope with stress (Diaz et al., 2001).

In *F. oxysporum*, two catalase isozymes were detected in mycelia cells and chlamydiospores (Kono et al., 1995). In *F. graminearum*, H₂O₂ stress seems to significantly increase catalase activity in strains producing the secondary metabolite nivalenol but not in strains producing deoxynivalenol (Ponts et al., 2009). In the phytopathogen *Claviceps purpurea*, a gene encoding catalase activity named *cpcat1* was identified. Deletion mutants of this gene show no significant reduction in virulence (Garre et al., 1998). Similarly in *B. cinerea*, a *cat2*-deficient mutant is not affected in its virulence on tomato or bean leaves (Schouten et al., 2002). Considering these elements, although the equipment in catalases is variable among

filamentous fungi, it does not seem to be linked to virulence. The differences observed could rather reflect specific adaptation to their host.

Superoxide dismutases

Superoxide dismutases, or SOD, are metallo-enzymes that catalyze the dismutation of the superoxide anion $O_2^{\cdot -}$ into H_2O_2 and O_2 . The yeast *S. cerevisiae* possesses two SODs: the mitochondrial manganese-SOD (MnSOD), encoded by *sod2*, and the cytoplasmic copper zinc-SOD (Cu/ZnSOD), encoded by *sod1* (Bermingham-McDonogh et al., 1988, Jamieson, 1998, Van Loon et al., 1986). A central role in removing superoxide from the cytoplasm is ascribed to the Cu/ZnSOD whereas the MnSOD is more likely involved in the protection of mitochondria against the damages caused by peroxides resulting from respiration (Gralla et al., 1991, Guidot et al., 1993, Jamieson, 1998). MnSOD-deficient yeasts are sensitive to oxygen, reinforcing the role of this SOD in protecting mitochondria during respiration (Van Loon et al., 1986). The loss of Cu/ZnSOD further leads to metabolic changes such as glucose repression defects and sensitivity to boric acid (Schmidt et al., 2012, Sehati et al., 2011). Cells lacking *sod1* are more sensitive to cell wall perturbing agents and accumulate more ROS, suggesting a link between anti-oxidative function and cell wall (Liu et al., 2010). In several yeasts belonging to the genus *Candida*, treatment with H_2O_2 results in an increase in SOD activity (Abegg et al., 2010). In yeast, SOD activity seems to be very limited to ROS response.

Numerous studies have been devoted to the characterization of SOD in several filamentous fungi (Chambergo et al., 2012, Fang et al., 2002, Kono et al., 1995, Lima et al., 2007, Zhou et al., 2012). In *Cordyceps militaris*, the activity of partially purified Cu/ZnSOD is inhibited by H_2O_2 at 2.5 mM (Wang et al., 2005).

Studies performed in *Cryptococcus neoformans* indicated a strong induction of *sod1* transcripts following t-BOOH treatment (Wormley et al., 2005). Finally, *sod1* deletion in *N. crassa* led to an enhanced sensitivity to paraquat and elevated oxygen concentrations, together with an increased spontaneous mutation rate (Chary et al., 1994). Here again, SOD activity is very limited to response to ROS. In *A. niger*, both Cu/ZnSOD and MnSOD have been identified (Dolashki et al., 2008). In *A. niger*, SOD activity seems to be involved in adaptation to oxidative stress, rather than prevention (Kreiner et al., 2002). The *sodA* gene identified by Oberegger et al (2000) in *A. fumigatus* and *A. nidulans*, encodes a Cu/ZnSOD that is upregulated during iron starvation (Oberegger et al., 2000). This observation suggests that in *Aspergillus*, Cu/ZnSOD has a more general role in response to stress compared to MnSOD, which seems to be more specific to oxidative stress. In the necrotrophic plant pathogen *Sclerotinia sclerotinium*, Veluchamy et al., (2012) reported the strong accumulation of *sod1* transcripts, encoding a Cu/ZnSOD, following treatment with menadione 250 μ M. Consistently, *S. sclerotinium* lacking *sod1* is more sensitive to menadione, and also less virulent on tobacco and tomato plants (Veluchamy et al., 2012). In the pathogen *B. cinerea*, mutants deleted for *sod1*, encoding a Cu/ZnSOD, have an impaired virulence on bean plants (Rolke et al., 2004). Here, the entire response to stress seems to be essential for full virulence, probably due to the ability to counteract oxidative burst managed by plants.

Even though the strong involvement of SOD activity in response to stress is clearly highlighted by the works cited above, the individual roles of Cu/ZnSOD and MnSOD remain unclear. To our best knowledge, the exact implication of each individual SOD in response to various stresses has yet to be investigated side by side in a given organism.

In yeast, the detoxifying activities described up to this point in this review are part of the Common Environmental Response pathway (CER), in which a common set of genes are induced by different types of stress. The regulation of this core response is linked to several transcription factors and drives cell adaptation to various types of stresses (Chauhan et al., 2006). The second part of this review is dedicated to such transcription factors that have also been characterized in fungi, and are involved in response to oxidative stress.

III- Transcriptional control of genes involved in the fungal antioxidant machinery

In *Alternaria alternata*, signaling pathways have evolved in flexibility and uniqueness in order to respond to diverse environmental stimuli, including oxidative signals (Chung, 2012). In *S. pombe*, different signaling pathways can be activated upon oxidative stress depending on the severity of the stress exerted (Vivancos et al., 2006). Generally speaking, sensor-dependent pathways seem to lead to adaptation, whereas others induce survival response (Vivancos et al., 2006). All together, these pathways form a complex network of regulation in response to stress in which two types of regulation can be distinguished. The first one consists in localizing specific regulators to the nucleus upon stress, followed by subsequent activation of detoxification gene expressions. The second type of regulatory mechanism is phosphorylation-driven and involves the intervention of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways. This signaling cascade is essential for sensing environmental stimuli, for transmitting them to the nucleus, and finally modulating gene expression. MAPK pathways phosphorylate numerous proteins, including transcription factors (Qi and Elion, 2005). MAPK mediated pathways are composed of three kinase modules, and are well conserved in all eukaryotes (Robinson and Cobb, 1997).

This review focuses on four central transcription factors (TFs), well studied in yeast.

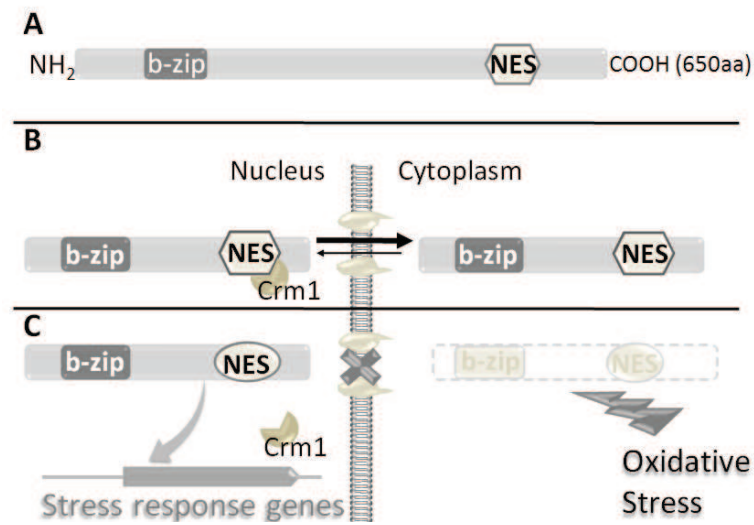


Figure 1: Yap1 in *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Yap1 is a b-zip transcription factor of 650aa. The protein contains a NES at its C-terminus. (B) In normal conditions, yap1 is distributed between cytoplasm and nucleus. (C) After exposure to an oxidative stress, the factor is relocated to the nucleus, due to conformational changes that unable the interaction with crm1. Thus, yap1 activates the expression of its target genes.

III-1- Control by nuclear localization of TFs

Cell compartmentalization is the first level of gene regulation: DNA is located inside the nucleus whereas transcription factors are translated in the cytoplasm. Therefore regulating the localization of these factors controls access to target genes. Such regulation is usually managed *via* short sequences known as nuclear localization signals that interact with importin carrier proteins, and nuclear export signals interacting with exportin carrier proteins. This process allows the recruitment of a preexisting pool of proteins inside the nucleus when necessary (Moye-Rowley, 2003). One of the best-known examples of nuclear localization controlled by oxidative stress is the transcription factor ap1 (Moye-Rowley et al., 1989, Wemmie et al., 1997).

Ap1

The function of ap1 in response to oxidative stress has been extensively investigated in *S. cerevisiae* and recently reviewed (Hong et al., 2013a). The ap1 protein in *S. cerevisiae*, named yap1, is a 650 amino acid-long sensor of oxidative stress (Figure 1A). The protein contains a bZIP domain, two clusters of cysteine residues, or cysteine rich domains (CRD), which redox status plays a key role in yap1 localization (Rodrigues-Pousada et al., 2010, Rodrigues-Pousada et al., 2004). In non-stressing conditions, the C-terminal CRD domain (c-CRD), containing a nuclear export signal (NES), is reduced and binds the exportin protein crm1 (Yan et al., 1998). Yap1 is constitutively distributed between the cytoplasm and the nucleus so that its nuclear concentration remains relatively low (Figure 1B). When oxidative stress is applied, the c-CRD domain oxidizes, causing conformational changes that disable the interaction with crm1 (Figure 1C). Yap1p accumulates to the nucleus (Kuge et al., 2001, Kuge et al., 1997, Yan et al., 1998).

Once in the nucleus, yap1 binds to ap1 recognition elements TGACTAA, (Rodrigues-Pousada et al., 2010) found in the promoters of target genes encoding the antioxidant activities to activate their expressions (Kuge et al., 2001, Kuge et al., 1997). The mechanism by which yap1 is activated however, depends on the considered oxidant molecule (Gulshan et al., 2005, Ouyang et al., 2011). H₂O₂, for example, activates yap1 through the glutathione peroxidase gpx3-mediated formation of an intramolecular disulfide bond between two cysteines of gpx3 and the c-CRD domain of yap1 (Delaunay et al., 2002). On the other hand, thiol reactive electrophiles, such as acrolein, activate yap1 by direct adduction to the c-CRD (Delaunay et al., 2002, Gulshan et al., 2005, Ouyang et al., 2011). The c-CRD is essential for proper response to oxidative stress as the exportin crm1. Deletion of crm1 or of the c-CRD of yap1 could result in a same constitutive activation of the factor, by localization in the nucleus. A number of target genes of yap1 have now been identified, such as *trx2*, *trr1*, or *gsh1* (Gulshan et al., 2005, Kuge et al., 1997, Ouyang et al., 2011, Wu and Moye-Rowley, 1994). Inactivation of yap1 results in a sensitivity to various oxidants and also to cadmium (Toone and Jones, 1999).

In the yeasts *S. pombe* and *C. albicans* two homologues of yap1, respectively pap1 and cap1, have been described as key regulators of oxidative stress response (Alarco and Raymond, 1999, Toone et al., 1998). Both pap1 and cap1 regulatory pathways seem to show high similarities with yap1, as well as involvement in activating the expression of genes encoding antioxidant activities (Alarco and Raymond, 1999, Toone et al., 1998). For example, the expression of *cap1* in *S. cerevisiae* lacking *yap1* restores cadmium and H₂O₂ resistance (Alarco et al., 1997). Similarly to *S. cerevisiae*, *S. pombe* strains carrying a mutation in *pap1* are hypersensitive to t-BOOH, diamide, cadmium and arsenic (Toone et al., 1998).

Interestingly, deletion of *cap1* gene in *C. albicans* also leads to hypersensitivity to cadmium and H₂O₂, but not to diamide (Alarco and Raymond, 1999). Homologues of *yap1* have been identified as involved in resistance to multiple oxidants in various filamentous fungi, including *Magnaporthe oryzae*, *N. crassa*, *B. cinerea* as well as less studied fungi such as *A.alternata* and *Ashbya gossypii* (Guo et al., 2011, Takahashi et al., 2010, Temme and Tudzynski, 2009, Walther and Wendland, 2012, Yang et al., 2009). In most of them, *ap1* was demonstrated to differentially accumulate in the nucleus in response to oxidative stress, following a similar pathway to that previously described for yeasts (Guo et al., 2011, Takahashi et al., 2010, Walther and Wendland, 2012, Yang et al., 2009). The function of *ap1* and the mechanics of this factor seem to be particularly conserved among filamentous fungi, in spite of slight changes depending on oxidant molecules. Accordingly, *bap1* identified in *B. cinerea* modulates the response of a large panel of genes when the fungal cells are exposed to oxidative stress (Temme and Tudzynski, 2009). Considering such stresses, a common trait for all the identified *ap1* factors is their role in resistance to H₂O₂. On the contrary, only some of them seem to be involved in response to t-BOOH (in *N. crassa* and *A. alternata*), or menadione (*B. cinerea*, *A. gossypii*, and *N.crassa*) (Takahashi et al., 2010, Temme and Tudzynski, 2009, Walther and Wendland, 2012, Yang et al., 2009). Menadione was particularly found to cause the up-regulation of genes coding for thioredoxin, glutathione reductase, and glutathione peroxidase in *N. crassa*. In the pathogenic fungi *M. oryzae* and *A. alternata*, *ap1* was further reported as essential for pathogenicity (Guo et al., 2011, Yang et al., 2009). On the contrary, the factor has no impact on *B. cinerea* pathogenicity (Temme and Tudzynski, 2009), and on the foliar pathogen of maize *Cochliobolus heterostrophus* (Lev et al., 2005).

Proteins with sequence similarities to yap1 have also been found in various species belonging to the genus *Aspergillus* such as Afyap1 in *A. fumigatus*. Mutants of *A. fumigatus* strains carrying a truncated Afyap1 protein missing the c-CRD domain are highly resistant to H₂O₂, menadione and diamide, consistent with the permanent nuclear localization of Afyap1 independently from oxidative stress (Qiao et al., 2010). In *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus ochraceus*, Reverberi et al., identified two orthologues of yap1, named Apyap1 and Aoyap1 respectively (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). Both are involved in response to several oxidants, including H₂O₂ and hydroperoxides. In *A. ochraceus*, *catA* and *sod1* expression are affected in a Δ Aoyap1 strain, supporting the participation of Aoyap1 in the activation of antioxidant activities (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). Apyap1 and Aoyap1 have further been analyzed for the role they could play in the regulation of the production of toxic secondary metabolites (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). Strains of *A. parasiticus* and *A. ochraceus* lacking Apyap1 and Aoyap1, respectively, show higher aflatoxin A and ochratoxin A accumulation, correspondingly. In this case, the absence of response to oxidative stress mediated by ap1 results in the accumulation of oxidative species that are consumed by the secondary metabolism, leading to an increase in toxin accumulation. A link between oxidative stress response and regulation of secondary metabolism by ap1 was reported in the case of riboflavin production by *A. gossypii* (Walther and Wendland, 2012). In this cotton pathogen, yap1 directly activates the expression of genes encoding riboflavin biosynthesis, and riboflavin plays a key role together with the enzymes that protect cells from oxidative stress (Walther and Wendland, 2012). This is consistent with the fact that ap1 protects cells by activating antioxidant activities to counteract the oxidative burst of the host.

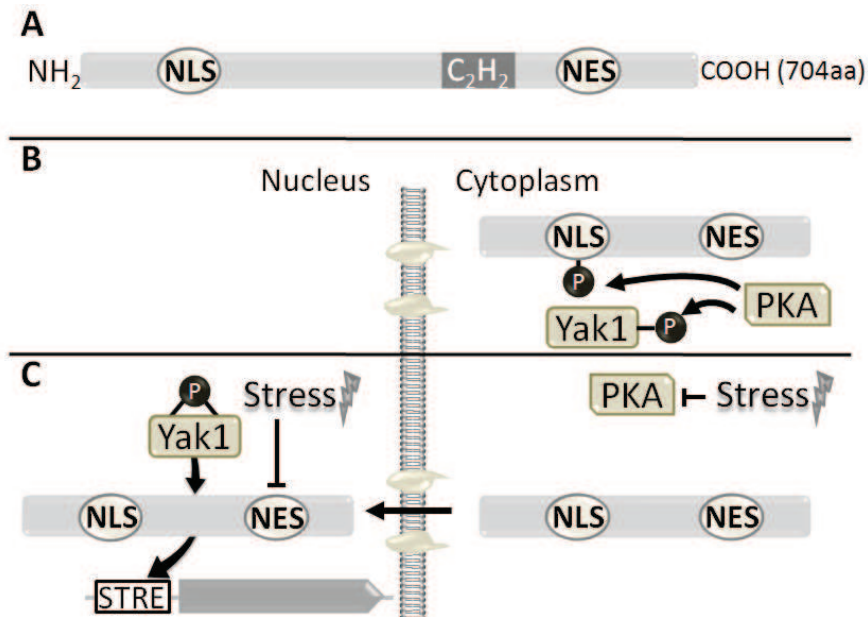


Figure 2: Msn2/msn4 in *S. cerevisiae*. (A) Msn2 and msn4 contain an N-terminal nuclear localization signal (NLS), a C-terminal nuclear export signal (NES), and zinc finger DNA binding domains also in the C terminus of the protein. (B) In the absence of stress, the NLS in msn2/msn4 is phosphorylated by a protein kinase A, or PKA causing msn2/msn4 to remain sequestered in the cytoplasm. Yak1, another kinase is sequestered in the cytosol when phosphorylated by PKA. (C) Upon stress, the activity of the PKA is lowered, the NLS is not phosphorylated anymore, and msn2/msn4 rapidly accumulate in the nucleus. Then nuclear yak1 undergoes the autophosphorylation of its N-terminal end, required for full activity of msn2/msn4. Phosphorylated msn2/msn4 finally activate stress-responsive genes by binding to STRE sequences

In *S. cerevisiae*, yap1 interacts with another transcription factor skn7, to contribute to an efficient oxidative stress response (Mulford and Fassler, 2011). This factor, regulated by phosphorylation, is presented in the part corresponding to control by phosphorylation.

Msn2/msn4

In *S. cerevisiae*, msn2 and msn4 are redundant positive transcription factors containing Cys2His2 zinc fingers and implicated in the response to a broad set of environmental stresses, including oxidative (0.5 mM H₂O₂), heat shock, or osmotic (3M NaCl) stress (Martínez-Pastor et al., 1996). They control the transcription of a large battery of genes, varying according to the considered type of stress (Estruch, 2000). For example, msn2 and msn4 control a large H₂O₂-inducible regulon of 27 genes (Hasan et al., 2002). The functions of msn2/msn4 partially overlap with those of yap1, suggesting independent and distinctive roles for yap1- and msn-mediated oxidative stress response pathways (Hasan et al., 2002).

Msn2 and msn4 have three separate functional domains, a N-terminal nuclear localization signal (NLS), a C-terminal nuclear export signal (NES), and a zinc finger DNA binding domains also in the C terminus of the protein (Figure 2A). These domains are essential for the recognition of cis-acting stress response elements (STRE) sequences (Gorner et al., 1998, Gorner et al., 2002). STRE-driven transcription is regulated by the HOG pathway, a MAP kinase pathway protecting cells against high osmolarity in *S. cerevisiae* (Brewster et al., 1993). In the absence of stress, the NLS in msn2/msn4 is phosphorylated by a cAMP-dependant protein kinase A, or PKA, causing msn2/msn4 to remain sequestered in the cytoplasm (Gorner et al., 2002, Smith et al., 1998) (Figure 2B). Upon stress, the activity of the PKA is lowered, the NLS is not phosphorylated anymore, and msn2/msn4 rapidly accumulate in the nucleus (Figure 2C) (Gorner et al., 2002).

The NES is believed to be also inactivated within the nucleus by as yet unknown mechanisms. Moreover, previous data indicate that another kinase, yak1, also plays a role in regulating msn2/msn4 by mechanism that up to now remain largely unknown (Lee et al., 2008). Yak1 is sequestered in the cytosol when phosphorylated by PKA (Figure 2B), therefore re-locating to the nucleus upon oxidative stress (Lee et al., 2011). In the nucleus, yak1 undergoes autophosphorylation of its N-terminal end (Figure 2-C), required for full activity (Lee et al., 2011) and phosphorylation of msn2 and msn4 (Lee et al., 2008). Nuclear phosphorylated msn2/msn4 finally activate stress-responsive genes by binding to STRE sequences (consensus 5'-AGGGG-3') located in the promoter regions, as shown in Figure 2C (Kandror et al., 2004, Martínez-Pastor et al., 1996, Schmitt and McEntee, 1996).

In the yeast *C. glabrata*, homologues of msn2 and msn4 have been identified and called Cgmsn2 and Cgmsn4 (Roetzer et al., 2008). Cgmsn2 is regulated by environmental stress including osmotic stress, heat shock and oxidative stress provoked by H₂O₂. The mode of action of msn2 is well conserved between *S. cerevisiae* and *C. glabrata* (Roetzer et al., 2008). In *C. albicans*, Camn4 and Camn1 (for msn4 and msn2-like respectively in *C. albicans*) have been identified based on protein alignments with msn2 and msn4 from *S. cerevisiae* (Nicholls et al., 2004). However, they seem to play no role in the resistance to many stresses including heat shock, osmotic stress by NaCl, and oxidative stress by H₂O₂ and to not contribute to the global transcriptional response of the pathogen. Mnl1 is nonetheless required for the adaptation of *C. albicans* to weak acid stress response (Ramsdale et al., 2008). In *A. parasiticus* and *Aspergillus flavus*, the *msnA* gene, ortholog to *msn2* in *S. cerevisiae*, seems to be required for maintenance of a normal redox state, as supported by the fact that expression of genes encoding oxidative stress defense enzymes (superoxide dismutase, catalase and

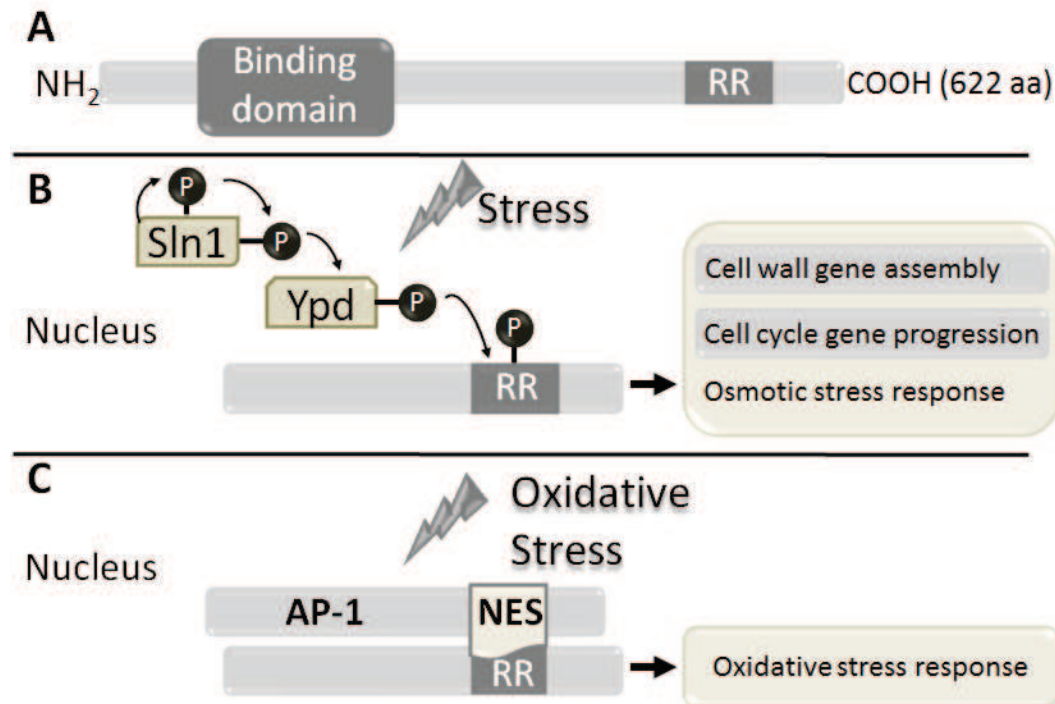


Figure 3: Skn7 in *S. cerevisiae*. (A) Skn7 contains an N-terminal DNA binding domain and a C-terminal receiver domain typical of two-component signal transduction systems. (B) Upon stress, skn7 is activated following several phosphorelays involving sln1 and ypd. Once phosphorylated, skn7 can activate the transcription of its target genes. (C) Skn7-mediated response to oxidative stress does not specifically need phosphorylation and partially overlaps with that of yap1.

cytochrome c oxidase in *A. parasiticus* and catalase A in *A. flavus*) is up-regulated in both deletion strains (Chang et al., 2011). An involvement of an *msnA* factor in the regulation of secondary metabolism was also suggested by Chang et al. (2011) whose data indicate an activation of aflatoxin biosynthesis by *msnA*-deleted strains in *A. parasiticus* (Chang et al., 2011). Here again, as for *ap1*, the absence of response to oxidative stress results in an increase in toxin accumulation, which may contribute to the consumption of the excess of oxidants. Therefore, *msn2/msn4* factors seem to be involved in response to a large set of stress, and could be linked with the regulation of secondary metabolism in filamentous fungi.

III-2- Control by phosphorylation of TFs

Skn7

In the yeast *S. cerevisiae*, *skn7* is a positive transcription factor involved in the control of cell wall assembly, cell cycle progression, and osmotic or oxidative stress responses (Morgan et al., 1997). Contrary to *yap1*, *skn7* is constitutively nuclear, regardless the environmental conditions (Morgan et al., 1997, Raitt et al., 2000). The regulation of *skn7* is phosphorylation-mediated and is transduced in parallel to the MAPK cascades in *S. cerevisiae* (Brewster et al., 1993).

Skn7 contains a N-terminal DNA binding domain and a C-terminal receiver domain typical of two-component signal transduction systems, both highly conserved (Figure 3A) (Mulford and Fassler, 2011). Upon stress, *skn7* is activated following several phosphorelays involving several partners (Fassler and West, 2011). These phosphorelays steps are summarized in Figure 3B. The first one occurs between a histidine and an aspartate residue of *sln1*, an osmosensing histidine protein kinase. Phosphorylation is then transferred from the aspartate in

sln1 to a conserved histidine in the phosphorelay protein ypd1. Finally, the last phosphorelay occurs between ypd1 and the aspartate-containing receiver domain of skn7. Once phosphorylated, skn7 can activate the transcription of target genes (Fassler and West, 2011, Ketela et al., 1998). This last phosphorylation mechanism, however, is not essential for oxidative stress response; the receiver domain possibly plays a structural role necessary during oxidative stress response (Morgan et al., 1997). In *S. cerevisiae*, deleting *skn7* results in an increased sensitivity to a wide variety of oxidizing agents, such as t-butyl hydroperoxide (tBOOH), menadione, and cadmium (Morgan et al., 1997). Skn7 is also required to trigger stress response to H₂O₂, and activate the transcription of heat shock genes (Raitt et al., 2000). On the contrary, skn7 does not seem to be involved in response to diamide (Morgan et al., 1997). Finally, as mentioned above, skn7-mediated response to oxidative stress partially overlaps with that of yap1. The two factors can indeed interact in a DNA-independent manner (Figure 3C), that involves the receiver domain of skn7 and the cysteine-rich domains of yap1 to contribute to an efficient oxidative stress response (Mulford and Fassler, 2011). Together, they are involved in activating detoxification genes such as *trx2*, *gpx2*, *ctl1*, *sod1*, or *sod2* (Fassler and West, 2011). Only half of the genes controlled by yap1, however, also requires the presence of skn7 for its H₂O₂-dependant induction (Lee et al., 1999).

In the human pathogen *C. albicans*, a disrupted *skn7* mutant was shown to be highly sensitive to H₂O₂ and t-BOOH but not to menadione, for which only a mildly attenuated response was obtained (Singh et al., 2004). In *C. glabrata*, *skn7* deletion results in increased susceptibility to H₂O₂ and t-BOOH and reduced virulence (Saijo et al., 2010). Additional data demonstrated a significant role of skn7 in the regulation of antioxidant genes such as *trx2*, *trr1*, *tsal* (involved in the thioredoxin metabolism), and the catalase-encoding gene *ctal* (Saijo et al., 2010). In *C. glabrata*, similar to *S. cerevisiae*, skn7 is constitutively nuclear and acts in concert with yap1.

The two factors cooperate to achieve rapid promoter recruitment and ensure the expression of oxidative stress response genes (Roetzer et al., 2011). Skn7-like proteins were identified in several other fungi, with similar roles to those ascribed to *S. cerevisiae* skn7. In *A. nidulans*, the skn7-like protein ssrA is involved in conidia production as well as response to cell wall stress, osmotic stress, and oxidative stress (Hagiwara et al., 2011). As in *S. cerevisiae*, phosphorylation of the receiver domain of ssrA is however not essential to trigger oxidative stress response but required for full resistance to H₂O₂ as well as osmotic stress adaptation (Hagiwara et al., 2011). In *A. fumigatus*, deleting *skn7* has no effect on virulence but increases sensitivity to H₂O₂ and t-BOOH without any change in sensitivity to menadione and diamide (Lamarre et al., 2007). In *M. oryzae*, *skn7* participates to neither response to oxidative stress nor pathogenicity but plays a significant role in response to osmotic stress (Motoyama et al., 2008). In *C. neoformans*, *skn7* deletion resulting in less virulent strains, slightly affects the sensitivity to t-BOOH and demonstrates the involvement of *skn7* in t-BOOH-mediated activation of the expression of *sod1* and *trr1* (Coenjaerts et al., 2006, Wormley et al., 2005). Finally, *skn7* identified in *Penicillium marneffei* was shown to be involved in oxidative stress response and was successfully used to complement a *skn7*-disrupted strain of *S. cerevisiae*, indicating a highly conservative nature of skn7 function between these two organisms (Cao et al., 2009).

As a whole, data accumulated in yeast and filamentous fungi suggest that the role of skn7 overlaps, at least to some extent, with that of yap1. In that regard, skn7 could also be involved in regulating fungal secondary metabolism, given the previously illustrated link between yap1 and secondary metabolism.

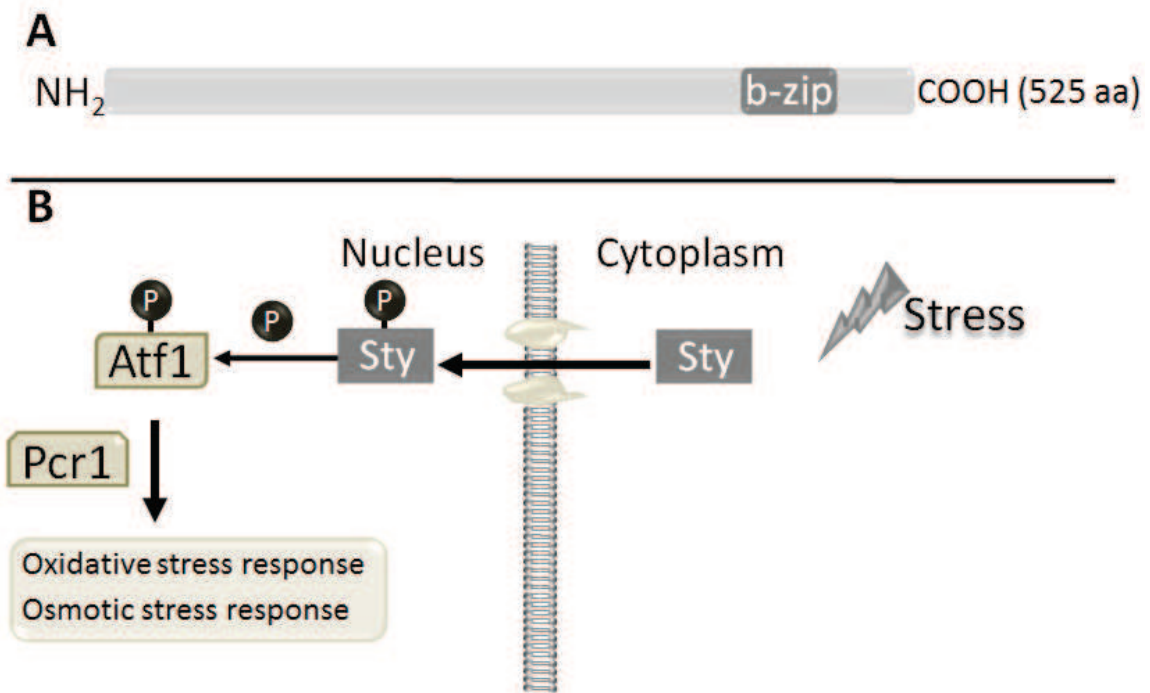


Figure 4: Atf1 in *Schizosaccharomyces pombe*. (A) Atf1 contains a bZIP DNA-interacting domain at its C-terminus. (B) Under stress, Sty is stimulated and accumulates in the nucleus. Sty regulates the activity of atf1 by phosphorylation, which then regulates the expression of genes involved in stress response with pcr1.

Atf1/Atf2

Atf1 was first described in *S. pombe* and belongs to the ATF/CREB protein family (Takeda et al., 1995). Constitutively nuclear, it contains a bZIP DNA-interacting domain at its C-terminus (Figure 4A) (Takeda et al., 1995, Wilkinson et al., 1996). In *S. pombe*, atf1 is under the control of the STY signaling pathway (MAPK cascade), which is homologous to the *S. cerevisiae* HOG pathway (Brewster et al., 1993, Millar et al., 1995). Under stress and particularly oxidative conditions, the MAP kinase sty accumulates in the nucleus and is activated by phosphorylation, as shown in Figure 4B. Once phosphorylated, sty plays a role in the activation (phosphorylation) of the atf1 transcription factor followed by rapid induction of the expression of target genes, including the catalase gene *ctt1* (Wilkinson et al., 1996). Previous studies showed that atf1 forms a heterodimer with the b-ZIP transcription factor pcr1 prior targeted DNA binding (Figure 4B) (Eshaghi et al., 2010, Lawrence et al., 2007, Watanabe and Yamamoto, 1996). The formation of such dimer is necessary to the induction of most stress-inducible genes upon stress provoked by the presence of H₂O₂ or KCl (Sanzo et al., 2008).

Atf1 homologues were identified in filamentous fungi. AtfA in *A. nidulans* was demonstrated by Lara-Rojas et al., in 2011, to interact with sakA, a stress-activated MAP kinase, similar to sty MAP kinase. AtfA was shown to participate to both t-BOOH and H₂O₂ oxidative stress response by regulating the expression of the catalase-coding genes *catA* and *catB*. Similar to atf1 in *S. pombe*, atfA is localized in the nucleus whether or not stress conditions are present. On the contrary, sakA accumulates in the nucleus in response to stress (Lara-Rojas et al., 2011). In *A. oryzae*, two ESTs encoding b-ZIP proteins with similarities to the ATF/CREB family of transcription factors have been identified and named *atfA* and *atfB* (Sakamoto et al., 2008, Sakamoto et al., 2009). The function of these two transcription factors was clarified by

the previous authors whose results indicate that *AtfA* conidia are more sensitive to H₂O₂ than *AtfB* conidia. In addition, all genes regulated by *atfB* are regulated by *atfA*, whereas some of the genes under the control of *atfA* are not related to *atfB*, including a gene encoding a catalase (Sakamoto et al., 2008, Sakamoto et al., 2009). In *N. crassa*, mutant strains carrying a disrupted *atf1* gene are unable to activate the expression of the catalase-coding *cat1* gene (Yamashita et al., 2008). However, data investigating *atfA/B* targets remain scarce, and current knowledge does not permit a broad representation of the response to stress. Remarkably, the *atfB* homolog identified in *A. parasiticus* seems to be directly involved in the regulation of secondary metabolism (Hong et al., 2013b). More precisely, under aflatoxin-inducing conditions, *atfB* was shown to bind promoters of genes involved in aflatoxin biosynthesis. Moreover, *atfB* seems to be an important regulator of the pathway coupling aflatoxin production and response to oxidative stress (Roze et al., 2011). A link between *atfB* and secondary metabolism can therefore be established.

Additional studies have highlighted the role of *atf* transcription factors in oxidative stress response and secondary metabolism (Guo et al., 2010, Nathues et al., 2004, Temme et al., 2012, Van Nguyen et al., 2013). In *B. cinerea*, *atf1* participates to vegetative growth and stress tolerance, and interferes with the production of phytotoxic secondary metabolites, such as botrydial, which causes necrotic lesions on many host plants. Deletion of the factor results in an increase in phytotoxic secondary metabolites biosynthesis. This switch to secondary metabolism pathways could counteract the oxidative burst triggered by the host plant and then increase the aggressiveness of the fungus (Temme et al., 2012).

In *F. graminearum*, *atf1* is involved in the responses to oxidative and osmotic stress as well as the regulation of the type B trichothecenes mycotoxins production, including the vomitoxin deoxynivalenol (Van Nguyen et al., 2013). In the absence of *atf1*, indeed, a reduced virulence

is observed on wheat and maize, associated to higher levels of type B trichothecenes production (Van Nguyen et al., 2013). Again, this increase of toxin production could be a way to eliminate the excess of oxidant compounds, encountered during infection.

Furthermore, *atf1* homologues in *M. oryzae* (Guo et al., 2010) and *Claviceps purpurea* (Nathues et al., 2004) are involved in response to oxidative stress, and are essential for full virulence and modulation of plant defense response, by limiting oxidative burst.

Among the transcription factors described above, *yap1* seems to play a central role, that overlaps to some extent with that of *skn7*. *Msn2* and *msn4* are functionally redundant and seem to respond to a broad set of stresses, their activity varying depending on the considered stress condition. Indeed, they can induce the transcription of a large battery of genes. *Atf1* also seems to respond to several stresses, but its target genes remain poorly described. As a whole, the findings briefly summarized here illustrate that the response to stress and the interactions of these transcription factors with antioxidant genes is complicated. Moreover, the tone is set between regulatory network in response to oxidative stress and secondary metabolism in filamentous fungi.

IV- What is the link between oxidative stress and secondary metabolism?

Fungi represent one of the most productive sources of secondary biologically active metabolites, many of them of industrial interest: antibiotics, compounds with anti-inflammatory and anti-tumor activities, plant growth regulators, insecticides, environmental friendly pesticides and herbicides, pigments used in food industry (Yu and Keller, 2005). At the genome level, the genes encoding the biosynthetic pathway responsible for the production of such secondary metabolites are frequently spatially clustered together at certain position on

chromosomes. These clusters of genes often contain one or more specific transcription factors involved in regulating the expression of members of the cluster (Yu and Keller, 2005). In addition, numerous reports have highlighted the control of secondary metabolites production at an upper level by global transcription factors encoded by genes located outside the cluster itself (Merhej et al., 2011b, Reverberi et al., 2010, Yu and Keller, 2005). For example, secondary metabolism and pH- or light-mediated regulations are linked (Merhej et al., 2011a, Merhej et al., 2012). The increasing number of studies describing the modulation of secondary metabolism by oxidative stress illustrates the growing interest for such global regulation (Hong et al., 2013b, Ponts et al., 2007, Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008).

Most of the former studies linking secondary metabolism and oxidative stress are devoted to mycotoxin biosynthesis, with the exception of one study dealing with the production of riboflavin by *A. gossypii* (Walther and Wendland, 2012). For example, accumulation of aflatoxin in *A. parasiticus* (Jayashree and Subramanyam, 2000, Reverberi et al., 2008), of ochratoxin A in *A. ochraceus* (Reverberi et al., 2012) and of trichothecenes B in *F. graminearum* (Ponts et al., 2006) were shown to be stimulated by oxidative stress. Accordingly, antioxidant compounds with well-known antifungal properties, e.g. phenolics, have been reported as potent mycotoxin biosynthesis inhibitors in *Aspergillus spp.* (Kim et al., 2006, Mahoney and Molyneux, 2004). For example, antioxidant phenolic constituents from walnuts, shiitake mushrooms, or maize can inhibit aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus* species (Mahoney and Molyneux, 2004, Nesci and Etcheverry, 2006, Reverberi et al., 2005). Phenolic antioxidants such as caffeic acid or chlorogenic acid were also reported as potent inhibitors of ochratoxin A production by several *Aspergillus* species (Palumbo et al., 2007). Similar conclusions were reported for type B trichothecenes production by *F. graminearum*

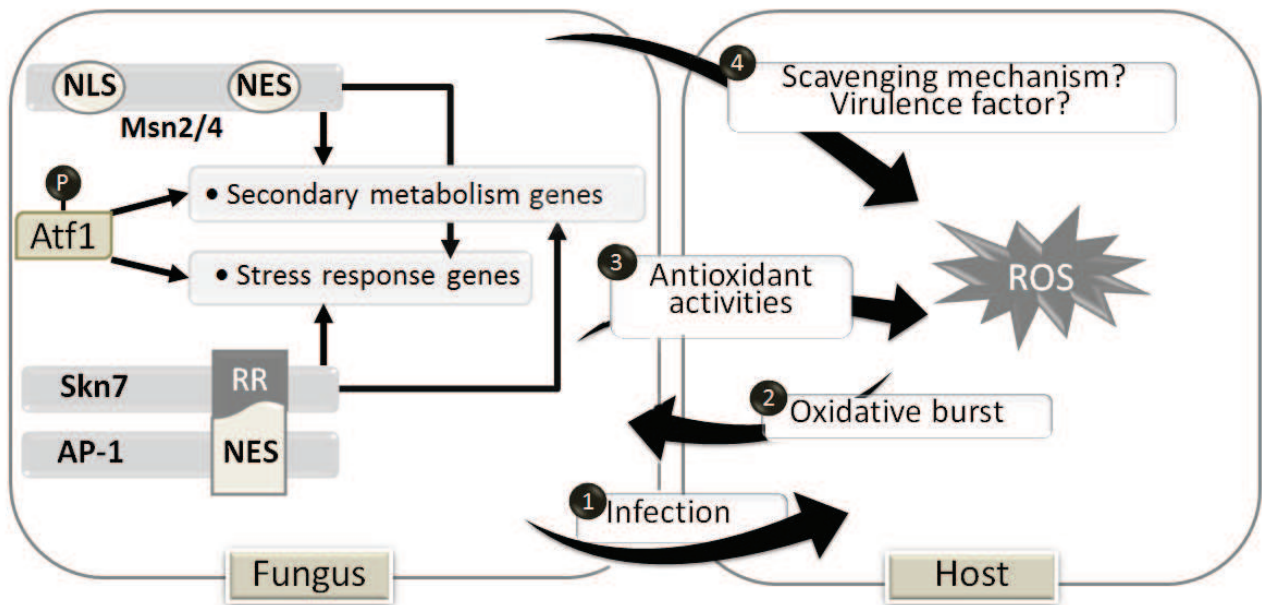


Figure 5: A link between oxidative stress and secondary metabolism. After infection by the fungus (1), the plant produces huge amounts of ROS (oxidative burst) (2) which induce in return a general transcriptional activation of stress response genes (3) and also the genes encoding secondary metabolites biosynthesis (4). Consequently, the fungus can overcome the oxidative burst not only thanks to antioxidant activities but also by producing secondary metabolites acting both as a scavenging mechanism of ROS and as virulence factors.

that was significantly decreased in the presence of phenolic compounds, and more especially ferulic acid (Bakan et al., 2003, Boutigny et al., 2009).

The regulation of fungal secondary metabolism in response to oxidative stress has previously been ascribed to the action of several of the transcription factors described in the second part of this review. In *Aspergillus spp.* this regulation is mediated by *ssrA*, *ap1*, *msnA* or *atfB* (Chang et al., 2011, Hong et al., 2013b, Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008, Roze et al., 2011). According to Walther and Wendland in 2012, *ap1* plays a key role in regulating riboflavin biosynthesis by *A. gossypii*, but also in the production of trichothecenes by *F. graminearum* (Montibus et al., 2013). *Atf1* seems to be involved in the biosynthesis of phytotoxic metabolites in *B. cinerea* (Temme et al., 2012) as well as in the production of type B trichothecenes in *F. graminearum* (Van Nguyen et al., 2013). In the case of fungal pathogens, the overlap between oxidative stress and secondary metabolism can be interpreted as an adaptive mechanism resulting from the molecular dialog between the plant host and the fungus (summarized in Figure 5). At the beginning of the infection process, the fungal pathogen overcomes the plant defensive oxidative burst by activating the expression of antioxidant detoxifying activities. In parallel, this plant oxidative burst can also stimulate the production of secondary metabolites by the pathogen, *e.g.* the production of type B trichothecenes by *F. graminearum* (Ponts et al., 2006). Considering that some of these metabolites, including trichothecenes, act as aggressiveness factors, such effects have important consequences in terms of fungal development and spread of the disease (Colmenares et al., 2002, Proctor et al., 1997, Reverberi et al., 2008). Finally, the biosynthesis of secondary metabolites such as riboflavin could also represent a scavenging mechanism against ROS and therefore play a role in fungal survival (Scott and Eaton, 2008, Walther and Wendland, 2012, Yu and Keller, 2005). Accordingly, we could suppose that the biosynthesis of mycotoxins helps the fungal cell to maintain safe levels of intracellular ROS.

This review emphasizes the probable link between oxidative stress and secondary metabolism in fungi. This relationship has been particularly highlighted in a recent report that strongly suggests that the transcription factors *atfB*, *ssrA*, *ap1* and *msnA* participate in a regulatory network inducing aflatoxin biosynthesis as part of the response to oxidative stress in *A. parasiticus* (Hong et al., 2013b). Nonetheless, despite tremendous progress on the matter, the connection between the regulation of secondary metabolites and oxidative stress is far from being completely elucidated. Nevertheless, such an interaction offers promising prospects for large-scale production of secondary metabolites of industrial interest (*e.g.* antibiotics), or for the control of mycotoxin accumulation in crops. For example, antioxidants such as some phenolics, are generally abundantly present in many plants including cereals at the stage of grain filling corresponding to the moment when mycotoxins accumulate. These antioxidants could negatively interfere with toxin production (Atanasova-Penichon et al., 2012). In the latter case, manipulating the content of these antioxidant compounds in crops may represent a tool to help managing the mycotoxin threat in food and feed. Secondary metabolism and response to oxidative stress are connected, but the relationship remains to be characterized to better understand coping mechanisms in fungi.

Acknowledgements

The authors thank Vance C. Huskins for editing and proofreading this review.

Declaration of Interest

M. Montibus PhD fellowship is funded conjointly by the INRA and the Conseil Régional d'Aquitaine. The authors report no declaration of interest.

VIII- La modulation de la production de TCTB ne peut être déconnectée des voies métaboliques

L'adaptation de *F. graminearum* à son environnement passe par une réorganisation de sa transcription. Cette adaptation à l'environnement serait un évènement moteur dans la régulation du métabolisme secondaire. Ainsi, la réponse à plusieurs changements comme le pH, la lumière ou le stress oxydant a été étudiée chez *F. graminearum* (Merhej et al., 2011b). Il manque cependant des travaux plus globaux pour comprendre totalement les circuits de régulation impliqués en lien avec la production de trichothécènes. Des analyses métabolomiques ont été entreprises chez *F. graminearum* pour comparer une souche sauvage et une souche non productrice de TCTB, délétée pour *Tri5* (Chen et al., 2011). Les résultats indiquaient que la délétion de *Tri5* n'affectait pas seulement la production de TCTB, mais également le métabolisme primaire en incluant une altération du cycle de Krebs (Chen et al., 2011). Une étude plus récente menée dans notre laboratoire, a montré qu'en cultivant *F. graminearum* en présence d'acide caféique, inhibiteur de la production de TCTB, la même observation pouvait être réalisée (Legoahec, 2012).

Les analyses globales transcriptomiques permettent également d'identifier les réseaux de régulation et de mieux comprendre comment les voies de biosynthèse des métabolites secondaires sont régulées. Ces analyses globales ont été utilisées lors de l'interaction hôte/pathogène de *F. graminearum* ; elles portaient cependant principalement sur l'étude du transcriptome des céréales infectées (Boddu et al., 2006, Golkari et al., 2007). Des études plus récentes ont été réalisées chez *F. graminearum* pour étudier le processus d'infection. En 2006, une puce « microarrays » a été mise au point pour permettre de comparer le transcriptome de *F. graminearum* en culture avec différentes sources de nutriments et suite à une croissance sur orge (Güldener et al., 2006). Seulement 514 séquences ont été détectées dans toutes les

conditions de culture (Güldener et al., 2006). Des profils d'expression de gènes ont également été comparés suite à l'infection du blé ou de l'orge (Boddu et al., 2006, Lysoe et al., 2011). Une étude a également été menée pour identifier les cibles des gènes *Tri6* et *Tri10* chez *F. graminearum* (Seong et al., 2009). Ainsi *Tri6* ne régule pas seulement la voie de biosynthèse des trichothécènes mais contrôle également d'autres gènes liés au métabolisme secondaire et à la pathogénicité (Seong et al., 2009). Récemment, une étude RNA-seq a été réalisée sur *F. graminearum* pour améliorer l'annotation du génome et a permis d'identifier 377 gènes qui étaient mal annotés et, par cette technique, près de 80% des gènes prédits étaient détectés (Zhao et al., 2013). Cependant aucune étude n'a à ce jour fait le lien entre réponse au stress oxydant et production de trichothécènes.

Une étude de la réponse au changement de pH a été entreprise dans notre laboratoire par « microarrays » et a permis d'identifier 545 gènes dont l'expression était spécifiquement modulée (Merhej, 2010). L'utilisation des microarrays permet d'analyser un profil de transcripts sur un génome entier dans différentes conditions environnementales (Schena et al., 1995). Cependant, l'approche RNA-seq, récemment développée, présente des avantages par rapport aux techniques de « microarrays ». Cette technique présente une résolution à la paire de base près, ne présente pas de bruit de fond, n'a pas de limite pour la quantification, est très reproductible et ne requiert que peu d'ARN (Wang et al., 2009). Nous avons donc choisi cette technique pour étudier le transcriptome de *F. graminearum* en réponse à des variations redox. Ce point sera développé dans le chapitre 4.

IX- Projet de thèse

Pour ce projet de thèse, nous avons centré nos études sur le champignon *F. graminearum* producteur de trichothécènes de type B. En effet, ces toxines sont les plus fréquemment retrouvées dans les céréales produites à travers le monde suite à l'infection par ce champignon (Goswami and Kistler, 2004). La réglementation du taux de DON dans les céréales destinées à l'alimentation humaine a des conséquences économiques importantes. Comme précédemment décrit, le champignon est vraisemblablement exposé au stress oxydant lors de l'infection de la plante hôte. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la réponse aux variations de stress oxydant et aux mécanismes qui la régulent chez *F. graminearum*. Ces mécanismes, très étudiés chez d'autres organismes comme la levure *S.cerevisiae* ou encore chez les champignons du genre *Aspergillus*, ont été détaillés dans notre revue bibliographique. Cette revue a permis d'illustrer le peu de connaissances actuelles pour *F. graminearum*. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au facteur de transcription de type ap1 impliqué dans la régulation du stress oxydant. D'une part ce facteur, appelé yap1 chez la levure, est parfaitement décrit chez cet organisme, et est étudié chez de nombreux champignons filamenteux. D'autre part, il semble avoir un rôle prépondérant dans la réponse au stress oxydant en tant que senseur. Chez la levure, yap1, en conditions normales, est principalement localisé dans le cytoplasme. Suite à un stress oxydant, ce facteur change de conformation, se retrouve localisé au noyau et va activer l'expression de gènes encodant des activités détoxifiantes (Kuge et al., 2001). Des études chez *Aspergillus spp.* ont démontré un lien entre l'homologue du facteur yap1, la réponse au stress oxydant et la production de métabolites secondaires (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). Nous avons donc dans cette thèse étudié le rôle du facteur de type ap1 chez *F. graminearum*.

Dans le premier chapitre, une étude portant sur le rôle de l'homologue de *yap1* chez *F.graminearum*, nommé *Fgap1*, a été réalisée par une approche de génétique avec la création de souches mutantes affectées pour ce gène. L'implication de *Fgap1* dans la régulation de la production de toxines chez une souche DON/ADON et la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la détoxification ont été analysées en réponse à un stress oxydant. Le pouvoir pathogène de ces mutants a également été testé.

Dans un second chapitre, une étude comparative sur l'effet de *Fgap1* entre une souche de chémotype DON/ADON et une souche de chémotype NIV/FX a été entreprise. L'effet de pro-oxydants sur la production de toxines et l'activité détoxifiante des souches ont été analysées.

Dans le troisième chapitre, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de *Fgap1* dans la réponse à différentes molécules connues pour leurs propriétés antioxydantes. L'effet de l'acide caféique et de l'acide férulique, composés phénoliques majoritairement présents dans les céréales, a été étudié.

Dans un dernier chapitre, nous avons élargi notre étude en utilisant une analyse transcriptomique par une approche RNAseq, sur le génome complet de la souche sauvage et des mutants de *Fgap1* placés dans différentes conditions redox. Identifier les réseaux de régulation impliqués dans la réponse aux variations redox était l'objectif principal de cette approche.

.

Références

- ABEGG, M. A., ALABARSE, P. V. G., CASANOVA, A., HOSCHEID, J., SALOMON, T. B., HACKENHAAR, F. S., MEDEIROS, T. M. & BENFATO, M. S. 2010. Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia*, 170, 11-20.
- AFSSA 2009. *Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*. .
- ALARCO, A.-M., BALAN, I., TALIBI, D., MAINVILLE, N. & RAYMOND, M. 1997. AP1-mediated Multidrug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* Requires FLR1 Encoding a Transporter of the Major Facilitator Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19304-19313.
- ALARCO, A. M. & RAYMOND, M. 1999. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 181, 700-8.
- ALASSANE-KPEMBI, I., KOLF-CLAUW, M., GAUTHIER, T., ABRAMI, R., ABIOLA, F. A., OSWALD, I. P. & PUEL, O. 2013. New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272, 191-198.
- ALEXANDER, N. J., MCCORMICK, S. P., LARSON, T. M. & JURGENSON, J. E. 2004. Expression of Tri15 in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics*, 45, 157-162.
- ALEXANDER, N. J., MCCORMICK, S. P., WAALWIJK, C., VAN DER LEE, T. & PROCTOR, R. H. 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 485-495.
- ALEXANDER, N. J., PROCTOR, R. H. & MCCORMICK, S. P. 2009. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28, 198-215.
- ANDERSON, D. W., BLACK, R. M., LEE, C. G., POTTAGE, C., RICKARD, R. L., SANDFORD, M. S., WEBBER, T. D. & WILLIAMS, N. E. 1989. Structure-activity studies of trichothecenes: cytotoxicity of analogues and reaction products derived from T-2 toxin and neosolaniol. *J Med Chem*, 32, 555-62.
- 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.
- ATANASOVA-PENICHON, V., PONS, S., PINSON-GADAIS, L., PICOT, A., MARCHEGAY, G., BONNIN-VERDAL, M.-N., DUCOS, C., BARREAU, C., ROUCOLLE, J., SEHABIAGUE, P., CAROLO, P. & RICHARD-FORGET, F. 2012. Chlorogenic Acid and Maize Ear Rot Resistance: A Dynamic Study Investigating *Fusarium graminearum* Development, Deoxynivalenol Production, and Phenolic Acid Accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1605-1616.
- BAKAN, B., BILY, A. C., MELCION, D., CAHAGNIER, B., REGNAULT-ROGER, C., PHILOGÈNE, 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.
- BALZER, A., TARDIEU, D. & BAILLY, J. D. 2004. Les trichothécènes: nature des toxines, présence dans les aliments et moyens de lutte. *revue Med.Vet*, 155, 299 - 314.
- 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.

- BECKMAN, K. B. & AMES, B. N. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78, 547-81.
- BENNETT, J. W. & KLICH, M. 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16, 497-516.
- BERMINGHAM-MCDONOGH, O., GRALLA, E. B. & SELVERSTONE VALENTINE, J. 1988. *The copper, zinc-superoxide dismutase gene of Saccharomyces cerevisiae: cloning, sequencing, and biological activity*, Washington, DC, ETATS-UNIS, National Academy of Sciences.
- BERTHILLER, F., LEMMENS, M., WERNER, U., KRSKA, R., HAUSER, M. T., ADAM, G. & SCHUHMACHER, R. 2007. Short review: Metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone in plants. *Mycotoxin Res*, 23, 68-72.
- BETINA, V. 1989. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. *Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects*. Amsterdam Netherlands: Elsevier.
- 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.
- BLEE, E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci*, 7, 315-22.
- BLEE, K. A., YANG, K. Y. & ANDERSON, A. J. 2004. Activation of defense pathways: synergism between reactive oxygen species and salicylic acid and consideration of field applicability. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 203-212.
- BODDU, J., CHO, S., KRUGER, W. M. & MUEHLBAUER, G. J. 2006. Transcriptome analysis of the barley-Fusarium graminearum interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 407-17.
- BOENISCH, M. & SCHAFER, W. 2011. Fusarium graminearum forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology*, 11, 110.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. & DIEFENBACH, A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*, 12, 64-76.
- 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.
- BOURDAIS, A., BIDARD, F., ZICKLER, D., BERTEAUX-LECELLIER, V., SILAR, P. & ESPAGNE, E. 2012. Wood utilization is dependent on catalase activities in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Plos One*, 7.
- BOUTIGNY, A. L., ATANASOVA-PENICHON, V., BENET, M., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2010. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit Fusarium culmorum trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *Eur J Plant Pathol*, 127, 275-286.
- BOUTIGNY, A. L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M. N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in Fusarium liquid cultures. *Mycol Res*, 113, 746-53.
- BRAKHAGE, A. A., BRUNS, S., THYWISSEN, A., ZIPFEL, P. F. & BEHNSEN, J. 2010. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 409-415.
- BREWSTER, J. L., DE VALOIR, T., DWYER, N. D., WINTER, E. & GUSTIN, M. C. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259, 1760-3.

- BROWN, N. A., URBAN, M., VAN DE MEENE, A. M. & HAMMOND-KOSACK, K. E. 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biol*, 114, 555-71.
- BUERSTMAYR, H., B., S., HARTL, L., GRIESSER, M., ANGERER, N. & LENGAUER, D. 2003. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Springer-Verlag*, 107, 503-8.
- BURNS, C., GERAGHTY, R., NEVILLE, C., MURPHY, A., KAVANAGH, K. & DOYLE, S. 2005. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 319-327.
- CAO, C. W., LIU, W. & LI, R. Y. 2009. *Penicillium marneffei* SKN7, a Novel Gene, could Complement the Hypersensitivity of *S. cerevisiae* skn7 Disruptant Strain to Oxidative Stress. *Mycopathologia*, 168, 23-30.
- CHAMBERGO, F. S., VALENCIA, E. Y., FERREIRA-JUNIOR, J. R., CAMILO, C. M. & CAMPANA, P. T. 2012. Conformational stability of recombinant manganese superoxide dismutase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Int J Biol Macromol*, 50, 19-24.
- 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.
- CHANG, P.-K., SCHARFENSTEIN, L. L., LUO, M., MAHONEY, N., MOLYNEUX, R. J., YU, J., BROWN, R. L. & CAMPBELL, B. C. 2011. Loss of *msnA*, a Putative Stress Regulatory Gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* Increased Production of Conidia, Aflatoxins and Kojic Acid. *Toxins*, 3, 82-104.
- CHARY, P., DILLON, D., SCHROEDER, A. L. & NATVIG, D. O. 1994. Superoxide dismutase (*sod-1*) null mutants of *Neurospora crassa*: oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to mutagens. *Genetics*, 137, 723-30.
- CHARY, P. & NATVIG, D. O. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *Journal of bacteriology*, 171, 2646-52.
- CHAUHAN, N., LATGE, J.-P. & CALDERONE, R. 2006. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Micro*, 4, 435-444.
- CHEN, F., ZHANG, J., SONG, X., YANG, J., LI, H., TANG, H. & LIAO, Y.-C. 2011. Combined Metabonomic and Quantitative Real-Time PCR Analyses Reveal Systems Metabolic Changes of *Fusarium graminearum* Induced by *Tri5* Gene Deletion. *Journal of Proteome Research*, 10, 2273-2285.
- CHOI, J. H., LOU, W. & VANCURA, A. 1998. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273, 29915-22.
- CHRIST, D. S., GODECKE, R., VON TIEDEMANN, A. & VARRELMANN, M. 2011. Pathogenicity, symptom development, and mycotoxin formation in wheat by *Fusarium* species frequently isolated from sugar beet. *Phytopathology*, 101, 1338-45.
- CHUNG, K.-R. 2012. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. *Scientifica*, 2012, 17.
- COENJAERTS, F. E. J., HOEPELMAN, A. I. M., SCHARRINGA, J., AARTS, M., ELLERBROEK, P. M., BEVAART, L., VAN STRIJP, J. A. G. & JANBON, G. 2006. The *Skn7* response regulator of *Cryptococcus neoformans* is involved in oxidative stress signalling and augments intracellular survival in endothelium. *Fems Yeast Research*, 6, 652-661.

- COLLINSON, L. P. & DAWES, I. W. 1995. Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene*, 156, 123-7.
- COLMENARES, A. J., ALEU, J., DURAN-PATRON, R., COLLADO, I. G. & HERNANDEZ-GALAN, R. 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *J Chem Ecol*, 28, 997-1005.
- CROMEY, M. G., PARKES, R. A. & FRASER, P. M. 2001. *Fusarium* levels in grain harvested from New Zealand wheat and barley crops in 2000. *New Zealand Plant Protection Volume 54, 2001. Proceedings of a conference, Quality Hotel, Palmerston North, New Zealand, 14-16 August 2001*.
- DAVIES, J. M., LOWRY, C. V. & DAVIES, K. J. 1995. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Archives of biochemistry and biophysics*, 317, 1-6.
- DAVIES, P. J. 2004. Plant Hormones. *Book*.
- DELAUNAY, A., PFLIEGER, D., BARRAULT, M.-B., VINH, J. & TOLEDANO, M. B. 2002. A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation. *Cell*, 111, 471-481.
- DESAI, P. R., THAKUR, A., GANGULI, D., PAUL, S., MORSCHHÄUSER, J. & BACHHAWAT, A. K. 2011. Glutathione Utilization by *Candida albicans* Requires a Functional Glutathione Degradation (DUG) Pathway and OPT7, an Unusual Member of the Oligopeptide Transporter Family. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 41183-41194.
- DESJARDINS, A. E. & HOHN, T. M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 147-152.
- DIAZ, A., RANGEL, P., MONTES DE OCA, Y., LLEDIAS, F. & HANSBERG, W. 2001. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free radical biology & medicine*, 31, 1323-33.
- 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.
- DOLASHKI, A., ABRASHEV, R., STEVANOVIC, S., STEFANOVA, L., ALI, S. A., VELKOVA, L., HRISTOVA, R., ANGELOVA, M., VOELTER, W., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J. & DOLASHKA-ANGELOVA, P. 2008. Biochemical properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from fungal strain *Aspergillus niger* 26. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 71, 975-83.
- DYER, R. B., PLATTNER, R. D., KENDRA, D. F. & BROWN, D. W. 2005. *Fusarium graminearum* TRI14 Is Required for High Virulence and DON Production on Wheat but Not for DON Synthesis in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9281-9287.
- ERIKSEN, G. S. 2003. Metabolism and toxicity of trichothecenes. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae - Agraria*. Alnarp Sweden: Sveriges Lantbruksuniversitet (Swedish University of Agricultural Sciences).
- 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.
- ESHAGHI, M., LEE, J. H., ZHU, L., POON, S. Y., LI, J. T., CHO, K. H., CHU, Z. Q., KARUTURI, R. K. M. & LIU, J. 2010. Genomic Binding Profiling of the Fission Yeast Stress-Activated MAPK Sty1 and the bZIP Transcriptional Activator Atf1 in Response to H₂O₂. *Plos One*, 5.
- ESTRUCH, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS microbiology reviews*, 24, 469-86.

- EUDES, F., COMEAU, A., RIOUX, S. & COLLIN, J. 2000. Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with *Fusarium* in wheat head blight. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 286-292.
- FANG, G. C., HANAU, R. M. & VAILLANCOURT, L. J. 2002. The SOD2 gene, encoding a manganese-type superoxide dismutase, is up-regulated during conidiogenesis in the plant-pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 36, 155-65.
- FASSLER, J. S. & WEST, A. H. 2011. Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryotic Cell*, 10, 156-67.
- FERRARI, C. K. B., SOUTO, P. C. S., FRANÇA, E. L. & HONORIO-FRANÇA, A. C. 2011. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: From effective defense to immunity evasion mechanisms. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 59, 441-448.
- FRASER, J. A., DAVIS, M. A. & HYNES, M. J. 2002. A gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. *Applied and environmental microbiology*, 68, 2802-8.
- GARDINER, D. M., KAZAN, K. & MANNERS, J. M. 2009a. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol*, 46, 604-613.
- GARDINER, D. M., KAZAN, K., PRAUD, S., TORNEY, F. J., RUSU, A. & MANNERS, J. M. 2010. Early activation of wheat polyamine biosynthesis during *Fusarium* head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. *BMC Plant Biol*, 10, 289.
- GARDINER, D. M., OSBORNE, S., KAZAN, K. & MANNERS, J. M. 2009b. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology*.
- GARRE, V., MÜLLER, U. & TUDZYNSKI, P. 1998. Cloning, Characterization, and Targeted Disruption of *cpcat1*, Coding for an in Planta Secreted Catalase of *Claviceps purpurea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 772-783.
- GOLKARI, S., GILBERT, J., PRASHAR, S. & PROCUNIER, J. D. 2007. Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnol J*, 5, 38-49.
- GORNER, W., DURCHSCHLAG, E., MARTINEZ-PASTOR, M. T., ESTRUCH, F., AMMERER, G., HAMILTON, B., RUIS, H. & SCHULLER, C. 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & development*, 12, 586-97.
- GORNER, W., DURCHSCHLAG, E., WOLF, J., BROWN, E. L., AMMERER, G., RUIS, H. & SCHULLER, C. 2002. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *The EMBO journal*, 21, 135-44.
- GOSWAMI, R. S. & KISTLER, H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- GOVRIN, E. M. & LEVINE, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology : CB*, 10, 751-7.
- GRALLA, E. B., THIELE, D. J., SILAR, P. & VALENTINE, J. S. 1991. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 8558-62.

- GUIDOT, D. M., MCCORD, J. M., WRIGHT, R. M. & REPINE, J. E. 1993. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 268, 26699-703.
- GÜLDENER, U., SEONG, K.-Y., BODDU, J., CHO, S., TRAIL, F., XU, J.-R., ADAM, G., MEWES, H.-W., MUEHLBAUER, G. J. & KISTLER, H. C. 2006. Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genetics and Biology*, 43, 316-325.
- GULSHAN, K., ROVINSKY, S. A., COLEMAN, S. T. & MOYE-ROWLEY, W. S. 2005. Oxidant-specific Folding of Yap1p Regulates Both Transcriptional Activation and Nuclear Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 40524-40533.
- GUO, M., CHEN, Y., DU, Y., DONG, Y., GUO, W., ZHAI, S., ZHANG, H., DONG, S., ZHANG, Z., WANG, Y., WANG, P. & ZHENG, X. 2011. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens*, 7, e1001302.
- GUO, M., GUO, W., CHEN, Y., DONG, S., ZHANG, X., ZHANG, H., SONG, W., WANG, W., WANG, Q., LV, R., ZHANG, Z., WANG, Y. & ZHENG, X. 2010. The basic leucine zipper transcription factor Moatf1 mediates oxidative stress responses and is necessary for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 23, 1053-68.
- HAGIWARA, D., MIZUNO, T. & ABE, K. 2011. Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. *Current genetics*, 57, 103-14.
- HALLIWELL, B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & aging*, 18, 685-716.
- HAMPTON, M. B., KETTLE, A. J. & WINTERBOURN, C. C. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92, 3007-17.
- HANSBERG, W., SALAS-LIZANA, R. & DOMINGUEZ, L. 2012. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. *Arch Biochem Biophys*, 525, 170-80.
- HARRIS, E. D. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6, 2675-83.
- HASAN, R., LEROY, C., ISNARD, A.-D., LABARRE, J., BOY-MARCOTTE, E. & TOLEDANO, M. B. 2002. The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Molecular Microbiology*, 45, 233-241.
- HASENBERG, M., BEHNSEN, J., KRAPPMANN, S., BRAKHAGE, A. & GUNZER, M. 2011. Phagocyte responses towards *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 436-444.
- HELLER, J. & TUDZYNSKI, P. 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: Signaling, development, and disease. *Annual review of phytopathology* [Online], 49.
- HISADA, H., HATA, Y., KAWATO, A., ABE, Y. & AKITA, O. 2005. Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 562-8.
- HONG, S. Y., ROZE, L. V. & LINZ, J. E. 2013a. Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins (Basel)*, 5, 683-702.
- HONG, S. Y., ROZE, L. V., WEE, J. & LINZ, J. E. 2013b. Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *Microbiologyopen*, 2, 144-60.

- ILGEN, P., HADELER, B., MAIER, F. J. & SCHÄFER, W. 2009. Developing Kernel and Rachis Node Induce the Trichothecene Pathway of *Fusarium graminearum* During Wheat Head Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 899-908.
- 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, 351-62.
- JAMIESON, D. J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 1511-27.
- JANSEN, C., VON WETTSTEIN, D., SCHAFFER, 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.
- JAYASHREE, T. & SUBRAMANYAM, C. 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free radical biology & medicine*, 29, 981-5.
- JIAO, F., KAWAKAMI, A. & NAKAJIMA, T. 2008. Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett*, 285, 212-9.
- KACHROO, A., HE, Z., PATKAR, R., ZHU, Q., ZHONG, J., LI, D., RONALD, P., LAMB, C. & CHATTOO, B. B. 2003. Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic research*, 12, 577-86.
- KANDROR, O., BRETSCHNEIDER, N., KREYDIN, E., CAVALIERI, D. & GOLDBERG, A. L. 2004. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Molecular cell*, 13, 771-81.
- KAWASAKI, L. & AGUIRRE, J. 2001. Multiple Catalase Genes Are Differentially Regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of bacteriology*, 183, 1434-1440.
- KAWASAKI, L., WYSONG, D., DIAMOND, R. & AGUIRRE, J. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *Journal of bacteriology*, 179, 3284-92.
- KETELA, T., BROWN, J. L., STEWART, R. C. & BUSSEY, H. 1998. Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Molecular & general genetics : MGG*, 259, 372-8.
- KIM, J., MAHONEY, N., CHAN, K., MOLYNEUX, R. & CAMPBELL, B. 2006. Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 735-739.
- 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. *J Biol Chem*, 273, 1654-61.
- KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S. & FUJIMURA, M. 2007. Molecular and genetic studies of *fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 2105-23.
- KLOTZ, L. O. 2002. Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biological chemistry*, 383, 443-56.
- KONO, Y., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, M. & KOMADA, H. 1995. Alterations in superoxide dismutase and catalase in *Fusarium oxysporum* during starvation-induced differentiation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1268, 35-40.

- KREINER, M., M., H. L. & BRIAN, M. 2002. *Oxidative stress response of a recombinant Aspergillus niger to exogenous menadione and H₂O₂ addition*, Amsterdam, PAYS-BAS, Elsevier.
- KUGE, S., ARITA, M., MURAYAMA, A., MAETA, K., IZAWA, S., INOUE, Y. & NOMOTO, A. 2001. Regulation of the Yeast Yap1p Nuclear Export Signal Is Mediated by Redox Signal-Induced Reversible Disulfide Bond Formation. *Molecular and cellular biology*, 21, 6139-6150.
- KUGE, S., JONES, N. & NOMOTO, A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO journal*, 16, 1710-20.
- KVIETYS, P. R. & GRANGER, D. N. 2012. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free radical biology & medicine*, 52, 556-92.
- LAMARRE, C., IBRAHIM-GRANET, O., DU, C., CALDERONE, R. & LATGÉ, J.-P. 2007. Characterization of the SKN7 ortholog of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 682-690.
- LAMBETH, J. D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews. Immunology*, 4, 181-9.
- LARA-ROJAS, F., SANCHEZ, O., KAWASAKI, L. & AGUIRRE, J. 2011. *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Molecular Microbiology*, 80, 436-454.
- LAWRENCE, C. L., MAEKAWA, H., WORTHINGTON, J. L., REITER, W., WILKINSON, C. R. M. & JONES, N. 2007. Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 5160-5170.
- LEAL, S. M., VAREECHON, C., COWDEN, S., COBB, B. A., LATG, XE, JEAN-PAUL, MOMANY, M. & PEARLMAN, E. 2012. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *The Journal of clinical investigation*, 122, 2482-2498.
- LEE, J., GODON, C., LAGNIEL, G., SPECTOR, D., GARIN, J., LABARRE, J. & TOLEDANO, M. B. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 274, 16040-6.
- LEE, P., CHO, B. R., JOO, H. S. & HAHN, J. S. 2008. Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Molecular Microbiology*, 70, 882-895.
- LEE, P., PAIK, S. M., SHIN, C. S., HUH, W. K. & HAHN, J. S. 2011. Regulation of yeast Yak1 kinase by PKA and autophosphorylation-dependent 14-3-3 binding. *Mol Microbiol*, 79, 633-46.
- 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.
- LEGOAHEC, L. 2012. Apport d'une approche métabolomique pour l'étude de la régulation de la toxino-génèse chez *F. graminearum*. *Rapport Stage de Master 2*.
- LEONARD, K. J. & BUSHNELL, W. R. 2003. *Fusarium head blight of wheat and barley*, St. Paul, Minn., APS Press.
- LESLIE, J. F. & SUMMERELL, B. A. 2005. The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell Publishing*.
- LEV, S., HADAR, R., AMEDEO, P., BAKER, S. E., YODER, O. C. & HORWITZ, B. A. 2005. Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryotic cell*, 4, 443-54.

- LI, G. & YEN, Y. 2008. Jasmonate and Ethylene Signaling Pathway May Mediate Fusarium Head Blight Resistance in Wheat All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. Permission for printing and for reprinting the material contained herein has been obtained by the publisher. *Crop Sci.*, 48, 1888-1896.
- LI, Q., MCNEIL, B. & HARVEY, L. M. 2008. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radical Biology and Medicine*, 44, 394-402.
- LIMA, O. C., LARCHER, G., VANDEPUTTE, P., LEBOUIL, A., CHABASSE, D., SIMONEAU, P. & BOUCHARA, J. P. 2007. Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu,Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. *Microbes Infect*, 9, 558-65.
- LIU, X., ZHANG, X. & ZHANG, Z. 2010. Cu,Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 584, 1245-1250.
- LONG, L. K., YANG, J., AN, Y. & LIU, G. 2012. Disruption of a glutathione reductase encoding gene in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of its growth, cephalosporin production and antioxidative ability which is recovered by exogenous methionine. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 49, 114-22.
- LUSHCHAK, V. I. & GOSPODARYOV, D. V. 2005. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell biology international*, 29, 187-92.
- LYSOE, E., SEONG, K. Y. & KISTLER, H. C. 2011. The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Mol Plant Microbe Interact*, 24, 995-1000.
- 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.
- MALAGNAC, F., KLAPHOLZ, B. & SILAR, P. 2007. PaTrx1 and PaTrx3, two cytosolic thioredoxins of the filamentous ascomycete *Podospora anserina* involved in sexual development and cell degeneration. *Eukaryotic cell*, 6, 2323-31.
- MARKELL, S. G. & FRANCL, L. J. 2003. *Fusarium* Head Blight Inoculum: Species Prevalence and *Gibberella zeae* Spore Type. *Plant Disease*, 87, 814-820.
- MARTÍNEZ-PASTOR, M. T., MARCHLER, G., SCHÜLLER, C., MARCHLER-BAUER, A., RUIS, H. & ESTRUCH, F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO Journal*, 15, 2227-2235.
- MCCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3, 802-814.
- MCMULLEN, M., JONES, R. & GALLENBERG, D. 1997. Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease*, 81, 1340-1348.
- MERHEJ, J. 2010. Mécanismes moléculaires contrôlant la biosynthèse de mycotoxines par le champignon micromycète *Fusarium graminearum*. . *Thèse Université Bordeaux I*.

- MERHEJ, J., BOUTIGNY, A. L., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2010. Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 1-8.
- MERHEJ, J., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2011a. The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 275-284.
- MERHEJ, J., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2011b. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Applied microbiology and biotechnology*, 91, 519-28.
- MERHEJ, J., URBAN, M., DUFRESNE, M., HAMMOND-KOSACK, K. E., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2012. The velvet gene, FgVel1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 363-374.
- MILLAR, J. B., BUCK, V. & WILKINSON, M. G. 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & development*, 9, 2117-30.
- MONTIBUS, M., PONTS, N., ZEHAOU, E., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013. Fgap1-mediated response to oxidative stress in trichothecene-producing *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Reports*, 60, 410.
- MORGAN, B. A., BANKS, G. R., TOONE, W. M., RAITT, D., KUGE, S. & JOHNSTON, L. H. 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 16, 1035-44.
- MOTOYAMA, T., OCHIAI, N., MORITA, M., IIDA, Y., USAMI, R. & KUDO, T. 2008. Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity. *Current genetics*, 54, 185-95.
- MOYE-ROWLEY, W. S. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic cell*, 2, 381-9.
- MOYE-ROWLEY, W. S., HARSHMAN, K. D. & PARKER, C. S. 1989. Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes & development*, 3, 283-92.
- MULFORD, K. E. & FASSLER, J. S. 2011. Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic Cell*, 10, 761-9.
- MULLER, E. G. 1996. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Molecular Biology of the Cell*, 7, 1805-13.
- NANDA, A. K., ANDRIO, E., MARINO, D., PAULY, N. & DUNAND, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of integrative plant biology*, 52, 195-204.
- NATHUES, E., JOSHI, S., TENBERGE, K. B., VON DEN DRIESCH, M., OESER, B., BAUMER, N., MIHLAN, M. & TUDZYNSKI, P. 2004. CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 17, 383-93.
- NAVARRO, R. E., STRINGER, M. A., HANSBERG, W., TIMBERLAKE, W. E. & AGUIRRE, J. 1996. catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Current genetics*, 29, 352-9.

- 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 Manag Sci*, 62, 775-84.
- NGUYEN, L. N., BORMANN, J., LE, G. T. T., STÄRKEL, C., OLSSON, S., NOSANCHUK, J. D., GIESE, H. & SCHÄFER, W. 2011. Autophagy-related lipase FgATG15 of *Fusarium graminearum* is important for lipid turnover and plant infection. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 217-224.
- NICHOLLS, S., STRAFFON, M., ENJALBERT, B., NANTEL, A., MACASKILL, S., WHITEWAY, M. & BROWN, A. J. P. 2004. Msn2- and Msn4-Like Transcription Factors Play No Obvious Roles in the Stress Responses of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 3, 1111-1123.
- OBeregger, H., ZADRA, I., SCHOESER, M. & HAAS, H. 2000. Iron starvation leads to increased expression of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Aspergillus*. *FEBS letters*, 485, 113-6.
- OUYANG, X., TRAN, Q. T., GOODWIN, S., WIBLE, R. S., SUTTER, C. H. & SUTTER, T. R. 2011. Yap1 activation by H₂O₂ or thiol-reactive chemicals elicits distinct adaptive gene responses. *Free radical biology & medicine*, 50, 1-13.
- PALUMBO, J. D., O'KEEFFE, T. L. & MAHONEY, N. E. 2007. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164, 241-8.
- PARRY, D. W., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- PESTKA, J. J. 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol*, 84, 663-79.
- 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.
- POLLEY, R. W. & TURNER, J. A. 1995. Survey of stem base diseases and *Fusarium* ear diseases in winter wheat in England, Wales and Scotland, 1989-1990. *Annals of Applied Biology*, 126, 45-59.
- PONTS, N., COUEDELO, L., PINSON-GADAIS, L., VERDAL-BONNIN, M. N., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2009. *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent. *FEMS microbiology letters*, 293, 255-62.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BARREAU, C., RICHARD-FORGET, F. & OUELLET, T. 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS letters*, 581, 443-7.
- 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.
- PROCTOR, R. H., HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 593-601.
- PROCTOR, R. H., HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1997. Restoration of wild-type virulence to Tri5 disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology*, 143 (Pt 8), 2583-91.

- PUSZTAHELYI, T., KLEMENT, E., SZAJLI, E., KLEM, J., MISKEI, M., KARANYI, Z., EMRI, T., KOVACS, S., OROSZ, G., KOVACS, K. L., MEDZIHRADESKY, K. F., PRADE, R. A. & POCSI, I. 2011. Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 92-103.
- QI, M. & ELION, E. A. 2005. MAP kinase pathways. *J Cell Sci*, 118, 3569-72.
- QIAO, J., LIU, W. & LI, R. 2010. Truncated Afyap1 Attenuates Antifungal Susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to Voriconazole and Confers Adaptation of the Fungus to Oxidative Stress. *Mycopathologia* [Online], 170.
- RAITT, D. C., JOHNSON, A. L., ERKINE, A. M., MAKINO, K., MORGAN, B., GROSS, D. S. & JOHNSTON, L. H. 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Molecular biology of the cell*, 11, 2335-47.
- RAMSDALE, M., SELWAY, L., STEAD, D., WALKER, J., YIN, Z. K., NICHOLLS, S. M., CROWE, J., SHEILS, E. M. & BROWN, A. J. P. 2008. MNL1 Regulates Weak Acid-induced Stress Responses of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 4393-4403.
- REVERBERI, M., FABBRI, A. A., ZJALIC, S., RICELLI, A., PUNELLI, F. & FANELLI, C. 2005. Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Applied microbiology and biotechnology*, 69, 207-15.
- REVERBERI, M., GAZZETTI, K., PUNELLI, F., SCARPARI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., FABBRI, A. & FANELLI, C. 2012. Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 1293-1304.
- REVERBERI, M., RICELLI, A., ZJALIC, S., FABBRI, A. A. & FANELLI, C. 2010. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 899-911.
- REVERBERI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., PUNELLI, F., CAMERA, E., FABBRI, C., PICARDO, M., FANELLI, C. & FABBRI, A. A. 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryotic cell*, 7, 988-1000.
- ROBINSON, M. J. & COBB, M. H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 180-6.
- ROCHA, O., ANSARI, K. & DOOHAN, F. M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22, 369-378.
- RODRIGUES-POUSADA, C., MENEZES, R. A. & PIMENTEL, C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*, 27, 245-258.
- RODRIGUES-POUSADA, C. A., NEVITT, T., MENEZES, R., AZEVEDO, D., PEREIRA, J. & AMARAL, C. 2004. Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS letters*, 567, 80-85.
- ROETZER, A., GREGORI, C., JENNINGS, A. M., QUINTIN, J., FERRANDON, D., BUTLER, G., KUCHLER, K., AMMERER, G. & SCHULLER, C. 2008. *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Molecular Microbiology*, 69, 603-620.
- ROETZER, A., KLOPF, E., GRATZ, N., MARCET-HOUBEN, M., HILLER, E., RUPP, S., GABALDÓN, T., KOVARIK, P. & SCHÜLLER, C. 2011. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS letters*, 585, 319-327.

- ROLKE, Y., LIU, S., QUIDDE, T., WILLIAMSON, B., SCHOUTEN, A., WELTRING, K.-M., SIEWERS, V., TENBERGE, K. B., TUDZYNSKI, B. & TUDZYNSKI, P. 2004. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology*, 5, 17-27.
- ROZE, L. V., CHANDA, A., WEE, J., AWAD, D. & LINZ, J. E. 2011. Stress-related Transcription Factor AtfB Integrates Secondary Metabolism with Oxidative Stress Response in *Aspergilli*. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 35137-35148.
- SAIJO, T., MIYAZAKI, T., IZUMIKAWA, K., MIHARA, T., TAKAZONO, T., KOSAI, K., IMAMURA, Y., SEKI, M., KAKEYA, H., YAMAMOTO, Y., YANAGIHARA, K. & KOHNO, S. 2010. Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, 169, 81-90.
- SAKAMOTO, K., ARIMA, T.-H., IWASHITA, K., YAMADA, O., GOMI, K. & AKITA, O. 2008. *Aspergillus oryzae* atfB encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 922-932.
- SAKAMOTO, K., IWASHITA, K., YAMADA, O., KOBAYASHI, K., MIZUNO, A., AKITA, O., MIKAMI, S., SHIMOI, H. & GOMI, K. 2009. *Aspergillus oryzae* atfA controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 887-897.
- SANSO, M., GOGOL, M., AYTE, J., SEIDEL, C. & HIDALGO, E. 2008. Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryotic cell*, 7, 826-35.
- SATO, I., SHIMATANI, K., FUJITA, K., ABE, T., SHIMIZU, M., FUJII, T., HOSHINO, T. & TAKAYA, N. 2011. Glutathione Reductase/Glutathione Is Responsible for Cytotoxic Elemental Sulfur Tolerance via Polysulfide Shuttle in Fungi. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 20283-20291.
- SCHAAFSMA, A. W. & HOOKER, D. C. 2006. *Applications in forecasting deoxynivalenol in wheat using DONcast*.
- SCHACHERMAYR, G. & FRIED, P. M. 2000. Fusarioses et mycotoxines: le tour du problème. *Revue suisse d'Agriculture*, 32, 241-246.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W. & BROWN, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467-70.
- SCHMIDT, M., AKASAKA, K., MESSERLY, J. T. & BOYER, M. P. 2012. Role of Hog1, Tps1 and Sod1 in boric acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 158, 2667-78.
- SCHMITT, A. P. & MCENTEE, K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 5777-82.
- SCHOUTEN, A., TENBERGE, K. B., VERMEER, J., STEWART, J., WAGEMAKERS, L., WILLIAMSON, B. & VAN KAN, J. A. L. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 3, 227-238.
- SCOTT, B. & EATON, C. J. 2008. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 488-493.
- SEHATI, S., CLEMENT, M. H., MARTINS, J., XU, L., LONGO, V. D., VALENTINE, J. S. & GRALLA, E. B. 2011. Metabolic alterations in yeast lacking copper-zinc superoxide dismutase. *Free radical biology & medicine*, 50, 1591-8.

- SEONG, K. Y., PASQUALI, M., ZHOU, X., SONG, J., HILBURN, K., MCCORMICK, S., DONG, Y., XU, J. R. & KISTLER, H. C. 2009. Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis. *Mol Microbiol*, 72, 354-67.
- SHETTY, N., JØRGENSEN, H., JENSEN, J., COLLINGE, D. & SHETTY, H. 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 267-280.
- SHIN, Y. H., PARK, E. H., FUCHS, J. A. & LIM, C. J. 2002. Characterization, expression and regulation of a third gene encoding glutathione S-transferase from the fission yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 1577, 164-70.
- SINGH, P., CHAUHAN, N., GHOSH, A., DIXON, F. & CALDERONE, R. 2004. SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infection and immunity*, 72, 2390-4.
- 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.
- SMITH, A., WARD, M. P. & GARRETT, S. 1998. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *The EMBO journal*, 17, 3556-64.
- SMITH, J. L., DE MORAES, C. M. & MESCHER, M. C. 2009. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science*, 65, 497-503.
- STACK, R. W. 2000. Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. *Plant Health Progress*
- STEPHEN, D. W. S. & JAMIESON, D. J. 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 141, 207-212.
- 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.
- SUZUKI, T., YOKOYAMA, A., TSUJI, T., IKESHIMA, E., NAKASHIMA, K., IKUSHIMA, S., KOBAYASHI, C. & YOSHIDA, S. 2011. Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112, 107-113.
- SWEENEY, M. J. & DOBSON, A. D. W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *Fems Microbiology Letters*, 175, 149-163.
- TAKAHASHI, M., YAMASHITA, K., SHIOZAWA, A., ICHIISHI, A., FUKUMORI, F. & FUJIMURA, M. 2010. An AP-1-Like Transcription Factor, NAP-1, Regulates Expression of the Glutathione S-Transferase and NADH:Flavin Oxidoreductase Genes in *Neurospora crassa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74, 746-752.
- TAKEDA, T., TODA, T., KOMINAMI, K. I., KOHNOSU, A., YANAGIDA, M. & JONES, N. 1995. *Schizosaccharomyces pombe* atf1(+) encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *Embo Journal*, 14, 6193-6208.
- TEMME, N., OESER, B., MASSAROLI, M., HELLER, J., SIMON, A., GONZÁLEZ COLLADO, I., VIAUD, M. & TUDZYNSKI, P. 2012. BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 704-718.
- TEMME, N. & TUDZYNSKI, P. 2009. Does botrytis cinerea Ignore H₂O₂-induced oxidative stress during infection? Characterization of botrytis activator protein 1. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22, 987-98.

- TOONE, W. M. & JONES, N. 1999. AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev*, 9, 55-61.
- TOONE, W. M., KUGE, S., SAMUELS, M., MORGAN, B. A., TODA, T. & JONES, N. 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes & development*, 12, 1453-63.
- TRAIL, F. 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol*, 149, 103-10.
- TRAIL, F., XU, H., LORANGER, R. & GADOURY, D. 2002. Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia*, 94, 181-189.
- TURNER, J. G., ELLIS, C. & DEVOTO, A. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14 Suppl, S153-64.
- VAN LOON, A. P. G. M., PESOLD-HURT, B. & SCHATZ, G. 1986. *A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen*, Washington, DC, ETATS-UNIS, National Academy of Sciences.
- VAN NGUYEN, T., HADELER, B., KRÖGER, C., SCHÄFER, W. & BORMANN, J. 2013. The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production and stress tolerance in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Reports*, 60, 546.
- VEAL, E. A., TOONE, W. M., JONES, N. & MORGAN, B. A. 2002. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*, 277, 35523-31.
- VELUCHAMY, S., WILLIAMS, B., KIM, K. & DICKMAN, M. B. 2012. The CuZn superoxide dismutase from *Sclerotinia sclerotiorum* is involved with oxidative stress tolerance, virulence, and oxalate production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 14-23.
- VIVANCOS, A., JARA, M., ZUIN, A., SANSÓ, M. & HIDALGO, E. 2006. Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 495-502.
- WALTER, S., NICHOLSON, P. & DOOHAN, F. M. 2009. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytol*, 185, 54-66.
- WALTHER, A. & WENDLAND, J. 2012. Yap1-dependent oxidative stress response provides a link to riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 697-707.
- WAN, L. Y. M., TURNER, P. C. & EL-NEZAMI, H. 2013. Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 276-283.
- 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.
- WANG, Z., GERSTEIN, M. & SNYDER, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10, 57-63.
- WANG, Z., HE, Z., SHEN, Q., GU, Y., LI, S. & YUAN, Q. 2005. Purification and partial characterization of recombinant Cu, Zn containing superoxide dismutase of *Cordyceps militaris* in *E.coli*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 826, 114-21.
- WATANABE, Y. & YAMAMOTO, M. 1996. *Schizosaccharomyces pombe* pcr1⁺ encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Molecular and cellular biology*, 16, 704-11.

- WEMMIE, J. A., STEGGERDA, S. M. & MOYE-ROWLEY, W. S. 1997. The Saccharomyces cerevisiae AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *The Journal of biological chemistry*, 272, 7908-14.
- WILCOXON, R. D., KOMMEDAHL, T., OZMON, E. A. & WINDELS, C. 1988. Occurrence of Fusarium species in scabby wheat from Minnesota and their pathogenicity to wheat. *Phytopathology*, 78, 586-589.
- WILKINSON, M. G., SAMUELS, M., TAKEDA, T., TOONE, W. M., SHIEH, J. C., TODA, T., MILLAR, J. B. & JONES, N. 1996. The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & development*, 10, 2289-301.
- WINDELS, C. 2000. Economic and social impacts of Fusarium Head Blight : Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90, 17-21.
- WOJTASZEK, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 322 (Pt 3), 681-92.
- WOOD, M. 2002. Gene jockey fight Fusarium head blight. *Agricultural Research*, 50, 12-13.
- WORMLEY, F. L., JR., HEINRICH, G., MILLER, J. L., PERFECT, J. R. & COX, G. M. 2005. Identification and characterization of an SKN7 homologue in Cryptococcus neoformans. *Infection and immunity*, 73, 5022-30.
- WU, A. L. & MOYE-ROWLEY, W. S. 1994. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular and cellular biology*, 14, 5832-9.
- XU, X. & NICHOLSON, P. 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 83-103.
- YAMASHITA, K., SHIOZAWA, A., WATANABE, S., FUKUMORI, F., KIMURA, M. & FUJIMURA, M. 2008. ATF-1 transcription factor regulates the expression of ccg-1 and cat-1 genes in response to fludioxonil under OS-2 MAP kinase in Neurospora crassa. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 1562-1569.
- YAN, C., LEE, L. H. & DAVIS, L. I. 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *The EMBO journal*, 17, 7416-29.
- YANG, F., SVENSSON, B. & FINNIE, C. 2011. Response of germinating barley seeds to Fusarium graminearum: The first molecular insight into Fusarium seedling blight. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*, 49, 1362-8.
- YANG, S. L., LIN, C.-H. & CHUNG, K.-R. 2009. Coordinate control of oxidative stress tolerance, vegetative growth, and fungal pathogenicity via the AP1 pathway in the rough lemon pathotype of Alternaria alternata. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 100-110.
- YU, J. H. & KELLER, N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 437-458.
- ZHAO, C., WAALWIJK, C., DE WIT, P. J. G. M., TANG, D. & VAN DER LEE, T. 2013. RNA-Seq analysis reveals new gene models and alternative splicing in the fungal pathogen Fusarium graminearum. *BMC Genomics*, 14, 21.
- ZHOU, W., 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 / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada*, 48, 770-80.
- ZHOU, X. W., WANG, X. F. & LI, Q. Z. 2012. Expression and characteristic of the Cu/Zn superoxide dismutase gene from the insect parasitizing fungus Cordyceps militaris. *Mol Biol Rep*, 39, 10303-11.

ZINTEL, S., BERNHARDT, D., ROGOWSKA-WRZESINSKA, A. & OSIEWACZ, H. D.
2011. PaCATB, a secreted catalase protecting *Podospora anserina* against exogenous oxidative stress. *Aging*, 3, 768-81.

Chapitre 1:
Implication de Fgap1
dans la réponse au
stress oxydant

Dans l'introduction bibliographique, nous avons détaillé la fonction de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress oxydant. Ces facteurs ont été étudiés chez différents champignons filamenteux. Le facteur ap1 semble jouer un rôle prédominant dans cette réponse face au stress oxydant. De plus, il est impliqué dans la régulation du métabolisme secondaire chez *Aspergillus spp.* ou encore chez *A. gossypii*. Nous avons donc choisi de concentrer nos études sur la fonction de ce facteur ap1 chez *F. graminearum*.

Dans ce premier chapitre, nous avons voulu mettre en évidence le rôle joué par ap1 dans la réponse au stress oxydant chez une souche de *F. graminearum* de chémotype DON/ADON. Pour cela, plusieurs mutants ont été réalisés. Un mutant « perte de fonction » a d'abord été construit, pour analyser l'effet de la délétion sur le métabolisme secondaire et la réponse au stress. Un mutant constitutivement actif a ensuite été construit. La séquence nucléotidique correspondant au signal d'export nucléaire de *Fgap1* a été tronquée et remplacée par un codon stop. Cette séquence tronquée a été placée derrière le promoteur fort pGPD pour obtenir une expression constitutive de la protéine obtenue. Le phénotype des mutants a ensuite été analysé en termes de réponse face au stress, de production de TCTB et d'expression des gènes *Tri*. L'analyse de l'expression des gènes codant pour des activités antioxydantes a également été entreprise. Enfin, la pathogénicité de ces mutants a été analysée sur blé.

Nos résultats confirment que *Fgap1* intervient bien dans la réponse au stress oxydant mais montrent aussi qu'il joue un rôle dans la modulation du métabolisme secondaire chez *F. graminearum*. Par contre, *Fgap1* ne semble pas intervenir dans la pathogénicité de nos souches. Ces résultats sont présentés dans l'article ci-après. Un travail complémentaire a été réalisé sur la localisation subcellulaire du facteur Fgap1 et est présenté à la suite de l'article.

The bZIP transcription factor *Fgap1* mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*

M. Montibus^{1*}, C. Ducos¹, M.N. Bonnin-Verdal¹, J. Bormann², N. Ponts¹, F. Richard-Forget¹,
and C. Barreau^{1,3}

¹INRA, UR1264 MycSA, 71, Avenue Edouard Bourlaux, CS20032, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex, France.

²University of Hamburg, Biocenter Klein Flottbek, Department of Molecular Phytopathology and Genetics, Ohnhorststr. 18, D-22609 Hamburg, Germany.

³CNRS, UR1264 MycSA, 71, Avenue Edouard Bourlaux, CS20032, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex, France.

Accepté dans "Plos One"

Abstract

Redox sensing is of primary importance for fungi to cope with oxidant compounds found in their environment. Plant pathogens are particularly subject to the oxidative burst during the primary steps of infection. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, it is the transcription factor Yap1 that mediates the response to oxidative stress via activation of genes coding for detoxification enzymes. In the cereal pathogen *Fusarium graminearum*, *Fgap1* a homologue of Yap1 was identified and its role was investigated. During infection, this pathogen produces mycotoxins belonging to the trichothecenes family that accumulate in the grains. The global regulation of toxin biosynthesis is not completely understood. However, it is now clearly established that an oxidative stress activates the production of toxins by *F. graminearum*. The involvement of *Fgap1* in this activation was investigated. A deleted mutant and a strain expressing a truncated constitutive form of *Fgap1* were constructed. None of the mutants was affected in pathogenicity. The deleted mutant showed higher level of trichothecenes production associated with overexpression of *Tri* genes. Moreover activation of toxin accumulation in response to oxidative stress was no longer observed. Regarding the mutant with the truncated constitutive form of *Fgap1*, toxin production was strongly reduced. Expression of oxidative stress response genes was not activated in the deleted mutant and expression of the gene encoding the mitochondrial superoxide dismutase MnSOD1 was up-regulated in the mutant with the truncated constitutive form of *Fgap1*. Our results demonstrate that *Fgap1* plays a key role in the link between oxidative stress response and *F. graminearum* secondary metabolism.

I- Introduction

Fusarium graminearum (teleomorph *Gibberella zeae*) is the main causal agent of the *Fusarium* head blight (FHB), a disease that can affect wheat, barley, rice or maize, and potentially causes important economic losses. In addition, the occurrence of FHB is often associated with kernel contamination by mycotoxins that are produced in the field by *Fusarium*. Among the frequently encountered mycotoxins, type B trichothecenes (TCTB) are predominant (Kimura et al., 2007). Type B trichothecenes consist of deoxynivalenol (DON) and its acetylated C-3 and C-15 derivatives (3ADON and 15ADON, respectively), as well as nivalenol (NIV) and its C-4 acetylated derivative, sometimes also called fusarenone X (4ANIV or FX) (Champeil et al., 2004). The presence of these mycotoxins in edible grains represents an important problem of food safety (Goswami and Kistler, 2004). In Europe, maximum acceptable DON levels in food destined for human consumption were established (EC No1126/2007). Accordingly, grains exceeding the established limits are not permitted for commercialization for human consumption. Trichothecenes are heat stable molecules and are not degraded during current food processing (Rocha et al., 2005). As a result, the best way to restrict trichothecenes content in food is to limit their biosynthesis by the fungus before harvest.

The genes involved in type B trichothecenes biosynthesis pathway have been identified and named *Tri* genes (Alexander et al., 2009, Desjardins et al., 1993, Kimura et al., 2007). Most *Tri* genes are clustered in the genome in a so-called *Tri5* cluster, named according to the gene coding for the first step of the biosynthetic pathway. It includes two transcription factors *Tri6* and *Tri10* (McCormick et al., 2011). These two proteins activate expression of other *Tri* genes (Alexander et al., 2009, Seong et al., 2009). The full range of mechanisms controlling the accumulation of type B trichothecenes is, nonetheless, far from being completely understood.

Regulating the biosynthesis of TCTB involves several regulatory circuits, including those triggered by oxidative stress, such as the one produced by plants in response to pathogen invasion (Merhej et al., 2011). Indeed, during plant-pathogen interactions, pathogen recognition by the host leads to a plant-released oxidative burst, that consists of the production of reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 , involved in processes related to plant defense mechanisms. In response to such an oxidative burst, pathogens induce oxidative stress response (OSR) mechanisms to scavenge the elevated ROS levels (Heller and Tudzynski, 2011, Montibus et al., 2013, Shetty et al., 2008). In addition, these ROS also play a role during fungal pathogenesis as demonstrated in the rice blast agent *Magnaporthe oryzae* (Guo et al., 2011). The occurrence of an oxidative burst triggered after infection by *F. graminearum* has been demonstrated in barley or wheat (Yang et al., 2011, Zhou et al., 2005). Furthermore, previous works showed that treatment with H_2O_2 results in increased toxin accumulation and *Tri* genes expression by *F. graminearum* *in vitro* (Ponts et al., 2007, Ponts et al., 2006). In that context, previous results suggested that the production of trichothecenes by *F. graminearum* could be a mechanism the fungus triggers to cope with ROS production by the plants (Ponts et al., 2003).

The mechanisms underlying the regulation of TCTB production in the presence of H_2O_2 are largely unknown in *F. graminearum*. In yeasts, a large variety of transcription factors form a regulatory network that is activated by different oxidative stimuli such as peroxides and diamide (Moye-Rowley, 2003, Vivancos et al., 2006). Within this network, the key role of the well-known *ap1* transcription factor Yap1, in response to oxidative stress has been largely documented in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Montibus et al., 2013, Rodrigues-Pousada et al., 2010). Briefly, Yap1 localizes to the nucleus upon exposure to oxidative stress (Kuge et al., 1997, Yan et al., 1998), where it activates the transcription of target genes such

as *ctal* and *ctl1*, coding respectively for peroxisomal and cytosolic catalase (Jamieson, 1998).

Yap1 homologues have been identified in several filamentous fungi. In the rice blast fungus *M. oryzae*, the homologue of Yap1, Moap1 mediates the response to oxidative stress and is essential for aerial growth, conidia formation and pathogenicity (Guo et al., 2011). In *Aspergillus fumigatus*, a truncated version of the Yap1 homologue Afyap1 conferred resistance to oxidative stress (Qiao et al., 2010). In *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus ochraceus*, Apyap1 and Aoyap1 (the ap1 homologues in both species respectively) were not only involved in response to oxidative stress, but were also demonstrated to play a role in modulation of aflatoxin and ochratoxin A biosynthesis as well (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). This last finding suggested a probable link between the response to oxidative stress and secondary metabolism.

Here, we characterize for the first time *Fgap1*, a homologue of *Yap1*, in *F. graminearum*. We engineered genetically modified strains of *F. graminearum* lacking *Fgap1* ($\Delta Fgap1$ strain) or expressing a constitutively activated form of the protein (*Fgap1^c_{trunc}* strain) and showed the key role played by *Fgap1* in response to oxidative stress, in relation with the *in vitro* and *in planta* production of TCTB.

II- Materials and methods

II-1- Fungal strain and culture conditions

Fusarium graminearum INRA 605 (collection INRA from Bordeaux, France) of chemotype DON/15ADON was used throughout the study. In our culture conditions, 15ADON is predominantly detected. Wild-type strain and mutant strains were propagated on Potato

Dextrose Agar (PDA, Difco-France) plates and maintained as frozen microconidial suspensions at -80°C with 25% glycerol.

Growth assays were performed on complete medium (Ilgen et al., 2009) supplemented prior solidification with H₂O₂, cadmium, sorbitol or sodium chloride (Sigma Aldrich®, Saint Louis, USA).

Spore suspensions were generated by inoculating fifteen agar plugs in 150 mL of CMC medium (15 g/L carboxymethyl cellulose, 1 g/L yeast extract, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 g/L NH₄NO₃, 1 g/L KH₂PO₄) and incubating at 150 rpm and 25°C for three days. After filtration through Sefar Nitex 03-100 (100µm, SEFAR AG - Switzerland), spores were counted on Thoma cell and used as inoculum for GYEP liquid cultures (50 g/L glucose, 1 g/L yeast extract, 1 g/L peptone). Ten mL of GYEP in 25 mL Erlenmeyer flasks were inoculated with 10⁵ spores and incubated in the dark, at 25°C and 125 rpm for up to 14 days in the presence or absence of 0.5 mM H₂O₂ (Sigma Aldrich®, Saint-Louis, USA). Cultures were done in triplicate. Cultures were harvested by centrifugation during 15 minutes at 4500g and 4°C. Supernatants were stored at -20°C until trichothecene levels analysis. Mycelia were desiccated for 48h at 65°C to determine fungal dry biomass. When harvested for total RNA extraction, mycelia were quickly collected by vacuum filtration, rinsed with sterile water, and flash frozen in liquid nitrogen before short-term storage at -80°C until further analysis.

II-2- Bacteria and yeast strains used for cloning

Escherichia coli XL1-blue strain (genotype *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)] and HST08 strain (genotype *F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ⁻*) (provided with the In-Fusion® HD Cloning Kit – Clontech) were used for plasmid propagation. *Saccharomyces cerevisiae* FY1679 diploid strain (donated by

François Doignon) of genotype MATa/MAT α , ura3-52/ura3-52, trp1 Δ 63/TRP1, leu2 Δ /LEU2, his3 Δ 200/HIS3, GAL2/GAL2 was used to perform the construction of the truncated gene.

II-3- Type B trichothecenes analysis

Four mL of GYEP culture supernatant were extracted with 8 mL of ethyl acetate (Fisher Scientific, Waltham, USA). Five mL of the organic phase were then evaporated to dryness at 50°C under a nitrogen stream. For extraction from wheat samples, 5 volumes of acetonitrile/water (84%/16%) were added to finely grinded wheat kernels. After agitating for 1 hour, and centrifugation, 5mL of the filtrate were purified using Trichothecene P columns (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) before evaporation to dryness at 50°C under a nitrogen stream. Dried samples were resuspended in 500 μ L of methanol/water (1:1, v/v) (Methanol Fisher Scientific, Waltham, USA) and cleaned up on 0.45 μ m filters (Phenomenex). Quantification analysis was performed on an Agilent Technologies 1100 series HPLC chain, equipped with an Agilent photodiode array detector (DAD) and the ChemStation chromatography manager software (Agilent, Waldbronn, Germany). Separation was achieved on a column kinetex 2.6U XB-C18 (4.6 $\times$ 150mm) maintained at 45°C. The mobile phase consisted of water acidified with orthophosphoric acid to reach pH 2.6 (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The flow was kept at 1mL/min for a total run time of 27 min. The injection volume was set to 5 μ L. TCTB were separated in gradient elution as follows: 93-7% B, 70-30% B in 10 min, 10-90% B in 25 min, 93-7% B in 12 min. UV-VIS spectra were measured from 220 to 550 nm and peak areas were measured at 230 nm. Quantification was performed using external calibration with standard solutions prepared from pure powders (Sigma Aldrich®, Saint-Louis, USA).

II-4- *In silico* identification of Fgap1

The sequences of Yap1 from *S. cerevisiae* (NCBI accession number NP_013707.1) and its homologues in *Schizosaccharomyces pombe* (NCBI accession number NP_593662.1) and *Aspergillus*

Table S1: List of primers used for vector constructions and transformants screening.

Oligonucleotide	sequence (5' → 3')
Yapamont F	c c g t c t a c c c a g g t g t c a c t
Yapaval R	c t g c g c a c g t t t t g t a t t t g
neoHY-1-fin F	g g c c g c c c t g t c t c c g g t g t c c t
neoHY-8-début R	c t a g a a g a g g t a a a c c c g a a a c g
YAP-avalHY F ^a	G G A C A C C G G A G A C A G G G C G G C C a c c a a c a a g a t c c g g c t g t a
YAP-amontHY R ^a	G C G T T T C G G G T T T A C C T C T T C T A G g g c t g t g a g g c t c g t a g a a g
YapAmontIFC F ^b	<u>g c a g c c c g g g g a t c c c</u> c c g t c t a c c c a g g t g t c a c t
YapAvalIFC R ^b	<u>t a g a a c t a g t g g a t c c c t</u> g c g c a c g t t t t g t a t t t g
5fpGPDdeb F ^c	<u>a a c g c c a g g g t t t t c c c a g t c a c g a c g t a g a a t t c c c t t g t a t c t c t a c a c</u>
3rTtrpcfin R ^c	<u>g g a t a a c a a t t t c a c a c a g g a a c a g c t a g a a t t c a a g a g e g g a t t c c t c a g t c</u>
Yap-pGDP F ^d	<u>T A T T C A T C T T C C C A T C C A A G A A C C T T T A</u> a t g g c t t c t a c c g g c a c t g g a g g c a c
Yap-TtrpC R ^d	<u>G T T T G A T G A T T T C A G T A A C G T T A A G T G</u> t g t g c c t t g g g a c a a g c t t g g
pGPDyap R	<u>c a t t a a a g g t t c t t g g a t g g g a a g a t g</u>
TtrpC F	<u>c a c t t a a c g t t a c t g a a a t c a t c a</u>

^aCapitalized sequences in the YAPAmont-HY R and YAPaval-HY F primers correspond to the hygromycin resistance cassette to allow overlapping between the 5'UTR, the hygromycin resistance cassette and the 3'UTR.

^bSequences underlined in the YapAmontIFC F and YapAvalIFC R primers correspond to the multiple cloning site of the pBCSK plasmid digested with *Bam*HI.

^cSequences underlined in the 5fpGPDdeb F and 3rTtrpcfin R primers correspond to the multiple cloning site of the pRS426 plasmid digested with *Bam*HI and *Hind*III.

^dCapitalized sequences in the Yap-pGPD F and Yap-TtrpC R primers correspond to pGPD and TtrpC sequences respectively to allow overlapping between pGPD, *Fgap1* and TtrpC.

fumigatus (NCBI accession number XP_750882.1) were used as input for BLAST (Altschul et al., 1990) against the *Fusarium* Comparative database from the Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group), to identify sequences with high similarities in the translated genome of *F. graminearum* (version 3). Multiple protein alignments were performed with ClustalW (Thompson et al., 2002).

II-5- Engineering of $\Delta Fgap1$, $\Delta Fgap1:ap1$ and $Fgap1^c_{trunc}$

$\Delta Fgap1$ was obtained by replacing the genomic copy of the *Fgap1* coding sequence in the *F. graminearum* INRA 605 strain by a hygromycin resistance cassette. First, the flanking regions corresponding to a 988bp fragment upstream the starting codon and a 800 bp fragment downstream the stop codon and the hygromycin resistance cassette were amplified using the Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) as follows: the primers neoHY-1-fin F/neoHY-8-début R (see Table S1) were used to amplify a 2.1 kb fragment corresponding to the hygromycin resistance cassette, from the pBCSKneohygro plasmid, containing *hph* gene under the control of the *Neurospora crassa CPC1* promotor and the *Aspergillus nidulans trpC* terminator. The flanking regions were amplified with two pairs of primers : YapAmontIFC F/ YAPAmont-HY R and YAPaval-HY F/ YapAvalIFC R respectively (see Table S1). PCR were performed using the following conditions: 98°C for 10 min, 35 × [98°C for 30 s, 64°C for 30 s, 72°C for 30 s/kb], 72°C for 5 min. The amplified fragments were purified from a 1% agarose gel using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, USA) was used for recombination of the three PCR products *via* overlapping hygromycin sequences and cloning into the pBCSK+ (Stratagene), according to the manufacturer's instruction. The construction and sequence fidelity were confirmed by sequencing (Cogenics – Genome Express Grenoble – France). The construction was amplified

using primers YapamF and YapavR and was used to transform protoplasts of the *F.graminearum* strain. The deleted strain selected for further studies was complemented by co-transformation with the wild-type sequence of *Fgap1*, including 1000 bp of the promotor region and 800 bp of the terminator region, and the pSM334 plasmid (Marek et al., 1989) carrying the geneticin resistance marker. *Fgap1^{c trunc}* was generated in the yeast strain FY1679, maintained on solid YPD (yeast extract 10g/L, peptone 20g/L, dextrose 20g/L). First, the *Aspergillus nidulans* promotor pGPD and the terminator TtrpC were amplified from the PAN8.1 plasmid (Punt et al., 1990) using the primer pairs 5fpGPDdeb F/pGPDyap R and TtrpC F/3rTtrpcfin R respectively (see Table S1). The *Fgap1* truncated version (protein truncated after the Q residue at position 517, see Figure S1) of the *Fgap1* coding sequence was amplified from the genomic DNA of the *F. graminearum* wild-type strain using the primer pair Yap-pGDP F/Yap-Ttrpc R (see Table S1). PCR was performed using the Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) as follows: 98°C for 10 min, 35 × [98°C for 30 s, 62°C for 30 s, 72°C for 30 s/kb], 72°C for 5 min. The final construction was obtained by transforming the yeast strain FY1679 with the three PCR products and the pRS426 plasmid digested by *Bam*HI and *Hind*III, according to Collopy et al (Collopy et al., 2010), allowing multiple recombinations *via* the overlapping sequences. The full-length construct was finally amplified by PCR using the primers GPDdeb F and Ttrpcfin R and cloned in the pCB1004, carrying the hygromycin resistance cassette (Carroll et al., 1994) before transforming *F. graminearum*. The construction and sequence fidelity were confirmed by sequencing (Cogenics – Genome Express Grenoble – France).

II-6- Fungal transformation

A total of 3×10^7 spores were incubated in 100 mL of GYEP liquid medium for 12h at 25°C and 150 rpm in the dark. Cultures were then filtered on vacuum system, washed with 20mL of

NH₄Cl 1M and treated with 16 mg of Driselase® (Sigma Aldrich®, Saint-Louis, USA) in a final volume of 20mL of NH₄Cl 1M. After 2h of incubation at 26°C and 60 rpm, protoplasts were filtered through Sefar Nitex 03-100 (100µm, SEFAR AG-Switzerland), collected by centrifugation at 950g for 10 min and resuspended in 10mL of 0.6M Sorbitol in MOPS 10 mM, pH 6.3. The protoplast solution was then carefully layered onto 10 mL of a 1.2M MgSO₄ pH5.8. After centrifugation at 950 g for 10 min, purified protoplasts were collected at the phases interface and resuspended in 20 mL of sorbitol 1M in MOPS 10mM pH 6.3. After centrifugation at 950 g for 10 min, the pellet was finally resuspended in 200µL of sorbitol /CaCl₂ buffer (Sorbitol 1M, MOPS 10mM, CaCl₂ 40mM, pH 6.3) and kept on ice until transformation.

2×10^7 protoplasts in 100µL of sorbitol /CaCl₂ buffer pH 6.3 were transformed with 5µg of target DNA in 60 µL of Tris-EDTA-CaCl₂ buffer (Tris 10mM, EDTA 1mM, CaCl₂ 40mM, pH 7.5) and incubated for 20 min on ice. 160 µL of PEG 60% in Sorbitol 0.6M was then added and incubation was carried on for 15 min at room temperature. Protoplasts were finally spread on PDAS agar plates (39g/L Potato Dextrose Agar and sucrose 20%) containing hygromycin B (60µg/mL) or geneticin (100µg/mL).

Transformants were purified by monoconidial isolation and screened for successful insertions of the desired constructs by PCR using the primers listed in Table S1. Genomic DNA was extracted from 50 mg of freeze dried mycelium as described previously (Javerzat et al., 1993). Reactions were performed with the GoTaq DNA Polymerase (Promega, France) according to the manufacturer's instructions.

II-7- Southern blot analysis

Transformants that passed the PCR pre-screening were further checked by Southern blot analysis, using the DIG system (Roche, Germany) according to a previously described

Table 1: Primers used to amplify cDNA by real-time PCR.

Gene (accession No)	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	T _m (°C)
<i>GAPDH</i> (FGSG_06257)	TCAAGGGTGTCTGGCCTAC	AGTAACCCCACTCGTTGTCG	60
<i>Fgap1</i> (FGSG_08800)	AACAGAACGGTGGACAATTC	TGATTGCAGTTCATGTTCTGT	65
<i>Tri4</i> (FGSG_03535)	TATTGTTGGCTACCCCAAGG	TGTCAGATGCGCCTTACAAA	60
<i>Tri5</i> (FGSG_03537)	GACCCTAAGCGACTACAG	GTGCTACGGATAAGGTTC	60
<i>Tri6</i> (FGSG_03536)	AGCGCCTTGCCCCTCTTTG	AGCCTTTGGTGCCGACTTCTTG	63
<i>Tri12</i> (FGSG_03541)	ATTCGGTACATGGGCT	GCAGTGCTGTTCGTCA	60
<i>Tri101</i> (FGSG_07896)	AGGGCATTAGCGAGGGAAACACA	ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC	61
<i>Catalase 1</i> (FGSG_06554)	GGAAAGCCAGAACCAAACAA	CGTTGACGAGAGTGTAGGTGTTGA	58
<i>Catalase 2</i> (FGSG_02881)	TCTCTCCCTCCAACATGGTC	CAGGGTGCGTAGACTTGTT	62
<i>Catalase 3</i> (FGSG_06733)	TCAACCGTCCTCTGTCTCCTATCC	AGCCTTTTCCTTGTGTCTGGTT	60
<i>MnSOD1</i> (FGSG_04454)	CTCTCCCCGATCTTCCCTAC	CGGGTAACGATGGACAGAGT	62
<i>MnSOD2</i> (FGSG_02051)	TTGCGTATCGTTACCACCAA	TCAACATAGGCAGCCTTTCC	60
<i>Cu/ZnSOD1</i> (FGSG_08721)	CACACCTTCGGTGACAACAC	GGTCTCGTCAGAAGGAGCAC	62
<i>Cu/ZnSOD2</i> (FGSG_00576)	AGCTCTCGCAGCAGTTCTTC	CAGGATCAACGTGAATGTGG	60

protocol (Florent et al., 2009). Five µg of genomic DNA from $\Delta Fgap1$ or $Fgap1^c_{trunc}$ was digested with *SalI* (Promega, France) or with *PstI* (Promega, France) respectively, and separated by 0.8% agarose gel electrophoresis. After transfer onto nylon membranes (Hybond N+, Amersham), DIG-labeled probes synthesized with a PCR DIG probe synthesis kit (Roche, Germany), were hybridized following manufacturer's instructions. The probe 1 matches the core sequence of *Fgap1* and was generated by PCR amplification using the primers 5'-AATTCGGCAATGTCGATCTC-3' and 5'-TGGGACAAGCTTGGAGTTTC-3'. The probe 2 corresponding to the 3' end of *Fgap1*, was generated using the primers 5'-AACAGAACGGTGGACAATTC-3' and 5'-TGTGCCCCACTTGATGACTA-3'.

II-8- RNA extraction and cDNA preparation

Fifty mg of freeze-dried mycelium was grinded with the TissueLyser® (Qiagen, Venlo, The Netherlands) for 30 sec at 30Hz, and total RNA was extracted using the RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) following the manufacturer's instructions. Eventual contaminations with gDNA were removed after treatment with the TURBO DNA-free™ Kit (Ambion) following the manufacturer's instructions. The samples were quantified with the Nanodrop ND 1000 spectrophotometer (Labtech International, UK) and their quality was assessed by agarose gel electrophoresis. 1µg of total RNA was reverse transcribed using the SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, Invitrogen) with oligo dT priming, according to the manufacturer's instructions and kept at -20°C until further analysis.

II-9- Gene expression analysis

Analyses were performed using 1µL of each cDNA preparation (corresponding to 10ng of total RNA input in the reverse transcription) mixed in a 10µL-reaction volume, using the QuantiFast™ SYBR® Green PCR kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Reactions were

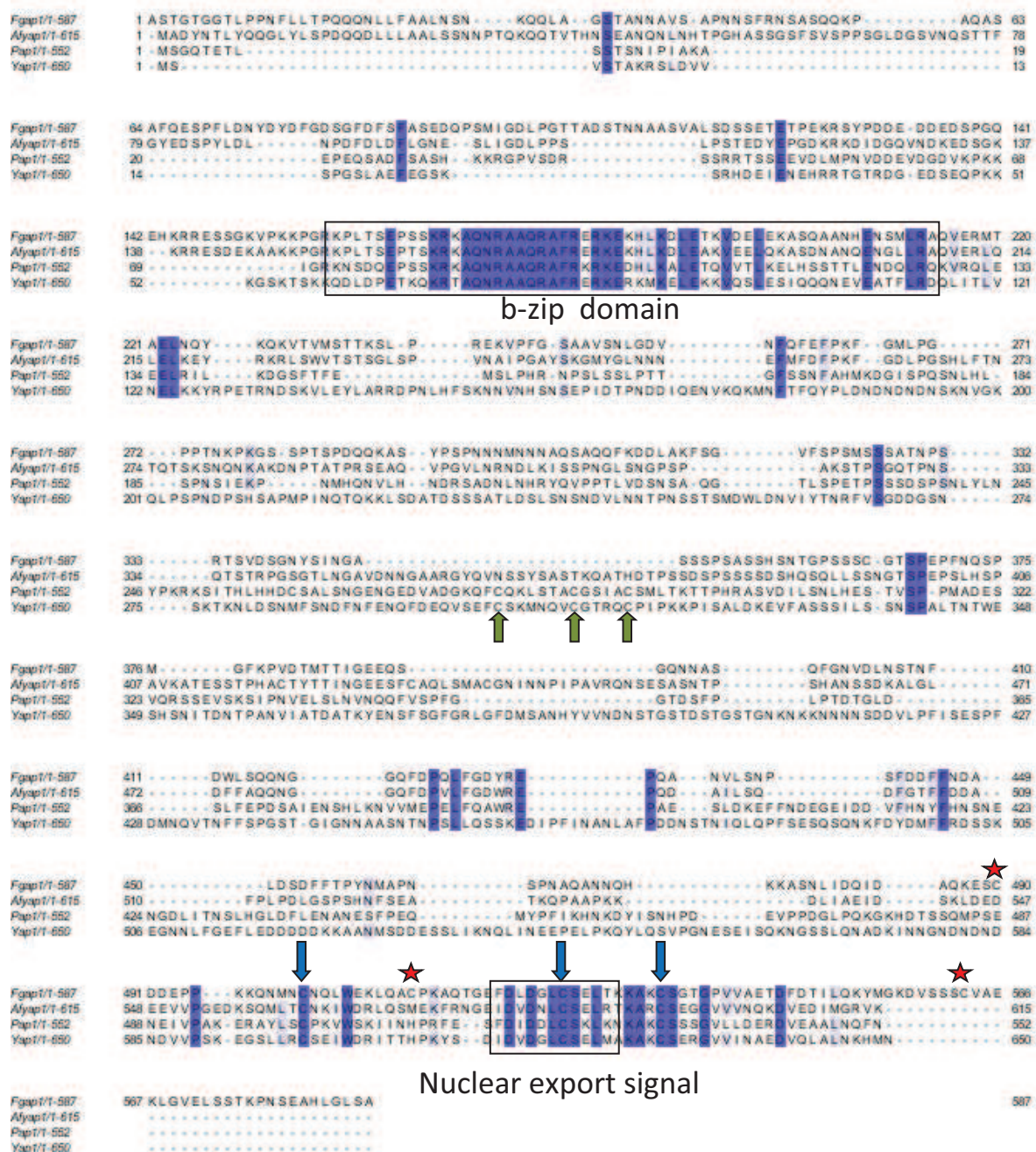


Figure S1: Multiple sequence alignment of Fgap1 with others ap1 homologous sequences. Sequences from *F. graminearum* (FGSG_08800.3), *A. fumigatus* (XP_750882.1), *S. pombe* (NP_593662.1) and *S. cerevisiae* (NP_013707.1) were aligned with ClustalW online software. Conserved regions are shaded. Two domains are conserved: the b-zip domain, with the basic region and the leucine zipper and the nuclear export signal, embedded within the c-CRD. Blue arrows correspond to the cysteine residues of the c-CRD. Green arrows correspond to the n-CRD found in Yap1 and Pap1. Red stars correspond to the cysteine residues found only in the C-terminal part of Fgap1.

carried out on a LightCycler® LC2.0 system equipped with the LightCycler software 3.5.3 (Roche, Germany). For each gene, efficiency was evaluated with serial dilutions of the pooled cDNA samples and data analyses were performed as previously described (Ponts et al., 2007). Expression levels of the studied genes (see Table 1), normalized to the expression of the housekeeping gene *GAPDH*, and statistical analyses were performed using REST® software (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl et al., 2002, Pfaffl, 2001).

II-10- Plant infection assays

The susceptible spring wheat cultivar Nandu (Lochow-Petkus, Bergen-Wohlde, Germany) was used for virulence assays. Plants were cultivated in a growth chamber at 20°C with a photoperiod of 16 h and 60% relative humidity, and then transferred to infection chambers with optimized conditions. For each strain tested, a suspension of 10^3 conidia in 10 µl of the wild type and all mutants was inoculated into each of two central spikelets at the early stages of anthesis according to a previously described protocol (Jenczmionka and Schäfer, 2005). The inoculated spikes were enclosed in small plastic bags misted with water for the first 3 days and then monitored for up to three weeks in the infection chambers. Wheat spikes inoculated with 10 µl of pure water were used as the negative control. After three weeks, the ears were separated from the whole plant, photographed, lyophilized, grinded and conserved at -20°C until toxin analysis.

II-11-Expression of results and statistical analysis

All results for trichothecene production were expressed as the arithmetic mean values $\pm$ SD of experiments performed in three independent biological repeats. Results for disease index were expressed as the arithmetic mean values $\pm$ SD of all spikes. Values were compared by performing the Student's t-test. The value $p = 0.05$ was chosen as the point of statistical significance. Differential gene expression was analyzed with REST [39, 40] using the gene

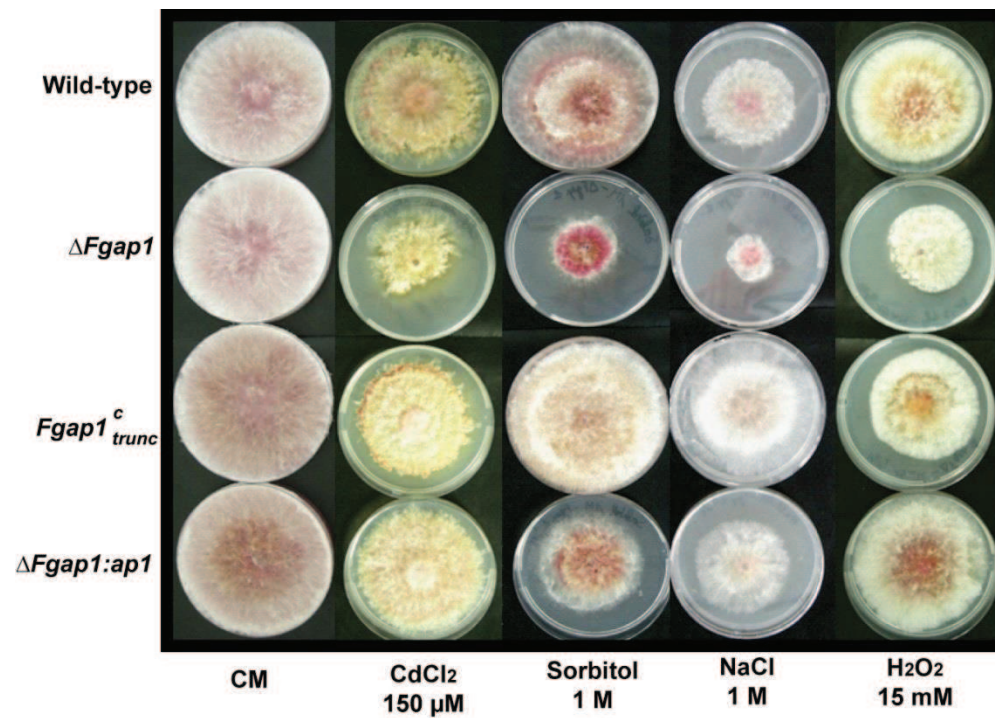


Figure 1: Radial growth assay to evaluate stress tolerance in *F. graminearum* wild-type strain and mutants. *F. graminearum* wild-type strain, $\Delta Fgap1$, $\Delta Fgap1:ap1$, and $Fgap1^{c_{trunc}}$ were grown 7 days under oxidative stress with cadmium chloride 150 μM ($CdCl_2$) or H_2O_2 (15 mM), osmotic stress with sorbitol (1 M) or NaCl (1 M).

encoding GAPDH as internal reference (5000 permutations, $p \leq 0.05$). Results are reported in the log2 value of the ratio mutant vs wild-type strain or treated condition vs control.

III- Results

III-1- Identification of *Fgap1*, a *Yap1* homologue in *F. graminearum*

A genome-wide search of *F. graminearum* for the presence of a putative ap1 protein homologous to the *S. cerevisiae* Yap1, the *Schizosaccharomyces pombe* Pap1, and the *A.*

fumigatus Afyap1 was performed using BLAST (see Materials and Methods). We identified the gene FGSG_08800 (*Fusarium* Comparative Database, accession number), coding for a 588 amino acids-long protein with significant homology with the above ap1 factors, referred to as *Fgap1* from now on. *Fgap1* is 2456 bp-long and contains two introns. Alignment of the *Fgap1* protein sequence to those of Yap1, Pap1 and Afyap1 shows two conserved domains: an N-terminal b-zip domain (basic leucine zipper domain), and a C-terminal nuclear export signal (NES) embedded in a characteristic cysteine-rich domain, or c-CRD (Rodrigues-Pousada et al., 2004) (Figure S1). Yap1 and Pap1 classically contains another CRD, the n-CRD (Figure S1), that is absent from *Fgap1*. Previous data showed however that this n-CRD is optional for nuclear localization in *S. cerevisiae* (Yan et al., 1998) and the function of *Fgap1* is likely unaffected by its absence. *Fgap1* contains 3 others cysteines in the C-terminal part of the protein (Figure S1), whose function remains to be clarified. In conclusion, *Fgap1* contains the b-zip domain and the c-CRD domain containing the NES, essential for ap1-like full functions.

III-2- Stress tolerance and *Fgap1*

We analyzed the role of *Fgap1* in tolerance to stress, using reverse genetics approaches. Three different *F. graminearum* mutant strains were engineered. First, we deleted the genomic copy

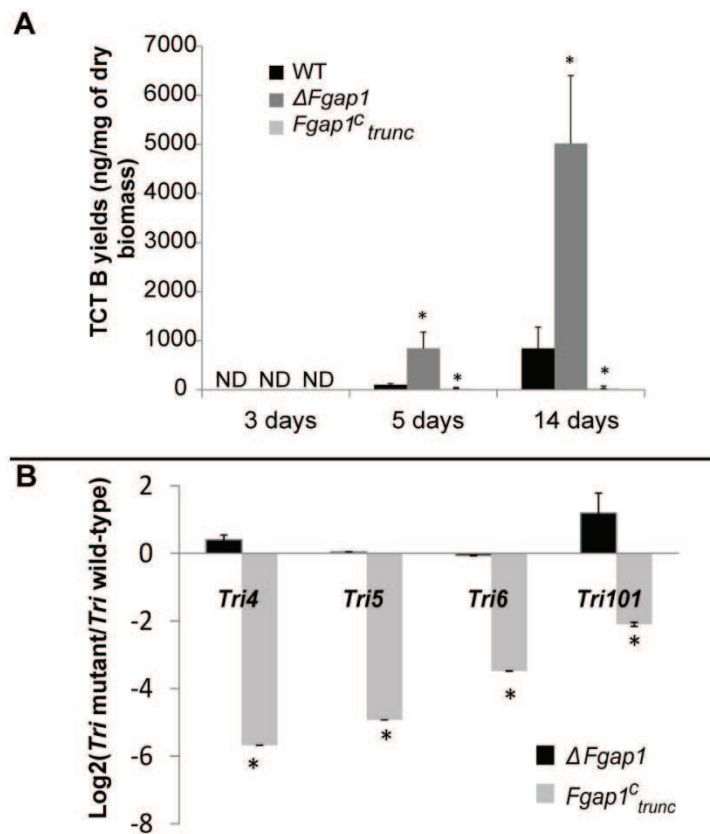


Figure 2: *Fgap1* plays a role in toxin accumulation and *Tri* genes expression. (A) DON + 15 ADON yields (in ng of toxins produced per mg of dry fungal biomass) in the wild-type and the mutant strains after 3, 5 and 14 days of growth, ND stands for not detected. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates. (B) Expression ratio mutant/wild-type (in log2 ratio scale) for *Tri* genes after 5 days of culture. The star indicates a significant difference compared to the wild-type ($p < 0.05$).

Table 2: Toxin analysis and genes expression in the wild-type strain, the $\Delta Fgap1$ and the $\Delta Fgap1:ap1$ after 4 days of growth.

Analysis	Wild-type	$\Delta Fgap1$	$\Delta Fgap1:ap1$
DON+15ADON yield (ng/mg of dry biomass)	10.4 ± 1.3	208.7 ± 90.5 ^a	3.3 ± 2.1 ^a
<i>Tri5</i> expression (Log2(Mutant/Wild-type))	—	2.3 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.08

^ameans significantly different from wild-type ; $p \leq 0.05$

of *Fgap1* in *F. graminearum*, to create a loss-of-function mutant ($\Delta Fgap1$) (Figure S2). We verified using southern blot that *Fgap1* was properly deleted and mono-copy (Figure S2). An intact copy of *Fgap1* including the promotor and the terminator regions, was subsequently re-introduced in the $\Delta Fgap1$ strain ($\Delta Fgap1:ap1$) to restore its full functions. Finally, a truncated form of *Fgap1* lacking NES was constructed, therefore expected to be constitutively active (*Fgap1^c_{trunc}*), and placed under the control of the constitutive *A. nidulans* promotor GPD and terminator TtrpC (see Figure S2) (Carroll et al., 1994). This form was introduced ectopically in *F. graminearum*. This construct was inspired by a previous study where a truncated version of *Yap1* was introduced in yeast (Alarco and Raymond, 1999) (Figure S2). We verified by Q-RT-PCR that *Fgap1* was not detected in the deleted mutant, overexpressed in the truncated mutant *Fgap1^c_{trunc}*, and expressed as wild-type levels in $\Delta Fgap1:ap1$ mutant. Conidiation in liquid CMC medium of the three mutants after 4 days of culture was not affected (data not shown). Further, we tested $\Delta Fgap1$, $\Delta Fgap1:ap1$, and *Fgap1^c_{trunc}* mutants for tolerance to oxidative stress by H₂O₂ or cadmium, and NaCl or sorbitol-induced osmotic stresses (Figure 1). We compared the ability of the wild-type strain and the mutants to grow on agar complete medium supplemented with H₂O₂ 15 mM, NaCl 1 M, sorbitol 1 M, or cadmium 150 μ M. Such concentrations did not affect substantially the growth of the wild-type strain after 7 days of growth. The growth of the deleted mutant $\Delta Fgap1$ was however significantly affected. Even after seven days of growth the thallus was severely hampered and never reached the margin of the plate (Figure 1). Complementation restored the wild-type phenotype as shown with the $\Delta Fgap1:ap1$ add-back strain. The growth of the *Fgap1^c_{trunc}* mutant was similar to that of the wild-type strain, except for sorbitol or NaCl-induced stresses where the *Fgap1^c_{trunc}* mutant exhibited a better adaptation. These results demonstrate that *Fgap1* is involved in the regulation of stress response in *F. graminearum*.



Figure 3: Wheat ears inoculated with *F. graminearum* wild-type strain, $\Delta Fgap1$, $\Delta Fgap1:ap1$, and $Fgap1^c_{trunc}$. Wheat ears 21 days after point inoculation of two central spikelets. Bleaching indicates successful infection. Infection assays were performed with 10 replicates for each strain. For each strain, calculated disease index (% of infected spikelets) was: WT = 90.2 ± 25.6 , $\Delta Fgap1$ = 94.2 ± 11.1 , $\Delta Fgap1:ap1$ = 90.0 ± 22.4 , $Fgap1^c_{trunc}$ = 77.9 ± 25.2 .

Table 3: DON + 15 ADON levels in wheat ears after 21 days after point inoculation of two central spikelets.

Strain	Toxin levels ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry wheat)
Wild-type	153.4 ± 2.0
$\Delta Fgap1$	113.9 ± 8.1^a
$\Delta Fgap1:ap1$	156.1 ± 1.3
$Fgap1^c_{trunc}$	49.6 ± 10.7^a

^ameans significantly different from wild-type ; $p \leq 0.05$

III-3- Trichothecene production and *Fgap1*

In order to determine whether or not *Fgap1* is involved in DON and 15-ADON production, the wild-type strain, the $\Delta Fgap1$ and the *Fgap1*^{c_{trunc}} strains were cultured for up to 14 days and compared to control in terms of trichothecene production and *Tri* genes levels of expression (Figure 2). Toxins were detectable after 5 days of growth (Figure 2-A). The deleted mutant produced significantly more toxins than the wild-type strain at 5 days and at 14 days whereas the *Fgap1*^{c_{trunc}} mutant produced only traces amounts of trichothecenes, even after 14 days of growth. *Tri* genes expression was measured after 5 days of growth (Figure 2-B). Expression of *Tri 4* and *Tri 101* was slightly up-regulated in the $\Delta Fgap1$ mutant compared to the wild-type strain and all the *Tri* genes were strongly down-regulated in the *Fgap1*^{c_{trunc}} mutant (Figure 2-B). These results strongly imply the role of *Fgap1* in the regulation of trichothecene accumulation and *Tri* genes expression.

In order to confirm the stimulating effect of the deletion of *Fgap1* on trichothecene accumulation, in another experiment, we compared the production of the $\Delta Fgap1:ap1$ add-back strain to that of the *F. graminearum* wild-type strain and the $\Delta Fgap1$ strain. The strains were then cultured for 4 days in GYEP liquid medium. Trichothecene (DON+15ADON) and *Tri5* gene expression levels were measured (Table 2). Again, toxin accumulation was strongly enhanced in the strain lacking *Fgap1*, with levels 20-fold higher than the wild-type strain. The complementation suppressed this strong increase, restoring a level of production in the same order of magnitude as the wild-type phenotype (Table 2). Concurrently, *Tri5* expression was up-regulated about 5-fold (log2 ratio of 2.3) in *F. graminearum* $\Delta Fgap1$ strain compared to wild-type, consistent with toxin levels. A level of expression similar to wild-type was restored in the add-back strain $\Delta Fgap1:ap1$ (Table 2). This result reinforces the role of *Fgap1* in the regulation of trichothecenes accumulation in *F. graminearum*.

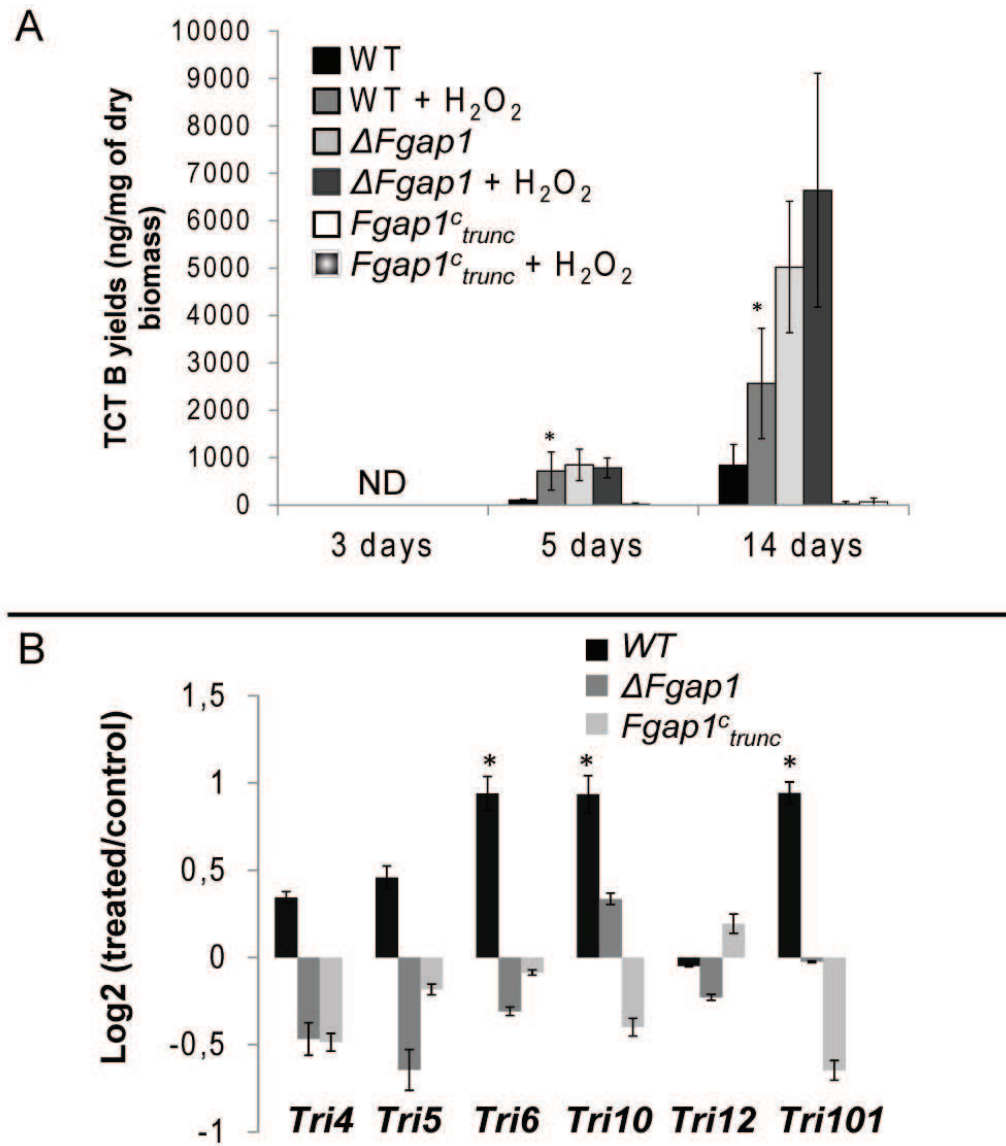


Figure 4: Toxin production and *Tri* genes expression in the wild-type strain and in the $\Delta Fgap1$ and $Fgap1^c_{trunc}$ mutants after exposure to oxidative stress by H₂O₂. *F. graminearum* wild-type or mutants were cultured up to 14 days in liquid medium supplemented or not supplemented with 0.5 mM H₂O₂. (A) DON + 15ADON yield (ng of toxins per mg of dry fungal biomass) after 3, 5 or 14 days of growth. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates. The star indicates a significant difference for the treated condition compared to the control condition ($p < 0.05$). (B) *Tri* genes expression (expression ratios treated/not treated in log₂ scale) in 5 day-old cultures. *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10*, *Tri12*, and *Tri101* were considered. The star indicates a significant difference of expression between treated vs. not treated ($p < 0.05$).

III-4-Pathogenicity of *Fgap1* mutants

Both pathogenicity, *i.e.* the capacity to infect the inoculated spikelet, and virulence, *i.e.* the capacity to progress from one spikelet to the other ones below the inoculated point of the *Fgap1* mutant strains, were assessed using point inoculation on wheat.

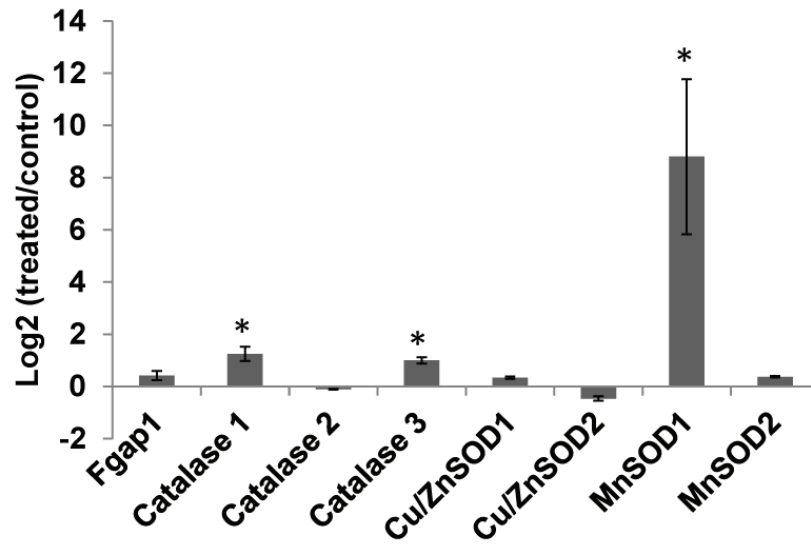
The wild-type strain, the $\Delta Fgap1$ mutant and the add-back strain were pathogenic, caused serious bleaching, and presented similar disease index value (Figure 3). The *Fgap1*^c_{trunc} mutant showed a slightly reduced virulence, the spikelets at the bottom of the ears were not bleached and the disease index was slightly lower (Figure 3). However, due to high variability of the values measured for each spike, this difference was not significant.

We further measured the levels of DON and 15ADON produced by each strain tested on the infected ears (Table 3). The wild-type strain and the $\Delta Fgap1:ap1$ add-back strain produced similar levels of TCTB, meanwhile the deleted strain showed only a slight decrease in trichothecene accumulation. Moreover, the strain expressing the truncated *Fgap1* produced about three times less trichothecenes than the wild-type strain, consistent with the lesser virulence observed for this strain. Altogether, our results demonstrate that *Fgap1* is not essential for pathogenicity in *F. graminearum*.

III-5- *Fgap1* and trichothecenes B production in response to H₂O₂ mediated oxidative stress

The wild-type strain, the deleted strain $\Delta Fgap1$ and the strain expressing the truncated *Fgap1*^c_{trunc} were inoculated in liquid cultures supplemented or not with 0.5mM H₂O₂. Toxin accumulation was measured after 3, 5 or 14 days of growth and *Tri* genes expression were recorded after 5 days of culture. For each trial, treatment with H₂O₂ did not affect the accumulation of fungal biomass. In addition, supplementation with H₂O₂ did not affect pH compared to the not-supplemented control (data not shown).

A



B

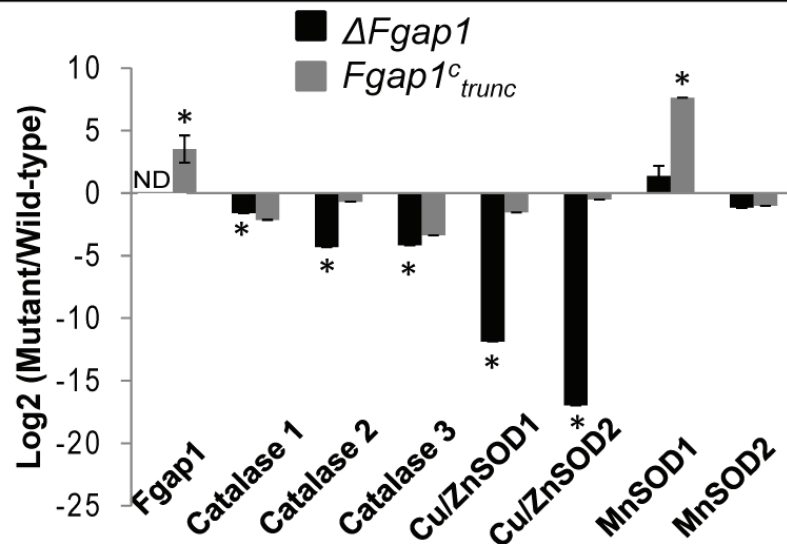


Figure 5: Expression of genes encoding antioxidant activities in the wild-type strain and in the $\Delta Fgap1$ and $Fgap1^{c\ trunc}$ mutants. (A) Antioxidant genes expression (expression ratio treated/not treated in log2 scale) in the wild-type strain in 5-day old cultures. The star indicates a significant difference between treated vs. not treated ($p < 0.05$). ND stands for not detected. (B) Antioxidant genes expression in the mutants strain compared to wild-type strain (expression ratios mutant/wild-type strain in log2 scale) in 5-day old cultures. The star indicates a significant difference for mutant compared to wild-type ($p < 0.05$).

DON and 15ADON were first detected after 5 days of culture in all cases (Figure 4-A). After 5 days of wild-type strain growth, TCTB accumulate seven times more in treated cultures than in control ones. After 14 days of growth, accumulation is still significantly enhanced in H₂O₂-treated cultures of *F. graminearum* wild-type strain (Figure 4-A). The tested *Tri* genes were broadly overexpressed in H₂O₂-treated wild-type cultures (Figure 4-B), including the gene *Tri101* localized outside the cluster *FgTri5*, consistent with higher toxin accumulation. The regulators *Tri6* and *Tri10* were significantly overexpressed in the presence of H₂O₂. These results are consistent with our previously published work (Ponts et al., 2007). In the absence of *Fgap1* ($\Delta Fgap1$), the toxin producing-activating effect of H₂O₂ previously observed for the wild-type strain was no longer visible (Figure 4-A), and *Tri* genes expression does not vary significantly upon treatment (Figure 4-B). On the contrary, the *Fgap1*^{C_{trunc}} strain, in which *Fgap1* is truncated and which produced only traces amounts of toxins in control condition, responded to H₂O₂ only with a slight increase in toxin accumulation (Figure 4-A) and no significant change in *Tri* genes expression was observed (Figure 4-B). All at once, these results demonstrate the strong role played by *Fgap1* in the regulation of toxin accumulation and *Tri* genes expression in response to oxidative stress, in *F. graminearum*.

III-6- *Fgap1* and genes encoding antioxidant activities

Our initial hypothesis postulates that *Fgap1* is a *Yap1* homologue, able to activate the expression of several genes encoding antioxidant activities required for detoxification upon oxidative stress. The level of expression of *Fgap1* in 5 days-old cultured mycelia was not affected by the treatment with 0.5mM H₂O₂ (Figure 5-A). These observations suggest, that as in budding yeast, *Fgap1* may be regulated by stress-dependent nuclear localization rather than induced by oxidative stress (Kuge et al., 1997). We further considered the expression of seven genes encoding catalase or SOD activities (Figure 5), which are potentially under the control of *ap1*.

These activities are involved in response to oxidative stress (Montibus et al., 2013) and their expression was recently demonstrated to be Yap1-dependent in *A. ochraceus* (Reverberi et al., 2012). The genes encoding the catalases considered in this study refer to the classification established in 2006 for fungal catalases. Catalase 1 corresponds to the spore-specific catalase, catalase 2 to a peroxisomal one, and catalase 3 to a secreted catalase (Giles et al, 2006). Among SOD activities, two genes encoding putative MnSOD and two genes encoding putative Cu/ZnSOD were selected.

Three of the seven tested genes were significantly up-regulated under H₂O₂-induced oxidative stress in the wild-type strain (Figure 5-A): *Catalase1*, *Catalase3*, and *MnSOD1*, which showed the highest induction. These data indicate a direct involvement of these three genes in response to oxidative stress. The expression of the same seven genes encoding antioxidant activities was then analyzed in the two $\Delta Fgap1$ and *Fgap1*^{c_{trunc}} mutants and compared to the wild-type after 5 days of growth (Figure 5-B). In the deleted $\Delta Fgap1$ mutant strain, the down-regulation of the three catalases and the two Cu/ZnSOD was consistent with an *Fgap1*-dependant expression (Figure 5-B, black bars). In the strain overexpressing the truncated *Fgap1*, a more than 10 time overexpression of *Fgap1* was observed compared to the wild-type as expected from an expression driven by the constitutive pGDP promotor (Figure 5-B, leftmost grey bar). Considering antioxidant genes, *MnSOD1* was the only one for which a clear overexpression was observed (Figure 5-B). These observations support the role of *Fgap1* in the regulation of genes encoding antioxidant activities.

IV- Discussion

In this study, we provide for the first time the functional characterization of *Fgap1* in *F. graminearum*. This protein is likely an orthologue of the previously characterized ap1 fungal proteins, such as the one identified in *S. cerevisiae* (Rodrigues-Pousada et al., 2010) or in

Aspergillus species (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). These ap1 fungal proteins were shown to play a key role in the plant oxidative stress response launched during a fungal pathogen infection process. Indeed, the generation of ROS, which is one of the earliest responses of the plant, is a defense mechanism in response of the recognition of the pathogen by the plant. Fungal pathogens have to induce an OSR mechanism to scavenge the elevated ROS levels and to be able to overcome the oxidative burst (Heller and Tudzynski, 2011, Shetty et al., 2008).

It is known in several fungi, that ap1 is one of the major regulators involved in activating OSR. In *S. pombe*, activation of genes encoding antioxidants activities, such as catalase, is mediated by ap1 (Toone et al., 1998). In *Botrytis cinerea* and *A. ochraceus*, several antioxidant activities, such as catalase, superoxide dismutase or thioredoxin, are activated by ap1 (Reverberi et al., 2012, Temme and Tudzynski, 2009). Furthermore, the ap1 factor was demonstrated to be involved in the pathogenicity of *M. oryzae* or *Alternaria alternata* (Guo et al., 2011, Yang et al., 2009). On the contrary, the factor has no impact on pathogenicity in *B. cinerea* (Temme and Tudzynski, 2009) and in the foliar pathogen of maize *Cochliobolus heterostrophus* (Lev et al., 2005). This demonstrates that ap1 proteins are required for full response to oxidative stress, but their role in virulence is divergent and suggests that other factors are redundant in this response to oxidative burst (Nguyen et al., 2013).

Here, we have, for the first time, identified *ap1* in *F. graminearum* by sequences homology with the ap1 proteins of *Aspergillus spp* and yeasts. This gene, called *Fgap1*, was deleted and a truncated form was created to study the role of *Fgap1* in term of response to stress, trichothecene accumulation and pathogenicity in *F. graminearum*.

We first compared the ability of the wild-type strain and the mutants to grow on complete medium supplemented with H₂O₂, NaCl, sorbitol, or cadmium, to mimic several stresses. Our

results suggested that in *F. graminearum*, *Fgap1* played a role in response to these different stresses. Strikingly, the deleted mutant for *Fgap1* was only slightly sensitive to high levels of H₂O₂. This is different from the results observed for *Candida albicans* or *B. cinerea*, where the mutants were strongly affected in growth (Alarco and Raymond, 1999, Temme and Tudzynski, 2009). This suggests that in *F. graminearum*, other pathways of response to oxidative stress may compensate the lack of ap1 in response to H₂O₂. However, the deleted mutant for *Fgap1* was more sensitive to cadmium, NaCl and sorbitol. Concerning cadmium stress, our results were in full accordance with the observation that in *S. pombe* and *C. albicans*, deletion of ap1 resulted in an increased sensitivity to cadmium (Alarco and Raymond, 1999, Toone et al., 1998). Studies in *S. pombe* have demonstrated that overexpression of ap1 results in an increased expression of genes encoding ABC-type transporters. These proteins, when overexpressed, result in resistance to drugs (Nagao et al., 1995, Toone et al., 1998). These proteins could also be regulated by ap1 in *F. graminearum*. This could explain the phenotype of our deleted strain in response to cadmium. Furthermore, studies have demonstrated that in *S. pombe*, ap1 and styl are part of the same signal transduction pathway. Styl is activated by MAPK pathways in response to numerous stresses (Toone et al., 1998). This could explain the phenotype of the *F. graminearum* deleted ap1 strain in response to osmotic stress.

We previously showed that oxidative stress stimulated the accumulation of type B trichothecenes and *Tri* genes expression (Ponts et al., 2007). Here we clearly showed that *Fgap1* was involved in the regulation of toxin accumulation through modulation of *Tri* genes expression. The fact that the absence of ap1 resulted in an increase in toxin accumulation and *Tri* genes expression argue, however, in favor of an indirect effect. This is corroborated by the fact that the overexpression of the truncated form of *Fgap1* resulted in a strong down-regulation of *Tri* genes expression and toxin accumulation *in vitro*. These results correlate

with those observed in *A. parasiticus* and in *A. ochraceus*, where a deleted strain for *ap1* produced more toxins than the wild-type strain (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). H_2O_2 was demonstrated to accumulate in the media during the culture of *F. graminearum* (Ponts et al., 2009). We can make the hypothesis that the *ap1* deleted mutant is unable to scavenge properly this excess of oxidant. Then, an increase of trichothecenes production, which consumes oxygen species, could represent an alternative way to reduce this excess.

In our results, the wild-type strain showed an overexpression of *Tri* genes and an increased level of trichothecene accumulation in response to oxidative stress. This response was lost in the deleted mutant. Expression of the truncated form of *Fgap1* led to a strong down regulation of *Tri* genes and very few amounts of toxins even when an oxidative stress was applied. These results clearly demonstrate that *Fgap1* is involved in the regulation of trichothecene production in response to oxidative stress. The fact that overexpression of the truncated form strongly decreased the accumulation of trichothecenes suggests that the regulation by *Fgap1* is indirect. The truncation deletes the NES and is supposed to target *Fgap1* in the nucleus. If *Fgap1* was directly involved in *Tri* genes regulation, one could expect an increase of *Tri* genes expression. We can then raise the hypothesis that this *Tri* genes regulation operates via the control of the expression of one or various genes of which expression is controlled by *ap1*.

It has already been demonstrated that *ap1* was involved in the activation of OSR genes in several fungi (Reverberi et al., 2012, Toone et al., 1998). *Catalase* expression and *sod* expression were especially reduced in an *A. ochraceus* $\Delta Aoyap1$ mutant. As expected, *Fgap1* seems also strongly involved in the modulation of genes encoding antioxidant activities in *F. graminearum* as the absence of the gene resulted in a significant down regulation of the genes encoding catalase or *sod* activities. Surprisingly, for the truncated mutant, only one of these genes was strongly overexpressed. This gene encodes a putative MnSOD1. Others studies demonstrated that in *S. cerevisiae*, both *ap1* and *skn7* are necessary to activate genes involved

in response to oxidative stress, via the NES of ap1 (Lee et al., 1999). Here, the absence of the NES could impair the activation of OSR genes as the cooperation with *skn7* become impossible. This could explain why OSR genes are strongly down regulated when *Fgap1* is absent but not up-regulated when *Fgap1* is truncated. In order to explain the fact that the truncated version of *Fgap1* results in a strong overexpression of MnSOD1, we raise the hypothesis that this gene only requires ap1 for its activation and does not need the interaction with *skn7*. Blastp with this MnSOD1 showed that this sequence is homologous to the mitochondrial SOD of *S. cerevisiae*. Mitochondria are particularly sensitive to oxidative stress and play a central role in fungal cells (Osiewacz, 2011). This raises the hypothesis that regulation of the trichothecene pathway may be interconnected with the regulation of the mitochondrial metabolism of oxidative species. This observation is in agreement with the already described connection of secondary metabolism with mitochondrial metabolism (Kiel et al., 2005, Maggio-Hall et al., 2005).

Our results demonstrate that even if the *ap1* deleted strain produced more toxins than the wild-type strain *in vitro*, the deletion had no impact on pathogenicity and virulence *in planta*. This last result is consistent with results observed with *B. cinerea* or *C. heterostrophus* where the deletion of the ap1 factor showed no effect on virulence (Lev et al., 2005, Temme and Tudzynski, 2009) but is opposite to the central role in virulence reported for *M. oryzae* (Guo et al., 2011). This difference could come from the fact that the function of ap1 as pathogenicity factor is limited to biotroph pathogens (Temme and Tudzynski, 2009). To our knowledge, this is the first time that such a truncated form of ap1 was tested for pathogenicity. This mutant appears slightly less virulent and seems to produce lower levels of trichothecene *in planta* than the wild-type strain. It was demonstrated that trichothecene production in *F. graminearum* acts as an aggressiveness factor (Proctor et al., 1995). Therefore, the slight reduction in virulence we observed could result from the decrease in

trichothecene production. Our result *in planta* differs slightly from the results obtained *in vitro* where the strain with the truncated ap1 consistently produced very low level of toxins. The difference observed between *in vitro* and *in planta* data could result from the occurrence of other compounds *in planta* such as agmatine, for example, that can stimulate toxin production and mask the effect of ap1 modification (Gardiner et al., 2009). Trichothecene induction by plant compounds could then greatly hide the negative effect of the truncated ap1. Our study demonstrates that the regulation of the trichothecene pathway is linked to the metabolism of oxidative species in *F. graminearum*. This regulation seems to be indirectly controlled by Fgap1. According to our results, antioxidant activities controlled by ap1, such as mitochondrial MnSOD1, may be involved in OSR control, and could also play a key role in regulation of TCTB production. Further studies are needed to fully understand the role played by ap1 in the network involved in the regulation of response to stress and its link with secondary metabolism.

Acknowledgments

The authors thank Vance C. Huskins for editing and proofreading this research article.

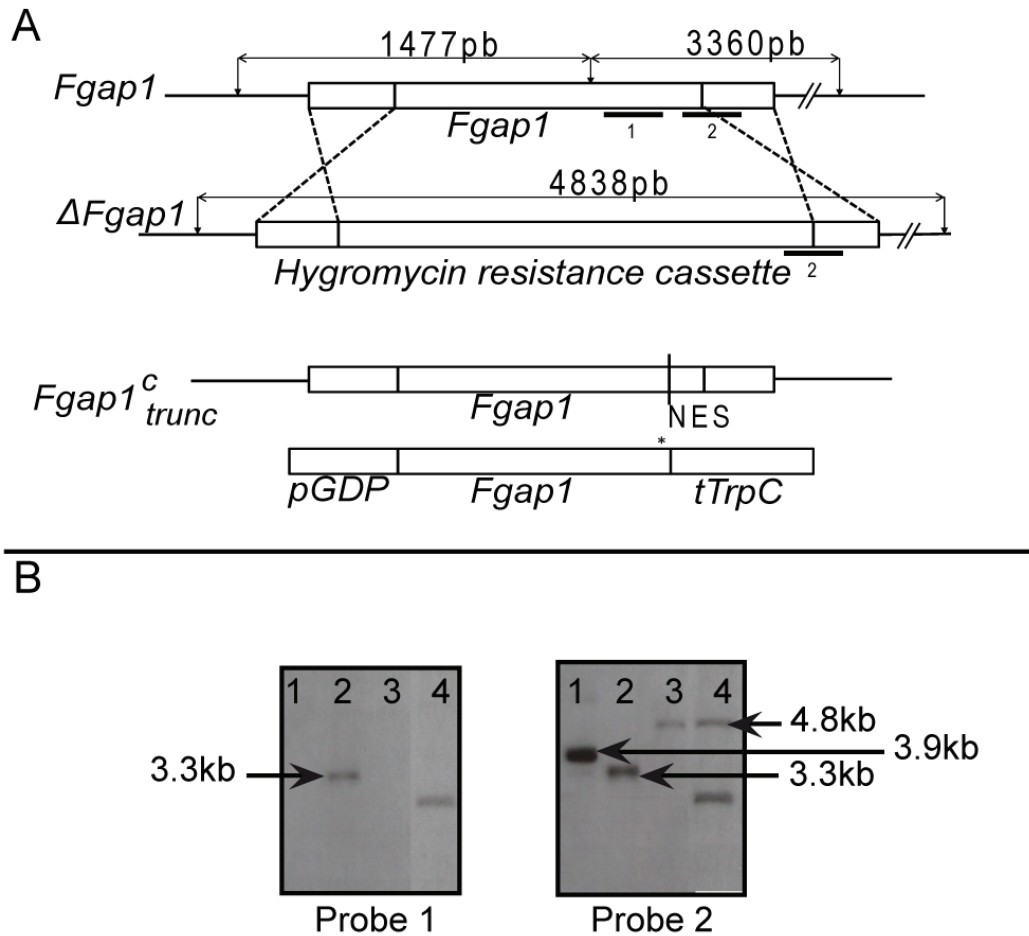


Figure S2: Construction of $\Delta Fgap1$ and $Fgap1^c_{trunc}$ mutants. (A) Maps of $Fgap1^{wt}$ locus, the $\Delta Fgap1$ construct containing the hygromycin resistance cassette and the $Fgap1^c_{trunc}$ construction. * corresponds to the integrated codon stop. Bars represent labeled probes 1 and 2 used for the southern blot hybridization. For the $\Delta Fgap1$ construct, among the 21 hygromycin resistant transformants, only 6 contained the replacement construct integrated at the $Fgap1$ locus. The transformant number 15 was selected for complementation with the wild-type copy of $Fgap1$. Both transformant number 15 and one of the wild-type complemented transformants were submitted to a control by Southern blot analysis, using probe 1 or 2. Vertical black arrows stand for *SalI* restriction sites. For the $Fgap1^c_{trunc}$ construct, among 27 hygromycin resistant transformants, 5 contained the truncated construction. They were cultured in GYEP medium and after 11 days of growth, 4 produced few amounts of toxins. Overexpression of *Fgap1* was analyzed by Q-RT-PCR. They were analyzed by southern blot using digestion with *PstI* and the probe 2 to ensure that the construction was ectopic and to control the number of integrations. One transformant presented one integration and was selected for further experiments (data not shown). This transformant was analyzed by Q-RT-PCR analysis, confirming that *Fgap1* was overexpressed 10 times. This mutant was called $Fgap1^c_{trunc}$ and retained for further experiments. (B) Southern blot hybridization. 1: pBCSK $\Delta Fgap1$ (plasmid carrying the deletion construction); 2: wild-type strain; 3: $\Delta Fgap1$; 4: $\Delta Fgap1:ap1$. In the pBCSK $\Delta Fgap1$, probe 2 reveals a fragment of 3.9 kb when digested with *BamHI*. In the wild type strain, probe 1 and 2 reveal a 3.3 kb fragment when digested with *SalI*. In the $\Delta Fgap1$ strain, probe 2 reveals a 4.8 kb fragment when digested with *SalI*. In the complemented strain $\Delta Fgap1:ap1$, probe 1 and probe 2 reveal a fragment of unknown size due to ectopic integration of the wild-type copy of *Fgap1* when digested with *SalI*.

Etude de la localisation subcellulaire de *Fgap1*

I- Introduction

Plusieurs études réalisées chez les champignons filamenteux mais également chez les levures ont mis en évidence une activation du facteur *ap1* par sa localisation nucléaire (Guo et al., 2011, Takahashi et al., 2010, Walther and Wendland, 2012, Yang et al., 2009). En conditions normales chez *S. cerevisiae*, le facteur passe du noyau au cytoplasme *via* une exportine reconnaissant un signal d'export nucléaire et passe du cytoplasme au noyau *via* une importine. L'activité de l'exportine étant majoritaire, le facteur est cytoplasmique. En conditions de stress oxydant, chez *S. cerevisiae*, le signal d'export nucléaire du facteur est masqué, le facteur n'est plus exporté vers le cytoplasme et se retrouve localisé au noyau, où il active l'expression de ses gènes cibles (Kuge et al., 1997, Yan et al., 1998).

Pour mettre en évidence la localisation subcellulaire de *Fgap1* chez *F. graminearum*, un marquage par fusion de *Fgap1* avec une protéine fluorescente a été envisagé. Une grande quantité de protéines fluorescentes sont maintenant disponibles. L'eGFP a été choisie car elle présente une optimisation de son repliement mais également une luminosité plus importante, comparée à la GFP sauvage (Muller-Taubenberger and Anderson, 2007). Cette forme de la protéine fluorescente est connue pour donner de bons résultats chez les champignons (données personnelles – Christian Barreau). Le gène codant pour cette eGFP nous a été fourni par Corinne Clavé (Université de Bordeaux).

Nous avons envisagé plusieurs constructions. Nous avons d'abord souhaité placer le gène codant pour la eGFP en amont ou en aval du gène sauvage *Fgap1*, pour visualiser la relocalisation éventuelle au noyau en réponse au stress oxydant. Nous avons également voulu placer ce gène en amont ou en aval de la construction tronquée *Fgap1^ctrunc* pour visualiser si le

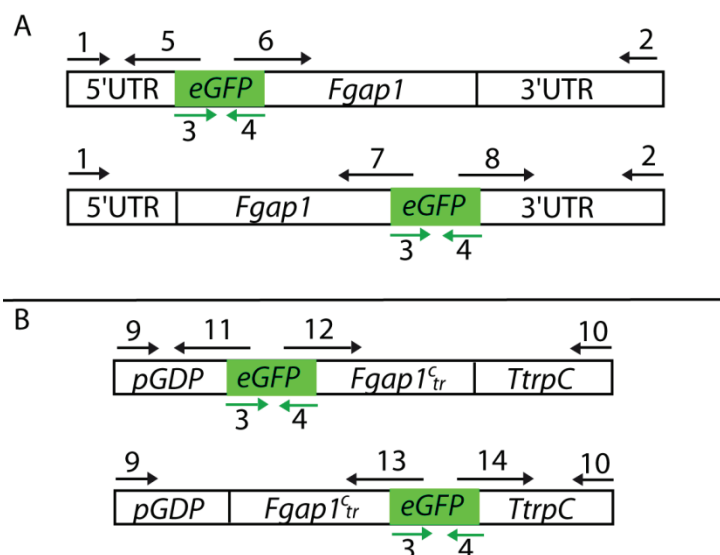


Figure 1 : Schémas des constructions envisagées avec la eGFP. (A) eGFP placée en amont ou en aval du gène sauvage *Fgap1*. (B) eGFP placée en amont ou en aval de la construction tronquée *Fgap1^ctrunc*. Les numéros et les flèches représentent les amorces utilisées et leur sens.

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées pour les constructions avec la eGFP.

AMORCE	SEQUENCE 5'→3'
1	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGCGTCTACCCAGGTGTC
2	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCCTGCGCACGTTTTGTATTTG
3	GTGAGCAAGGGCGAGGAG
4	CTTGTACAGCTCGTCCATG
5	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATCGCGAGTGATGGGCTGTGA
6	GGCATGGACGAGCTGTACAAGAGATCTGCTTCTACCGGCACTGGA
7	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATAGATCTAGCTGATAGACCAAGGTGCG
8	ATGGACGAGCTGTACAAGTGAGACCGGGCTTACCAACAAG
9	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTAGAATTCCCTTGTATCTCTACAC
10	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTAGAATTCAAGAGCGGATTCTCAGTC
11	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATTAAAGGTTCTTGGATGGGA
12	TGGACGAGCTGTACAAGGCTTCTACCGGCACTGGAG
13	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTGCCTTGGGACAAGCTTGGA
14	ATGGACGAGCTGTACAAGTAACACTTAACGTTACTGAAATCATC

fait d'éliminer le signal d'export nucléaire permettait bien d'obtenir une localisation nucléaire constitutive.

II- Procédures expérimentales

Constructions

Les constructions avec la eGFP envisagées sont résumées dans la Figure 1. Les amorces utilisées pour les constructions sont résumées dans le Tableau 1. Les amorces 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13 et 14 contiennent des régions chevauchantes avec la eGFP pour permettre la recombinaison homologue. Les amorces 1, 2, 9 et 10 contiennent des régions chevauchantes avec le plasmide pRS426 (Figure 1). Les réactions de PCR pour l'amplification de chacun des fragments ont été réalisées avec les amorces regroupées dans le Tableau 1 et la HiFi™ HotStart DNA polymerase (Kapabiosystems, United-States) comme suit : 95°C durant 5 min, 35 × [98°C durant 20 s, 64°C durant 15 s, 72°C durant 30 s/kb], 72°C durant 5 min. Les constructions finales ont été obtenues en transformant la souche de levure FY1679 avec à chaque fois les trois produits PCR et le plasmide pRS426 digéré par *BamHI* and *HindIII* comme déjà réalisé dans l'article 1, pour permettre la recombinaison multiple *via* les séquences chevauchantes. Les constructions complètes ont été amplifiées après extraction de l'ADN génomique de levure (Collopy et al., 2010) en utilisant les amorces 1 et 2 pour le gène sauvage et 9 et 10 pour le gène tronqué. Les PCR ont été réalisées avec la Kapa2G Robust DNA polymerase (Kapabiosystems, United-States) comme suit : 95°C durant 3 min, 35 × [95°C durant 30 s, 60°C durant 30 s, 72°C durant 30 s/kb], 72°C durant 60s/kb. La fidélité des constructions a été confirmée par séquençage (Cogenics – Genome Express Grenoble – France).

Les constructions ont ensuite été utilisées pour transformer des protoplastes de la souche sauvage (comme précédemment décrit dans l'article 1), en co-transformation avec la cassette hygromycine. Les transformants obtenus ont été isolés et l'ADN a été extrait à partir de 50 mg de mycélium congelé et lyophilisé comme précédemment décrit (Javerzat et al., 1993). La présence de la eGFP a été vérifiée par PCR avec la GoTaq DNA polymérase (Promega, France) selon les instructions du fournisseur. Les transformants obtenus sont vérifiés par une analyse Western-blot.

Western-blot

Le mycélium du transformant, de la souche sauvage (contrôle négatif) et d'une souche témoin positif transformée avec la construction *pGPD :: eGFP* ont été lyophilisés puis congelés. Les culots ont ensuite été resuspendus avec 5 volumes d'acétate de lithium 2 M, puis incubés 5 min sur glace. Après centrifugation 10 min à 4°C et 6000 g, le surnageant a été éliminé. Cinq volumes de NaOH 0.4 M ont été ajoutés et le tout a été incubé 5 min sur glace. Après centrifugation à 4°C, 10 min à 6000 g, le surnageant a été éliminé et le culot resuspendu dans 1 mL de tampon Laemmi 1X (Promega, France). Après 10 min d'ébullition, les échantillons ont été centrifugés 15 min à 12000g et à température ambiante. Les surnageants ont été récupérés et stockés à -80°C jusqu'à analyse.

Les protéines contenues dans 20 µL de chaque échantillon ont été séparées par SDS-PAGE, avec un gel Criterion TGX stain-free AnyKD (Bio-rad) selon les instructions du fournisseur. Le transfert des protéines a été effectué sur une membrane PVDF 0.2 µm (Bio-rad) selon les instructions du fournisseur. Après transfert, la membrane a été rincée 2 fois avec de l'eau milliQ puis traitée à 4°C pendant 12 h avec une solution bloquante (4 mL de Western breeze blocker/diluent part A (Life Technologies), 6 mL de Western breeze blocker/diluent part B (Life Technologies), H₂O milliQ qsp 20 mL). Après deux rinçages successifs de 5 min dans

de l'eau milliQ, la membrane a été placée 1 h à température ambiante sous agitation en présence de l'anticorps primaire anti-GFP (GFP Antibody (FL) HRP, Santa cruz biotechnology) dilué au 1/5000 dans une solution de dilution (4 mL de Western breeze blocker/diluent part A (Life Technologies), 2 mL de Western breeze blocker/diluent part B (Life Technologies), H₂O milliQ qsp 20 mL). Après 4 rinçages de 5 min dans une solution de lavage 1X (Western breeze wash solution, Life technologies), la membrane a été placée 30 min à température ambiante sous agitation en présence de l'anticorps secondaire (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa cruz biotechnology) dilué au 1/10000 dans une solution de dilution (4 mL de Western breeze blocker/diluent part A (Life Technologies), 2 mL de Western breeze blocker/diluent part B (Life Technologies), H₂O milliQ qsp 20 mL). Après 4 rinçages de 5 min dans la solution de lavage 1X, la membrane a été rincée 3 fois dans de l'eau milliQ. La révélation a été effectuée avec du substrat luminol/enhancer solution (Thermo Scientific) selon les instructions du fournisseur.

Observations microscopiques

Le transformant *eGFP::Fgap1* a été cultivé 48 h en milieu GYEP puis placé 2 h en présence d' H₂O₂ 10 mM avant de réaliser une observation au microscope à épifluorescence pour détecter la présence de l'eGFP. Le mycélium traité a été placé en présence d'une solution de fixation 1X (Formaldéhyde 4%, PBS 1X, Triton 10X) et incubé 30 min. L'excès de liquide a été éliminé et 50 µL de DAPI à 1µg/mL ont été déposés sur le mycélium. Après 5 min d'incubation à l'obscurité, le mycélium a été rincé 3 fois avec du PBS 1X puis fixé entre lame et lamelle pour l'observation microscopique. Les images ont été prises avec un microscope Nikon E800 associé à une caméra Coolsnap HQ2, pilotée par le logiciel Metavue. L'analyse d'images a ensuite été réalisée avec le logiciel ImageJ.

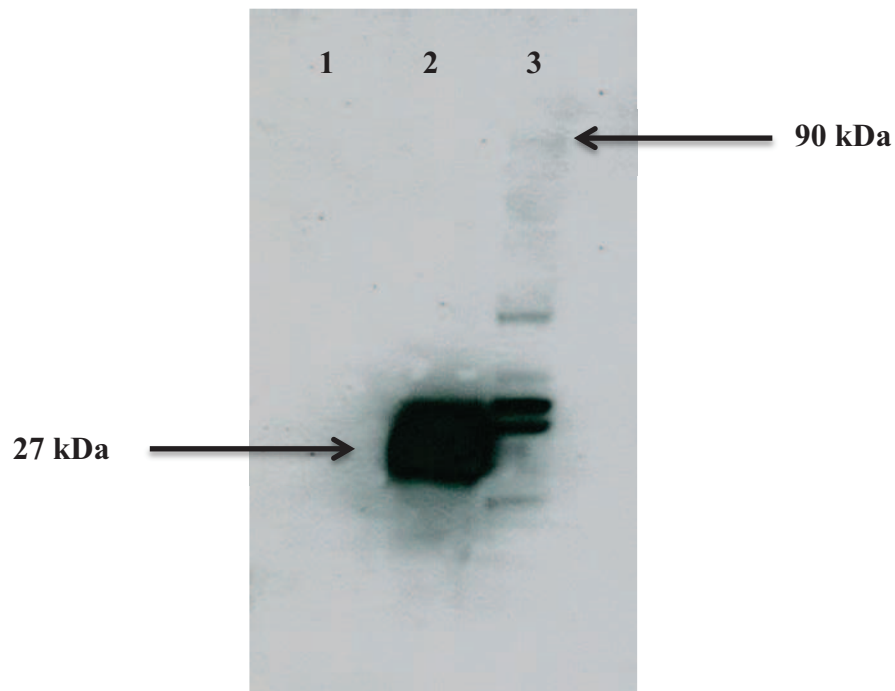


Figure 2 : Western-blot montrant l'expression de l'eGFP. La piste 1 montre la souche sauvage (témoin négatif), la piste 2 montre la souche sauvage transformée avec l'eGFP placée derrière un promoteur fort (témoin positif), la piste 3 montre le transformant testé.

III- Résultats et discussion

Après avoir réalisé la transformation de levure pour obtenir les constructions « eGFP », seules deux sur les quatre souhaitées (voir Figure 1) ont pu être obtenues par PCR : les constructions avec l'eGFP placée en amont ou en aval du gène sauvage. Nous avons d'abord tenté de cloner ces constructions chez *E. coli* pour les introduire dans un plasmide pCB1004 (Carroll et al., 1994) contenant la cassette de résistance à l'hygromycine. Ces manipulations n'ont pas fonctionné, peut-être à cause d'une toxicité excessive pour la bactérie de la combinaison promoteur du gène *Fgap1* et eGFP. Nous avons alors décidé de co-transformer des protoplastes de *F. graminearum* directement avec la construction ayant l'eGFP en amont ou en aval du gène *Fgap1* et la cassette portant la résistance à l'hygromycine. Nous avons obtenu 16 transformants avec la construction de l'eGFP en amont et 8 transformants avec la construction de l'eGFP en aval. La présence de la séquence de l'eGFP a été vérifiée chez les transformants par PCR et seulement un transformant avec la construction eGFP en amont du gène *Fgap1* présentait clairement la présence de la séquence eGFP. Il a été analysé par Western-blot, en utilisant un anticorps dirigé contre l'eGFP (Figure 2). L'eGFP seule donne une taille attendue de 27 kDa, et l'eGFP couplée à *Fgap1* a une taille attendue de 90 kDa. En piste 1, le témoin négatif ne présente pas de marquage eGFP, en piste 2, la souche témoin transformée avec la construction *pGDP::eGFP*, présente bien une bande à la taille attendue de 27 kDa. Notre transformant présente quant à lui plusieurs bandes dont la plupart sont de tailles trop faibles par rapport à la taille attendue de 90 kDa. Cependant des traces sont détectables au niveau de la taille attendue de 90 kDa (Figure 2). Ce résultat signifie que soit la protéine de fusion est dégradée à cause de sa grande instabilité, soit que des protéines tronquées sont synthétisées à cause d'une intégration partielle et multiple de la construction.

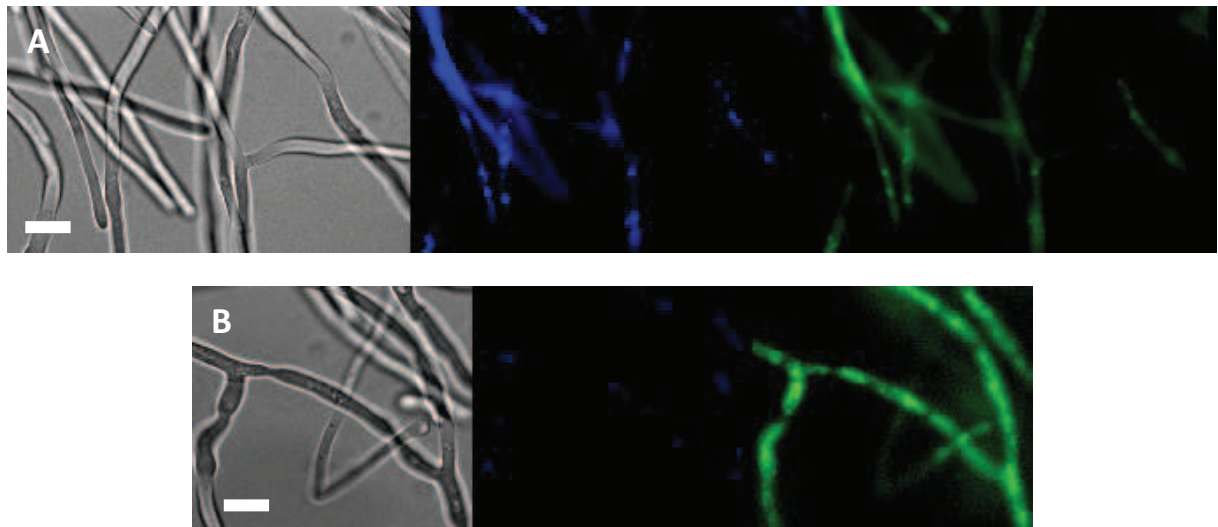


Figure 3 : Localisation de la fusion *eGFP::Fgap1*. L'image est montrée en lumière blanche, avec le filtre DAPI et avec le filtre GFP (échelle 10 µm). A : Champ où le DAPI et la eGFP se superposent. B : Champ où le DAPI et la eGFP ne se superposent pas.

Il serait intéressant d'essayer de réaliser à nouveau cette construction en testant d'autres protéines fluorescentes, ou en adoptant une autre stratégie. Ainsi, la sGFP, plus petite que l'eGFP, a été utilisé chez *A. alternata* ou chez *N. crassa* (Takahashi et al., 2010, Yang et al., 2009). De même, il serait intéressant d'essayer de placer la fusion *GFP :: Fgap1* derrière un promoteur inductible, ou un promoteur fort. L'autre alternative serait d'utiliser un anticorps monoclonal directement dirigé contre la partie N-terminale de la protéine, pour une observation par immunofluorescence. De tels anticorps peuvent être élaborés par des fournisseurs spécifiques, à partir de la séquence de la protéine.

Malgré la présence d'une protéine présentant plusieurs tailles sur le western-blot, nous avons voulu observer au microscope à épifluorescence la localisation de la eGFP en parallèle avec une coloration des noyaux au DAPI. Dans certaines parties des champs d'observation, nous avons parfois observé une co-localisation des noyaux avec la fluorescence de l'eGFP en présence d'un stress oxydant comme indiqué dans la Figure 3-A. Cependant ce phénomène n'était pas observable dans tous les champs et la plupart du temps, une fluorescence diffuse de l'eGFP était observable (Figure 3-B), non superposable avec les noyaux colorés au DAPI. Ces observations semblent être cohérentes avec le fait que la protéine de fusion est dégradée. Nous n'avons cependant pas pu démontrer de façon claire qu'un stress oxydant de type H_2O_2 induisait la relocalisation de *Fgap1* au noyau.

Références

- ALARCO, A. M. & RAYMOND, M. 1999. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 181, 700-8.
- ALEXANDER, N. J., PROCTOR, R. H. & MCCORMICK, S. P. 2009. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28, 198-215.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- CARROLL, A. M., SWEIGARD, A. J. & VALENT, B. 1994. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genet. Newsl.*, 41, 22.
- 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.
- COLLOPY, P. D., COLOT, H. V., PARK, G., RINGELBERG, C., CREW, C. M., BORKOVICH, K. A. & DUNLAP, J. C. 2010. High-throughput construction of gene deletion cassettes for generation of *Neurospora crassa* knockout strains. *Methods in molecular biology*, 638, 33-40.
- DESJARDINS, A. E., HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1993. Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species - Chemistry, Genetics, and Significance. *Microbiological Reviews*, 57, 595-604.
- FLORENT, M., NOËL, T., RUPRICH-ROBERT, G., DA SILVA, B., FITTON-OUHABI, V., CHASTIN, C., PAPON, N. & CHAPELAND-LECLERC, F. 2009. Nonsense and Missense Mutations in FCY2 and FCY1 Genes Are Responsible for Flucytosine Resistance and Flucytosine-Fluconazole Cross-Resistance in Clinical Isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2982-2990.
- GARDINER, D. M., KAZAN, K. & MANNERS, J. M. 2009. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol*, 46, 604-613.
- GILES, SS., STAJICH, JE., NICHOLS, C., GERRALD, QD., ALSPAUGH, JA., DIETRICH, F., & PERFECT, JR. 2006. The *Cryptococcus neoformans* Catalase Gene Family and Its Role in Antioxidant Defense. *Eukaryotic Cell* 5: 1447-1459.
- GOSWAMI, R. S. & KISTLER, H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- GUO, M., CHEN, Y., DU, Y., DONG, Y., GUO, W., ZHAI, S., ZHANG, H., DONG, S., ZHANG, Z., WANG, Y., WANG, P. & ZHENG, X. 2011. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens*, 7, e1001302.
- HELLER, J. & TUDZYNSKI, P. 2011. Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. In: VANALFEN, N. K., BRUENING, G. & LEACH, J. E. (eds.) *Annual Review of Phytopathology*, Vol 49. Palo Alto: Annual Reviews.
- ILGEN, P., HADELER, B., MAIER, F. J. & SCHÄFER, W. 2009. Developing Kernel and Rachis Node Induce the Trichothecene Pathway of *Fusarium graminearum* During Wheat Head Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 899-908.
- JAMIESON, D. J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 1511-27.

- JAVERZAT, J. P., BHATTACHERJEE, V. & BARREAU, C. 1993. Isolation of telomeric DNA from the filamentous fungus *Podospora anserina* and construction of a self-replicating linear plasmid showing high transformation frequency. *Nucleic Acids Res*, 21, 497-504.
- JENCZMIONKA, N. & SCHÄFER, W. 2005. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Current Genetics*, 47, 29-36.
- KIEL, J. A., VAN DER KLEI, I. J., VAN DEN BERG, M. A., BOVENBERG, R. A. & VEENHUIS, M. 2005. Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol*, 42, 154-64.
- KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S. & FUJIMURA, M. 2007. Molecular and genetic studies of *fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 2105-23.
- KUGE, S., JONES, N. & NOMOTO, A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J*, 16, 1710-1720.
- LEE, J., GODON, C., LAGNIEL, G., SPECTOR, D., GARIN, J., LABARRE, J. & TOLEDANO, M. B. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 274, 16040-6.
- LEV, S., HADAR, R., AMEDEO, P., BAKER, S. E., YODER, O. C. & HORWITZ, B. A. 2005. Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryotic Cell*, 4, 443-454.
- MAGGIO-HALL, L. A., WILSON, R. A. & KELLER, N. P. 2005. Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production in planta. *Mol Plant Microbe Interact*, 18, 783-93.
- MAREK, E. T., SCHARDL, C. L. & SMITH, D. A. 1989. Molecular transformation of *Fusarium solani* with an antibiotic resistance marker having no fungal DNA homology. *Curr Genet*, 15, 421-428.
- MCCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3, 802-814.
- MERHEJ, J., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2011. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91, 519-28.
- MONTIBUS, M., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F., BARREAU, C. & PONTS, N. 2013. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, in press.
- MOYE-ROWLEY, W. S. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic cell*, 2, 381-9.
- MULLER-TAUBENBERGER, A. & ANDERSON, K. I. 2007. Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 1-12.
- NAGAO, K., TAGUCHI, Y., ARIOKA, M., KADOKURA, H., TAKATSUKI, A., YODA, K. & YAMASAKI, M. 1995. bfr1+, a novel gene of *Schizosaccharomyces pombe* which confers brefeldin A resistance, is structurally related to the ATP-binding cassette superfamily. *J Bacteriol*, 177, 1536-43.
- NGUYEN, T. V., KRÖGER, C., BÖNNIGHAUSEN, J., SCHÄFER, W. & BORMANN, J. 2013. The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.

- OSIEWACZ, H. D. 2011. Mitochondrial quality control in aging and lifespan control of the fungal aging model *Podospira anserina*. *Biochem Soc Trans*, 39, 1488-92.
- 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. & DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 1-10.
- PONTS, N., COUEDELO, L., PINSON-GADAIS, L., VERDAL-BONNIN, M. N., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2009. Fusarium response to oxidative stress by H₂O₂ in trichothecene chemotype-dependent. *FEMS Microbiol Lett*, 293, 255-262.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BARREAU, C., RICHARD-FORGET, F. & OUELLET, T. 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *Febs Letters*, 581, 443-447.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. 2003. H₂O₂ effects on trichothecenes B (DON, ADON) production by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *Aspects of Applied Biology*, 68.
- 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.
- PROCTOR, R. H., HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 593-601.
- PUNT, P. J., DINGEMANSE, M. A., KUYVENHOVEN, A., SOEDE, R. D. M., POUWELS, P. H. & VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. 1990. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93, 101-109.
- QIAO, J., LIU, W. & LI, R. 2010. Truncated *Afyap1* Attenuates Antifungal Susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to Voriconazole and Confers Adaptation of the Fungus to Oxidative Stress. *Mycopathologia* [Online], 170.
- REVERBERI, M., GAZZETTI, K., PUNELLI, F., SCARPARI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., FABBRI, A. & FANELLI, C. 2012. *Aoyap1* regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 1293-1304.
- REVERBERI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., PUNELLI, F., CAMERA, E., FABBRI, C., PICARDO, M., FANELLI, C. & FABBRI, A. A. 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene. *Eukaryotic cell*, 7, 988-1000.
- ROCHA, O., ANSARI, K. & DOOHAN, F. M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22, 369-378.
- RODRIGUES-POUSADA, C., MENEZES, R. A. & PIMENTEL, C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*, 27, 245-258.
- RODRIGUES-POUSADA, C. A., NEVITT, T., MENEZES, R., AZEVEDO, D., PEREIRA, J. & AMARAL, C. 2004. Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS letters*, 567, 80-85.
- SEONG, K. Y., PASQUALI, M., ZHOU, X., SONG, J., HILBURN, K., MCCORMICK, S., DONG, Y., XU, J. R. & KISTLER, H. C. 2009. Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis. *Mol Microbiol*, 72, 354-67.

- SHETTY, N., JØRGENSEN, H., JENSEN, J., COLLINGE, D. & SHETTY, H. 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 267-280.
- TAKAHASHI, M., YAMASHITA, K., SHIOZAWA, A., ICHIISHI, A., FUKUMORI, F. & FUJIMURA, M. 2010. An AP-1-Like Transcription Factor, NAP-1, Regulates Expression of the Glutathione *S*-Transferase and NADH:Flavin Oxidoreductase Genes in *Neurospora crassa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74, 746-752.
- TEMME, N. & TUDZYNSKI, P. 2009. Does botrytis cinerea Ignore H₂O₂-induced oxidative stress during infection? Characterization of botrytis activator protein 1. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22, 987-98.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, Chapter 2, Unit 2.3.
- TOONE, W. M., KUGE, S., SAMUELS, M., MORGAN, B. A., TODA, T. & JONES, N. 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes & development*, 12, 1453-63.
- VIVANCOS, A., JARA, M., ZUIN, A., SANSÓ, M. & HIDALGO, E. 2006. Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 495-502.
- WALTHER, A. & WENDLAND, J. 2012. Yap1-dependent oxidative stress response provides a link to riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 697-707.
- YAN, C., LEE, L. H. & DAVIS, L. I. 1998. Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *The EMBO journal*, 17, 7416-29.
- YANG, F., SVENSSON, B. & FINNIE, C. 2011. Response of germinating barley seeds to *Fusarium graminearum*: The first molecular insight into *Fusarium* seedling blight. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*, 49, 1362-8.
- YANG, S. L., LIN, C.-H. & CHUNG, K.-R. 2009. Coordinate control of oxidative stress tolerance, vegetative growth, and fungal pathogenicity via the AP1 pathway in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 100-110.
- 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.

Chapitre 2 :
L'implication de
Fgap1 dans la réponse
au stress oxydant
est-elle chémotype-
dépendante ?

Dans le premier chapitre, nous avons mis en évidence le rôle de *Fgap1* dans la réponse au stress oxydant chez une souche de chémotype DON/ADON de *F. graminearum*, en lien avec la production de trichothécènes.

Au laboratoire, des études précédentes ont suggéré que la réponse au stress induit par H₂O₂ chez *F. graminearum* était chémotype-dépendante. En utilisant un panel de souches, Ponts et al, ont montré que la production de trichothécènes est induite chez les souches de chémotype DON/ADON alors qu'elle n'est pas affectée ou est réprimée chez les souches de chémotype NIV/FX (Ponts et al., 2009).

Dans ce chapitre, nous avons analysé l'implication de *Fgap1* dans cette réponse au stress oxydant, variable en fonction du chémotype. La souche *F. graminearum* INRA 605 de chémotype DON/ADON et le mutant $\Delta Fgap1$ correspondant du chapitre 1 de ce manuscrit ont été utilisés. En parallèle, une souche *F. graminearum* de chémotype NIV/FX, référencée INRA 91 dans notre laboratoire, a été utilisée. Un mutant $\Delta Fgap1$ de cette souche a été construit.

Les souches sauvages de chémotype DON/ADON et NIV/FX, avec leurs mutants $\Delta Fgap1$ respectifs ont été cultivés en présence ou non de pro-oxidants. L'effet sur la production de trichothécènes, sur l'expression des gènes *Tri* mais également sur la capacité détoxifiante des souches a été analysé.

Is the *Fgap1* mediated response to oxidative stress chemotype-dependent in *F. graminearum*?

Mathilde Montibus ^{1 *}, Claire Khosravi ¹, Florence Richard-Forget ¹ and Christian Barreau ².

¹INRA, UR1264 MycSA, 71, Avenue Edouard Bourlaux, CS20032, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex, France.

²CNRS, UR1264 MycSA, 71, Avenue Edouard Bourlaux, CS20032, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

Rédigée pour soumission dans « FEMS Microbiology Letters »

Keywords : Oxidant, chemotype, mycotoxins.

Abstract

This study aims to determine the impact of oxidative stress on TCTB production. The response to diamide was compared in a DON/ADON and a NIV/FX strain. In both cases, levels of TCTB production were strongly influenced by treatment with diamide and *Fgap1* was involved in this regulation. With regards to *Tri* genes expression, stimulation of expression by diamide was highly pronounced in the NIV/FX strain. In a same way, genes encoding catalase activities were strongly expressed in this strain then exposed to diamide. This finding was correlated with a large increase in global catalase activity. Our data show that the response to diamide is mediated by *Fgap1*, and that strains of the NIV/FX chemotype have developed high antioxidant capacities in response to oxidative stress.

I- Introduction

Fusarium graminearum is the main causal agent of *Fusarium* head blight (FHB) disease that affects small grain cereals (Goswami and Kistler, 2004, Windels, 2000). An additional issue regarding FHB is the production by the fungus of toxic secondary metabolites named type B trichothecenes (Kimura et al., 2007). They consist of deoxynivalenol (DON) and its acetylated C-3 and C-15 derivatives (3ADON and 15ADON), and nivalenol (NIV) and its C-4 acetylated derivative (4ANIV or FX) (Kimura et al., 2007). Genes involved in the type B trichothecenes biosynthetic pathway have been identified and named *Tri* genes (Alexander et al., 2009, McCormick et al., 2011). Based on their ability to produce type B trichothecenes, *F. graminearum* strains are divided in two chemotypes: the NIV chemotype, for isolates producing NIV and FX, and the DON chemotype, for isolates producing DON and ADON (Ichinoe et al., 1983). These two chemotypes are determined by *Tri7* and *Tri13* genes, that are nonfunctional in the DON chemotype (Lee et al., 2002).

Trichothecenes are heat stable molecule, and are not degraded during current food processing (Rocha et al., 2005). As a result, the best way to restrict trichothecenes in food and feed is to limit their biosynthesis by the fungus before harvest and to improve control strategies. This requires increasing the knowledge on mechanisms that can regulate type B trichothecenes biosynthesis.

F. graminearum can trigger an oxidative burst (response of the plant cells under biotic stress) during infection of wheat or barley (Yang et al., 2011, Zhou et al., 2005). Furthermore, regarding the fungus, treatment with H₂O₂ results in an increase in trichothecenes accumulation, correlated with an increase in *Tri* genes expression (Ponts et al., 2007, Ponts et al., 2006). Additional study has suggested that this induction could be chemotype-dependent, as supplementation with H₂O₂ stimulates DON/ADON production, while this supplementation

does not affect or inhibits NIV/FX accumulation. This discrepancy was explained by differences in antioxidant defense responses, especially with regards to catalase activity. NIV isolates were shown to have a higher H₂O₂-destroying capacity, which was significantly enhanced when fungal cells were exposed to a H₂O₂ stress (Ponts et al., 2009). However molecular mechanisms involved in this differential response to oxidative stress have not yet been elucidated.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a large variety of transcription factors are activated by different oxidative stimuli including H₂O₂ (Moye-Rowley, 2003). Yap1 is one of these nuclear factors, for which a key role in the response to oxidative stress was ascribed (Rodrigues-Pousada et al., 2010). Under normal conditions, Yap1 is distributed between cytoplasm and nucleus. The factor is rapidly relocated to the nucleus after stress exposure (Kuge et al., 1997). Homologues of Yap1 have been identified in *Magnaporthe oryzae* (Guo et al., 2011), *Botrytis cinerea* (Temme and Tudzynski, 2009) or *Aspergillus spp.* (Qiao et al., 2010, Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). A link has even been made between oxidative stress response and regulation of secondary metabolism in filamentous fungi (Montibus et al., 2013b). This factor has also been identified in *F. graminearum* and named *Fgap1*. It has been recently shown that *Fgap1* is involved in response to oxidative stress and interestingly, in the regulation of DON/ADON accumulation (Montibus et al., 2013a)(submitted). However, nothing is known about the involvement of *Fgap1* in oxidative stress response for a NIV/FX strain.

In order to understand the discrepancy between DON/ADON and NIV/FX oxidative stress response, we developed a comparative approach using two strains of chemotype DON/ADON or NIV/FX. We first analysed the response to oxidative stress mediated by H₂O₂ and also diamide for the two strains. Then, we investigated whether *Fgap1*, described as a key

regulator of the oxidative stress response in a DON/ADON strain, performs the same function in a NIV/FX strain.

II- Materials and methods

II-1- Fungal strains, media and culture conditions

Two strains of *F. graminearum* INRA 605 (DON/15ADON chemotype) and INRA 91 (NIV/FX chemotype) were used in this study. These strains are from the INRA MycSA laboratory collection.

Experiments were performed in GYEP medium (Miller et al., 1983) or in MS medium containing saccharose (Merhej et al., 2010). Cultures were done in triplicate in 10 mL of GYEP in 50mL Erlenmeyer flasks, inoculated with 10^5 spores produced in CMC medium (15 g/L carboxymethyl cellulose, 1 g/L yeast extract, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L NH_4NO_3 , 1 g/L KH_2PO_4) and incubated in darkness at 25°C and at 150 rpm in a multitron incubator shaker (INFORS AG, Bottmingen, Switzerland). Static cultures in petri plates were used for MS medium, with 8 mL inoculated with 10^5 spores/mL and incubated in darkness at 25°C.

Cultures were stopped by filtering under vacuum and aliquots of the filtrates were stored at -20°C. TCTB levels were determined from culture filtrates. Fungal biomass production was measured by weighting the mycelia after 48 h of freeze-drying. Fungal biomass used for RNA extraction was flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Cultures were supplemented with H_2O (control), 0.5 mM H_2O_2 or 0.5mM diamide.

For each trial, it was ensured that supplementation did not modify the pH values of the treated batches compared to controls. Similarly, it was established that the fungal biomass accumulation was not affected by the treatment, compared to controls (data not shown).

Table 1. Primers used for vector construction, transformants screening and semi-quantitative PCR analysis.

Primer	Sequence (5'→3')
neoHY-1-fin F	GGCCGCCCTGTCTCCGGTGTCCCT
neoHY-8-début R	CTAGAAGAGGTAAACCCGAAACG
YapAmontIFC F	GCAGCCCCGGGGGATCCCCGTCTACCCAGGTGTCCT
YapAvalIFC R	TAGAACTAGTGGATCCCTGCGCACGTTTTGTATTTG
YAPaval-HY F	GGACACCGGAGACAGGGCGGCCACCAACAAGATCCGGCTGTA
YAPAmont-HY R	GCGTTTCGGGTTTACCTCTTCTAGGGCTGTGAGGCTCGTAGAAG
Yap-amont-F-nested	CCCACCCATGTTAGTTCCTG
Yap-aval-R-nested	TGTGCCCCACTTGATGACTA
Yap-qPCR-F	TCTTCTACGAGCCTCACAGC
Tri4-F	TATTGTTGGCTACCCCAAGG
Tri4-R	TGTCAGATGCGCCTTACAAA
Tri5-F	GACCCTAAGCGACTACAG
Tri5-R	GTGCTACGGATAAGGTTC
Tri101-F	AGGGCATTAGCGAGGGAAACACA
Tri101-R	ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC
Catalase 1-F	GGAAAGCCAGAACCAAACAA
Catalase 1-R	CGTTGACGAGAGTGTAGGTGTTGA
Catalase 2-F	TCTCTCCCTCCAACATGGTC
Catalase 2-R	CAGGGTGCGTAGACTTGGTT
SOD 1-F	CTCTCCCCGATCTTCCCTAC
SOD 1-R	CGGGTAACGATGGACAGAGT
SOD 2-F	TTGCGTATCGTTACCACCAA
SOD 2-R	TCAACATAGGCAGCCTTTCC
GAPDH-F	TCAAGGGTGTTCTGGCCTAC
GAPDH-R	AGTAACCCCACTCGTTGTCG

II-2- Construction of a *Fgap1* deleted mutants

Deletion of the genomic copy of the *Fgap1* coding sequence in *F. graminearum* INRA 605 strain (DON/15ADON chemotype) has already been described (Montibus et al., 2013a)(submitted). The *Fgap1* coding sequence in the INRA 91 strain (NIV/FX chemotype) was replaced by an hygromycin resistance cassette using the construct already described for the DON/ADON strain (Figure S1) (Montibus et al., 2013a)(submitted). Briefly, the flanking regions corresponding to a 988 bp fragment upstream the starting codon and a 800 bp fragment downstream the stop codon of *Fgap1* were amplified using primers YapAmontIFC F/ YAPAmont-HY R and YAPaval-HY F/ YapAvalIFC R respectively (see Table 1). The hygromycin resistance cassette was amplified using primers neoHY-1-fin F/neoHY-8-début R (see Table 1) from the pBSCK neohygro plasmid, containing *hph* gene under the control of the *Neurospora crassa* *CPC1* promotor and the *Aspergillus nidulans* *trpC* terminator (Punt et al., 1990). The In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech) was used for recombination of the three PCR products via the hygromycin overlapping sequences and cloned in the pBCSK+ (Stratagene), according to the manufacturer's instruction, to give the pBCSKΔ*Fgap1* plasmid. The construction was amplified from this plasmid using primers Yap-amont-F-nested and Yap-aval-R-nested and was used to transform protoplasts of the *F. graminearum* INRA 91 strain.

II-3- Fungal transformation

Fungal transformation was managed as already described in Montibus et al, 2013a, submitted.

II-4- Nucleic acid manipulations, PCR and RT-PCR analysis

Genomic DNA was extracted from 50mg of lyophilized mycelium as previously described (Merhej et al., 2010). The DNA concentration was estimated using a Nanodrop ® ND 1000 spectrophotometer. For the transformants analysis, PCR was performed with the GoTaq DNA polymerase (Promega, France) using an iCycler™ (Bio-Rad). PCR reactions were performed in 25 µL reactions, using the primers listed in Table 1.

Fifty mg of frozen mycelium were grinded with a TissueLyser® (QIAGEN) 30 sec at 30 Hz before RNA extraction using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Removal of residual DNA using treatment with the TURBO DNA-free™ Kit (Ambion) was performed according to recommendations of manufacturer.

Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using the SuperScript III First-Strand RT-PCR (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained were stored at -20°C.

Semi-differential RT-PCR was performed in a 25µL mixture with GoTaq DNA polymerase (Promega) using the primers detailed in Table 1. Reactions were carried out for 20, 25 or 30 cycles of 30 sec of denaturation at 95°C, 30 sec of annealing at 60°C and 40 sec of extension at 72°C. 5µL of the PCR mixture were migrated on a 1% agarose gel. Expression was detected properly after 30 cycles.

Southern blot analysis of the transformants was managed with the DIG system from Roche (Germany) as previously described (Florent et al., 2009). Five µg of genomic DNA were digested with *SalI* and separated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel. The gel was transferred onto nylon membranes (Hybond N+, Amersham). Membranes were hybridized with DIG-labelled probe synthesized with a PCR DIG probe synthesis kit (Roche, Germany), following manufacturer's instructions. The probe was generated using primers Yap-qPCR-F and Yap-aval-R-nested (Table 1).

II-5- Type B trichothecene analyses

Four mL of filtrates were extracted with two volumes of ethyl acetate. Five mL of the organic phase were evaporated to dryness at 40°C under a nitrogen beam. Dried samples were resuspended in 200µL of methanol/water (50%, v/v) before analysis by high performance liquid chromatography as already described (Montibus et al., 2013a)(submitted).

II-6- Preparation of cell-free extracts

Harvested mycelia grown in GYEP liquid cultures were frozen at -20°C and freeze dried. Freeze dried mycelia (800 mg) were suspended in 10 mL of Tris-HCl 0.2 M, pH 7.6, containing 1% PVP, 0.5 mM dithiothreitol, and 0.1 µl/mL of Pefabloc[®] SC-protease inhibitor (Roche, Germany). The homogenate was incubated for 30 min on ice. Cell debris was removed by centrifugation (20.000 g, 30 min at 4°C).

II-7- Determination of catalase activity

Catalase activity in cell-free extracts was determined using the method of Aebi (Aebi, 1947). The reaction solution contains 10 mM of H₂O₂ in a 100 mM phosphate buffer, pH 7 and 100 µL of cell-free extracts in a total volume of 5 mL. The decomposition of H₂O₂ was followed by a decrease in A_{246nm} at 25°C, and quantified using an external calibration curve obtained with standards solutions of H₂O₂.

II-8- Expression of results and statistical analysis

All results were expressed as the arithmetic mean values ± SD of experiments performed in triplicate. Values were compared by performing the Student's t-test. The *p* value 0.05 was chosen as the point of statistical significance. Catalase activity was expressed as micromoles of H₂O₂ consumed per minute and per gram of dry biomass.

Table 2. Type B trichothecene accumulation in liquid cultures after 14 days of growth of *Fusarium graminearum* strains.

Isolate	<i>F. graminearum</i>	
	DON/ADON†	NIV/FX
Control	153.5 ± 51.9	33.8 ± 16.1
H ₂ O ₂ 0.5mM	1419.3 ± 498.1*	46.7 ± 3.1
Diamide 0.5mM	10447.8 ± 2355.8*	12280.6 ± 10.3*

†Values represent the average toxin yields in µg/g of dry biomass ± SD in three independent experiments

*is significantly different compared to the control condition (p=0.05)

III- Results

III-1- Impact of H₂O₂ and diamide on trichothecene B production by *Fusarium graminearum*

The effect of oxidative stress induced by H₂O₂ (0.5 mM) and diamide (0.5 mM) on the production of DON/ADON or NIV/FX was compared after 14 days. The concentrations chosen for H₂O₂ and diamide did not affect fungal growth, regardless of the considered strain (results not shown). Results obtained are summarized in Table 2.

As previously described for the DON/15ADON chemotype INRA 605 strain, supplementation with H₂O₂ resulted in a strong stimulation of trichothecene (DON + 15ADON) production after 14 days of culture. In addition, supplementation with diamide induced a significantly stronger increase (about 70 times more) than the supplementation with H₂O₂. Concerning the *F. graminearum* INRA 91 of chemotype NIV/FX, low levels of trichothecenes (NIV + FX) were produced in control conditions and this production was not significantly enhanced by H₂O₂ supplementation, confirming our previous results (Ponts et al., 2009). Surprisingly, in presence of diamide, the production of NIV and FX was very strongly enhanced reaching a level equivalent to that of DON/ADON in INRA 605.

Our data indicate that the response to diamide is not chemotype-dependent, which strongly differs of previous results obtained after exposure to a peroxide stress.

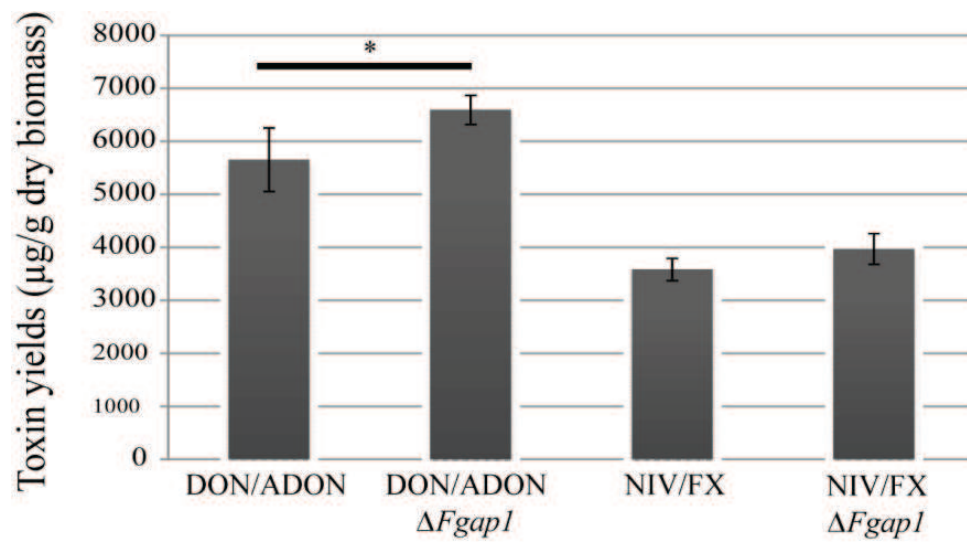


Fig. 1. TCTB biosynthesis by *Fusarium graminearum* DON/ADON (I605) or NIV/FX (I91) strains after 14 days of growth in MS medium. * indicates a significant difference ($p \leq 0.05$).

III-2- Effect of *Fgap1* deletion on TCTB production

The construction of the deleted strain for the DON/ADON chemotype has already been described (Montibus et al., 2013a)(submitted). To obtain the equivalent deletion in the NIV/FX background, the *F. graminearum* INRA 91 strain was transformed with the deletion construct, where the *Fgap1* coding sequence was replaced by a hygromycin resistance cassette (Figure S1) (Montibus et al., 2013a)(submitted). Among 20 transformants, 6 displayed the deletion construction by PCR and were analyzed by Southern-blot, to ensure that the wild-type copy of *Fgap1* was replaced correctly by the hygromycin resistance cassette. One deleted mutant was chosen for further experiment (Figure S1).

Because the NIV/FX strain produced few amounts of toxin in control conditions in GYEP medium (see Table 2), the effect of *Fgap1* deletion on TCTB production was analyzed using MS medium. As saccharose was demonstrated to be a good inductor of toxin production (Jiao et al., 2008), it was used as carbon source. The two wild-type strains and the two corresponding deleted mutants were cultured for 14 days in MS medium (Fig. 1). As observed above, in GYEP medium the NIV/FX strain produced fewer toxins than the DON/ADON strain. The deletion had low impact on toxin yields in the NIV/FX strain as the difference observed between the wild-type strain and the deleted strain was not significant. In the DON/ADON strain, as shown previously (Montibus et al., 2013a)(submitted), deletion of *Fgap1* resulted in a significant increase in toxin accumulation. This result confirms that *Fgap1* is involved in the regulation of toxin accumulation for the DON/ADON strain, but does not allow raising the same conclusion for the NIV/FX strain.

Table 3. Type B trichothecene accumulation in liquid cultures supplemented with diamide after 14 days of growth of *Fusarium graminearum* strains.

Isolate	DON/ADON†	DON/ADON <i>ΔFgap1</i>	NIV/FX	NIV/FX <i>ΔFgap1</i>
Diamide 0.5 mM	4091.3 ± 1039.2	3045.9 ± 658.4	1183.3 ± 389.9	217.8 ± 50.6*

†Values represent the average toxin yields in µg/g of dry biomass ± SD in three independent experiments

*is significantly different compared to the wild-type strain (p=0.05)

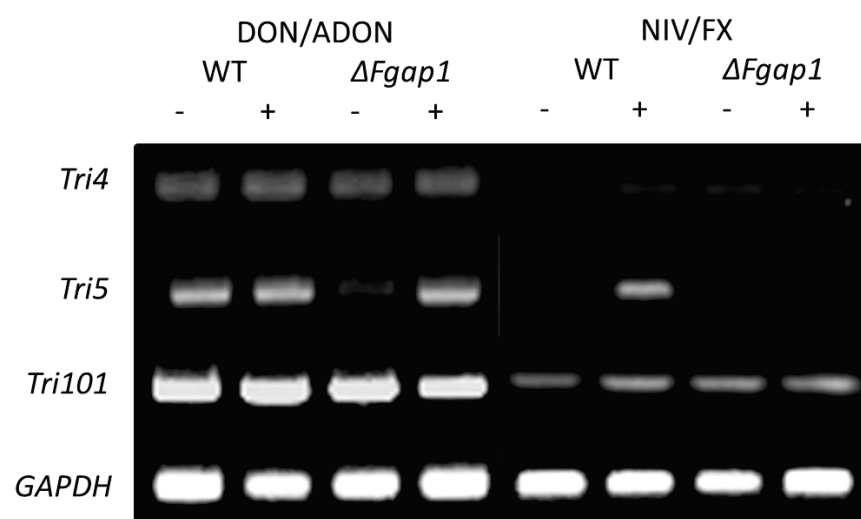


Fig. 2. Expression of *Tri4*, *Tri5*, *Tri101* and *GAPDH* analyzed by RT-PCR, at day 4 post-inoculation, for the wild-type strain (WT) and the *ΔFgap1* mutant of the DON/ADON chemotype or of the NIV/FX chemotype, in a medium supplemented (+) or not (-) with diamide 0.5mM.

III-3- *Fgap1* and the response to diamide mediated-oxidative stress

As diamide has a strong impact on toxin biosynthesis whatever the chemotype of the *F. graminearum* strain (see Table 2), we tested the effect of *Fgap1* deletion on the response to diamide in GYEP liquid cultures, for both chemotypes (Table 3). For the DON/ADON strain treated with diamide, deletion of *Fgap1* resulted in a slight non-significant decrease in toxin accumulation compared to the wild-type strain. The increase in toxin accumulation caused by diamide stress was lost. This result confirms previous results demonstrating that *Fgap1* is involved in response to stress mediated by H₂O₂ (Montibus et al., 2013a)(submitted). For the DON/ADON chemotype, our data allow to conclude that *Fgap1* is involved in stress response mediated by H₂O₂ or diamide. For the NIV/FX strain, the deleted mutant produced significantly less toxins than the wild-type strain in response to diamide. Again, the increase in toxin accumulation caused by diamide stress was lost. This result strongly suggests that *Fgap1* is also involved in response to oxidative stress in the NIV/FX chemotype.

We then analyzed the level of *Tri* genes expression in these cultures conditions. To see the effect at an earliest stage of culture, we extracted the RNAs at the moment trichothecenes start to be produced, i.e. after 4 days of growth (Fig. 2). The expression of *Tri4* (FGSG_03535), *Tri5* (FGSG_03537), two genes implicated in the earliest steps of the biosynthetic pathway, and *Tri101* (FGSG_07896) located outside the “*Tri* cluster”, were analyzed by RT-PCR in the wild-type and the $\Delta Fgap1$ mutant for the DON/ADON strain or for the NIV/FX strain. Expressions were compared in medium supplemented or not with 0.5 mM diamide. For each strain, *GAPDH* (FGSG_06257), used as control, showed a similar level of expression for all the tested conditions (Fig. 2). The data obtained for the DON/ADON strain showed that the expression of *Tri4* and *Tri101* was not affected whatever the treatment. The expression of *Tri5* seemed slightly reduced for the non-treated $\Delta Fgap1$ mutant. The data obtained for the NIV/FX strain showed that the expression of *Tri4* and *Tri101* had more or less a similar level

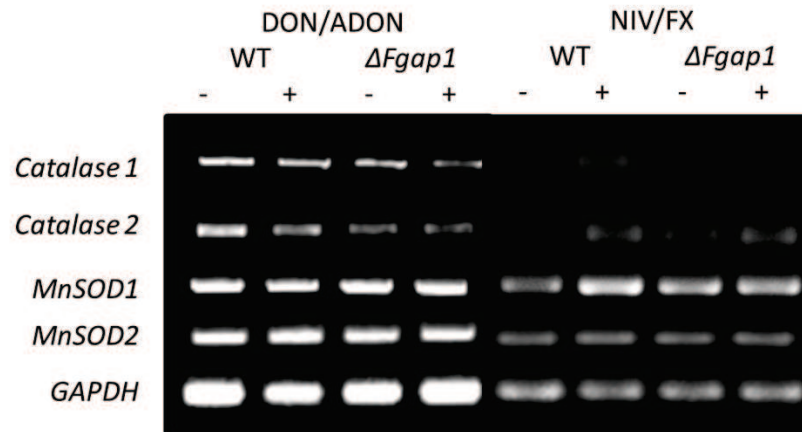


Fig. 3. Expression of genes encoding antioxidant activities and *GAPDH*, by RT-PCR, at day 4 post-inoculation, for the wild-type strain (WT) and the $\Delta Fgap1$ mutant of the DON/ADON chemotype or of the NIV/FX chemotype, in a medium supplemented (+) or not (-) with diamide 0.5mM.

of expression in the four tested conditions. The expression of *Tri5*, which was low in the wild-type, was strongly enhanced when treated with diamide. This up-regulation is consistent with the above result concerning trichothecenes accumulation (Table 2). The results obtained for *Tri* genes expression (and particularly *Tri5*) in both chemotypes suggest that the enhancing effect of diamide is at least partially relying on *Fgap1*.

III-4- *Fgap1* and antioxidant activities

The level of expression of four genes encoding catalase (FGSG_06554 and FGSG_02881) and SOD activities (FGSG_04454 and FGSG_02051) was investigated. These genes have been chosen as they are essential for maintaining the redox balance in response to oxidative stress. In addition, they were demonstrated to be regulated by *Apyap1* and *Aoyap1* in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus ochraceus*, respectively (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008) (Fig. 3). Whatever the treatment, *MnSOD1* and *MnSOD2* expression had similar level in the two strains (wild-type and mutant) (Fig. 3). Expression of catalase genes was more variable. In the DON/ADON strain, the expression of the two genes encoding catalase seemed slightly reduced in the deleted mutant, whatever the culture conditions. The reduction was more pronounced for the gene encoding catalase2. This would suggest that *Fgap1* is involved in the activation of catalase gene expression in DON/ADON strain. Surprisingly, for the NIV/FX strain, the expression of gene encoding catalase1 was only detected in the wild-type strain treated with diamide. The gene encoding catalase2 was expressed in all tested conditions but had a lower level of expression in the non-treated wild-type strain.

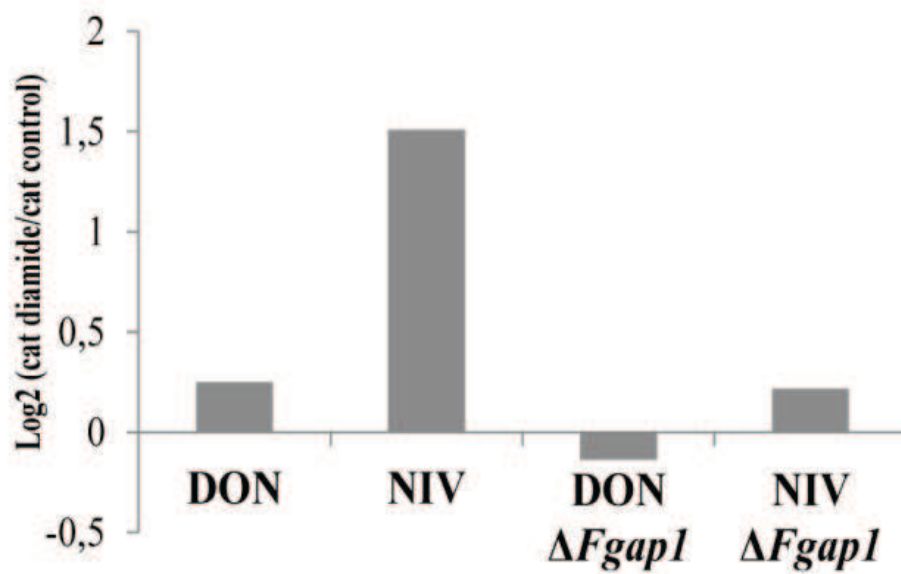


Fig. 4. Ratios of catalase activities of cell-free extracts from 4 day-old fungal cultures grown in GYEP supplemented or not with diamide 0.5mM. The data represent ratios in log2 scale of catalase activities in treated conditions over catalase activities in control conditions. Each value used for the ratio represents the mean value of three biological repeats.

Our data suggest that genes encoding catalase activity strongly respond to diamide treatment and that *Fgap1* seems to be involved in this regulation. Nevertheless, the increase of expression of gene encoding catalase1 in the NIV/FX strain seems to be more dependent on the induction by the diamide mediated treatment. This data suggest that NIV/FX strains could be able to develop a better response to oxidative stress, compared to DON/ADON strains. This is consistent with data previously observed for response to H₂O₂, where catalase activity was enhanced in NIV/FX strain compared to DON/ADON strain (Ponts et al., 2009).

Given that expression of genes encoding catalase activity was strongly variable, we analyzed catalase activities in both chemotypes DON/ADON and NIV/FX, for the wild-type strains and the deleted mutants, in cultures supplemented or not with diamide. We analyzed catalase activities in cell-free extracts of 4 day-old cultures. The results presented in Fig. 4 are in log₂ ratio scale for treated conditions over control conditions. For the DON/ADON wild-type strain, diamide did not significantly increase the assayed catalase activities. For the NIV/FX wild-type strain, diamide induced a strong increase in total activity of catalases. This finding suggests that the NIV/FX strain develops a higher adaptation to diamide-stress, linked to higher scavenging capacity of ROS. Catalase activity was not significantly induced by diamide in the $\Delta Fgap1$ mutants for both chemotypes. This result confirms the key role of *Fgap1* in the induction of fungal antioxidant activities (Montibus et al., 2013b).

IV- Discussion

Mechanisms involved in the onset of mycotoxins production in fungi have been the subject of numerous studies. Oxidative stress is an important factor controlling mycotoxins biosynthesis. It was shown to stimulate aflatoxin production in *A. parasiticus*, ochratoxin A production in *A. ochraceus* (Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008) but also DON production in *F. graminearum* (Ponts et al., 2006). Furthermore, this regulation was demonstrated to be mediated by *Afyap1*, *Aoyap1* and *Fgap1* respectively (Montibus et al., 2013a, Reverberi et al., 2012, Reverberi et al., 2008). An additional study suggested that response to peroxide stress in *F. graminearum* was chemotype-dependent (Ponts et al., 2009). The goal of this study was to investigate the involvement of *Fgap1* in TCTB regulation induced by oxidative stress for *F. graminearum* strains belonging to the two major chemotypes, DON/15ADON and NIV/FX.

Our results show that a diamide stress exposure significantly enhances toxin accumulation, whatever the chemotype of the strain. This result differs from previous data obtained with H_2O_2 where DON/ADON accumulation was shown to be stimulated whereas NIV/FX accumulation was inhibited (Ponts et al., 2009). In a study performed with *A. nidulans*, the effect of H_2O_2 and diamide on gene expression signatures were investigated (Pocsi et al., 2005). The number of gene probes that were shown to be affected by stress was different according to the considered treatment (Pocsi et al., 2005). The difference observed was explained by the occurrence of distinct mechanism of action depending on the selected stress-inducing agent. In fact, diamide is a thiol-oxidizing agent resulting in fast oxidation of glutathione, whereas H_2O_2 increases intracellular peroxide levels (Toledano et al., 2003). The involvement of these two different pathways could also explain the different effect of H_2O_2 and diamide on trichothecene accumulation we observed.

We showed the effect of *Fgap1* deletion on trichothecene accumulation differed according to the chemotype of the strain. In the DON/ADON strain, *Fgap1* deletion resulted in an increase in toxin accumulation, whereas in the NIV/FX strain, no impact of *Fgap1* deletion was observed on toxin accumulation. This response could be due to differential ability to cope with H₂O₂ constitutively produced by the fungus. Such a production was demonstrated by Ponts et al, 2009. Indeed, NIV/FX strain and DON/ADON strain produce constitutively H₂O₂. Furthermore, the previous authors indicated that NIV/FX strains were more efficient to metabolize H₂O₂ than DON/ADON strains (Ponts et al., 2009). These observations could lead to different levels of oxidative stress encountered by the two strains during growth, and could explain the different consequences of *Fgap1* deletion on trichothecene accumulation.

In response to diamide, the $\Delta Fgap1$ DON/ADON strain produces fewer toxins than the DON/ADON wild-type strain. The $\Delta Fgap1$ NIV/FX strain produces significantly less toxin than the NIV/FX wild-type strain. The deletion of *Fgap1* results in the loss of the oxidative stress stimulating effect on trichothecene accumulation. This finding suggests that response to diamide mediated oxidative stress of strains belonging to the NIV chemotype to diamide mediated oxidative stress relies on Fgap1 factor, as it has already been demonstrated for DON/ADON strain when treated with H₂O₂ (Montibus et al., 2013a)(submitted). The oxidative stress response mediated by Fgap1 does not seem to be chemotype-dependent. However, deletion of *Fgap1* in response to diamide leads to a more significant modulation in the NIV production compared to DON, which was only slightly affected. This significant impact in NIV/FX strain could partially be explained by the differential regulation of the gene encoding catalase1, which is poorly expressed in the deleted strain. The fact that total catalase activity is strongly activated in response to diamide in the wild-type strain but not in the deleted mutant of the NIV/FX chemotype reinforces this hypothesis. Catalase activities were

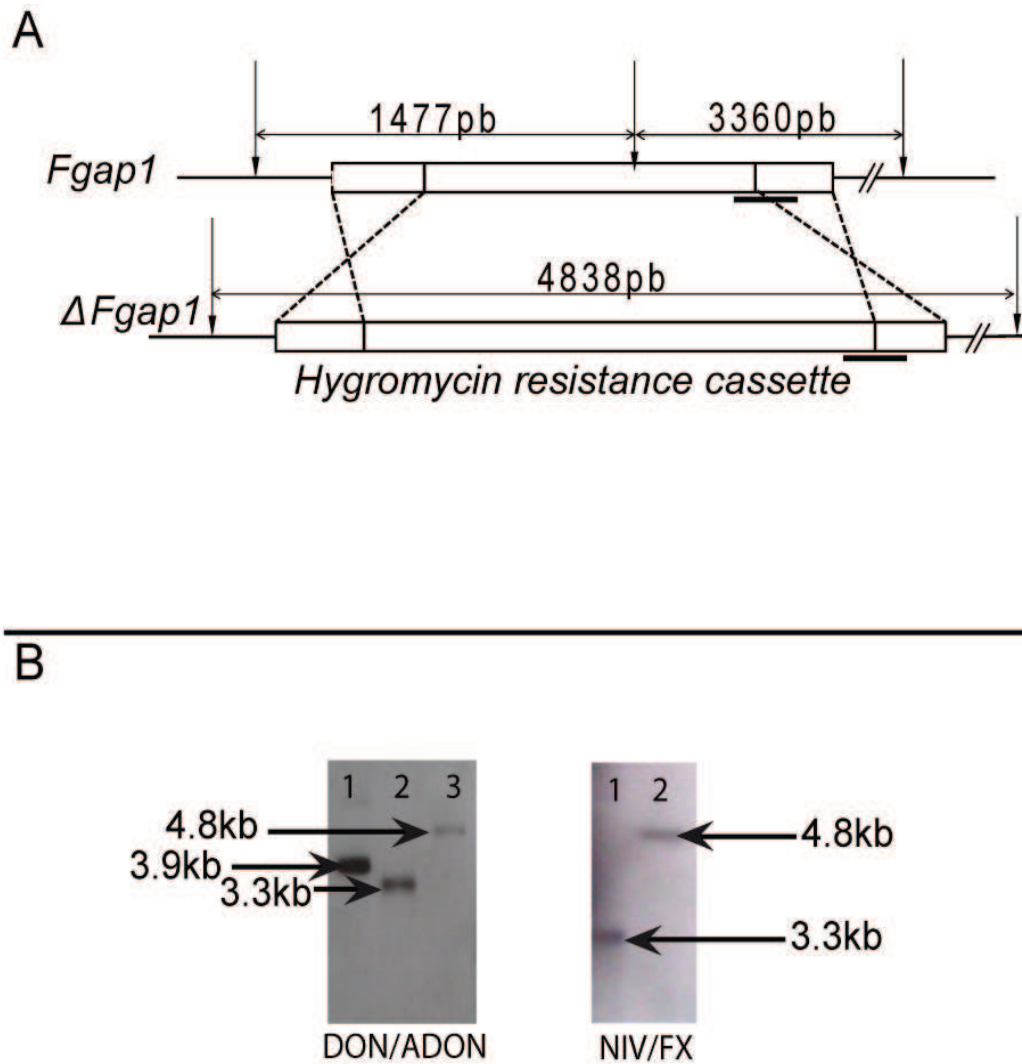


Fig. S1. Construction of $\Delta Fgap1$ mutants. (A) Maps of *Fgap1*_{wt} locus, the $\Delta Fgap1$ construct containing the hygromycin resistance cassette. Horizontal black bar represents the labeled probe used for the southern blot hybridization. Vertical black arrows stand for *SalI* restriction sites. (B) Southern blot hybridization. For DON/ADON: 1: pBCSK $\Delta Fgap1$ (plasmid carrying the deletion construction); 2: wild-type strain; 3: $\Delta Fgap1$; For NIV/FX : 1 : wild-type strain; 2: $\Delta Fgap1$. In the pBCSK $\Delta Fgap1$, the probe reveals a fragment of 3.9kb when digested with *Bam*HI. In the two wild type strains, the probe reveals a 3.3 kb fragment when digested with *SalI*. In the two $\Delta Fgap1$ strains, the probe reveals a 4.8 kb fragment when digested with *SalI*.

also shown to be activated by diamide in *A. nidulans* (Pocsi et al., 2005). However, it is not anymore activated in our deleted mutant strongly suggesting this activation is dependent of *Fgap1*.

These results open new insights about the mechanisms involved in response to oxidative stress in *F. graminearum* but also about the control of trichothecene biosynthesis. This may help to understand factors that lead to high accumulation of trichothecenes in grains, during the plant/pathogen interaction.

Références

- AEBI, H. 1947. *Methods in Enzymology*. Ed. Bergmeyer ed. New York: Academic Press.
- ALEXANDER, N. J., PROCTOR, R. H. & MCCORMICK, S. P. 2009. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28, 198-215.
- FLORENT, M., NOËL, T., RUPRICH-ROBERT, G., DA SILVA, B., FITTON-OUHABI, V., CHASTIN, C., PAPON, N. & CHAPELAND-LECLERC, F. 2009. Nonsense and Missense Mutations in FCY2 and FCY1 Genes Are Responsible for Flucytosine Resistance and Flucytosine-Fluconazole Cross-Resistance in Clinical Isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2982-2990.
- GOSWAMI, R. S. & KISTLER, H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- GUO, M., CHEN, Y., DU, Y., DONG, Y., GUO, W., ZHAI, S., ZHANG, H., DONG, S., ZHANG, Z., WANG, Y., WANG, P. & ZHENG, X. 2011. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens*, 7, e1001302.
- ICHINOE, M., KURATA, H., SUGIURA, Y. & UENO, Y. 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Appl Environ Microbiol*, 46, 1364-9.
- JIAO, F., KAWAKAMI, A. & NAKAJIMA, T. 2008. Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett*, 285, 212-9.
- KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S. & FUJIMURA, M. 2007. Molecular and genetic studies of *fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 2105-23.
- KUGE, S., JONES, N. & NOMOTO, A. 1997. Regulation of γ AP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J*, 16, 1710-1720.
- 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.
- MCCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3, 802-814.
- MERHEJ, J., BOUTIGNY, A. L., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2010. Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 1-8.
- 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.
- MONTIBUS, M., DUCOS, C., BONNIN-VERDAL, M. N., BORMANN, J., PONTS, N., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013a. The bZIP transcription factor *Fgap1* mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *Submitted to Plos One*.
- MONTIBUS, M., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F., BARREAU, C. & PONTS, N. 2013b. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, in press.

- MOYE-ROWLEY, W. S. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic cell*, 2, 381-9.
- POCSI, I., MISKEI, M., KARANYI, Z., EMRI, T., AYOUBI, P., PUSZTAHELYI, T., BALLA, G. & PRADE, R. A. 2005. Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures--linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics*, 6, 182.
- PONTS, N., COUEDELO, L., PINSON-GADAIS, L., VERDAL-BONNIN, M. N., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2009. Fusarium response to oxidative stress by H₂O₂ in trichothecene chemotype-dependent. *FEMS Microbiol Lett*, 293, 255-262.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BARREAU, C., RICHARD-FORGET, F. & OUELLET, T. 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *Febs Letters*, 581, 443-447.
- 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.
- PUNT, P. J., DINGEMANSE, M. A., KUYVENHOVEN, A., SOEDE, R. D. M., POUWELS, P. H. & VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. 1990. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93, 101-109.
- QIAO, J., LIU, W. & LI, R. 2010. Truncated Afpap1 Attenuates Antifungal Susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to Voriconazole and Confers Adaptation of the Fungus to Oxidative Stress. *Mycopathologia* [Online], 170.
- REVERBERI, M., GAZZETTI, K., PUNELLI, F., SCARPARI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., FABBRI, A. & FANELLI, C. 2012. Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 1293-1304.
- REVERBERI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., PUNELLI, F., CAMERA, E., FABBRI, C., PICARDO, M., FANELLI, C. & FABBRI, A. A. 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryotic cell*, 7, 988-1000.
- ROCHA, O., ANSARI, K. & DOOHAN, F. M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22, 369-378.
- RODRIGUES-POUSADA, C., MENEZES, R. A. & PIMENTEL, C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*, 27, 245-258.
- TEMME, N. & TUDZYNSKI, P. 2009. Does botrytis cinerea Ignore H₂O₂-induced oxidative stress during infection? Characterization of botrytis activator protein 1. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22, 987-98.
- TOLEDANO, M., DELAUNAY, A., BITEAU, B., SPECTOR, D. & AZEVEDO, D. 2003. Oxidative stress responses in yeast. In: HOHMANN, S. & MAGER, W. (eds.) *Yeast Stress Responses*. Springer Berlin Heidelberg.
- WINDELS, C. 2000. Economic and social impacts of Fusarium Head Blight : Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90, 17-21.
- YANG, F., SVENSSON, B. & FINNIE, C. 2011. Response of germinating barley seeds to *Fusarium graminearum*: The first molecular insight into Fusarium seedling blight. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*, 49, 1362-8.

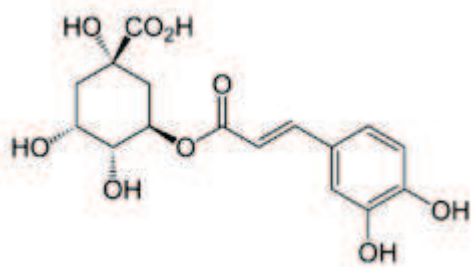
ZHOU, W. C., KOLB, F. L. & RIECHERS, D. E. 2005. Identification of proteins induced or upregulated by Fusarium head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 48, 770-780.

*Chapitre 3 : Rôle de
Fgap1 dans la
modulation de la
production de TCTB en
réponse aux acides
phénoliques*

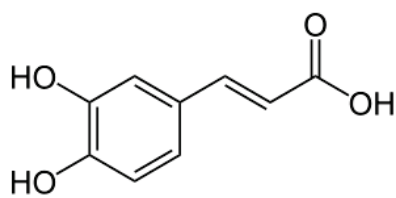
Nous avons vu dans l'introduction de ce manuscrit que suite au burst oxydatif, les acides phénoliques pouvaient également jouer un rôle déterminant lors de l'interaction hôte/pathogène. Les acides phénoliques sont présents chez toutes les plantes et leur rôle dans les mécanismes de défense a été largement décrit (Mettraux and Raskin, 1993, Nicholson and Hammerschmidt, 1992). Les acides phénoliques présents dans les sons de blé sont susceptibles de moduler la toxinogénèse de *F. culmorum* (Boutigny et al., 2009). Ils peuvent également jouer un rôle clé dans les mécanismes de résistance à *F. graminearum* ou à *F. verticillioides*. Plus précisément, des travaux récents ont montré que l'acide chlorogénique, présent dans les premiers stades de développement du maïs, était susceptible de contribuer à la résistance à l'infection par *F. graminearum* mais également à la contamination en DON (Atanasova-Penichon et al., 2012). De même, l'acide férulique présent dans les grains de maïs semble contribuer à la résistance à l'infection par *F. verticillioides* et à l'accumulation de fumonisines (Picot et al., 2013).

Les acides phénoliques sont connus pour leurs propriétés antioxydantes (Boutigny et al., 2008). Etant donné que *Fgap1* intervient dans la réponse au stress oxydant, nous avons logiquement voulu tester son implication en réponse à ces composés antioxydants.

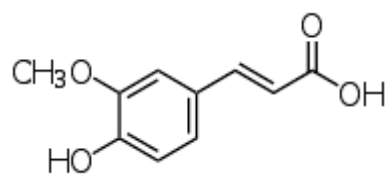
Dans ce chapitre, nous avons analysé l'effet de deux acides phénoliques, l'acide caféique et l'acide férulique. Ces deux composés ont été testés sur la souche DON/ADON de référence INRA 605 et sur la souche NIV/FX de référence INRA 91, mais également sur les mutants $\Delta Fgap1$ respectifs de ces deux souches.



Acide chlorogénique



Acide caféique



Acide férulique

Figure 1 : Structures chimiques de l'acide chlorogénique, de l'acide caféique et de l'acide férulique.

I- Introduction

La plupart des études consacrées à l'effet inhibiteur des composés phénoliques sur la production de mycotoxines ont été menées avec comme modèle le genre *Aspergillus*. Une étude *in vitro* menée chez *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* a montré que l'acide cinnamique et l'acide férulique avaient des propriétés antifongiques et entraînaient une inhibition de la production d'aflatoxines (Nesci and Etcheverry, 2006). Chez *Aspergillus flavus* l'acide caféique permettait, à 12 mM, une réduction de la production d'aflatoxines *in vitro* et une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de ces toxines, et ce, sans affecter la croissance du champignon (Kim et al., 2008). L'acide caféique à 10 mM inhibe également fortement la production d'ochratoxine A chez plusieurs espèces du genre *Aspergillus* (Palumbo et al., 2007).

Les acides phénoliques naturellement présents chez le blé sont capables d'inhiber significativement *in vitro* l'expression des gènes de biosynthèse des trichothécènes (Boutigny et al., 2008, Boutigny et al., 2010). Chez le blé, l'acide phénolique majoritairement retrouvé est l'acide férulique (Figure 1) (Boutigny, 2007). Chez le maïs, les composés phénoliques solubles présents dans le germe parmi lesquels se trouvent l'acide chlorogénique, l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide *p* coumarique sont des inhibiteurs de la synthèse de TCTB par *Fusarium graminearum* (Bakan et al., 2003). Durant les premiers stades de développement du grain de maïs, correspondant à la période critique pour l'infection et l'initiation de la contamination en mycotoxines par *F. graminearum*, l'acide chlorogénique, l'acide férulique et l'acide caféique (Figure 1) apparaissent comme étant les acides phénoliques majoritairement retrouvés (Atanasova-Penichon et al., 2012). Il a été montré que

l'acide férulique et l'acide caféique étaient capables d'inhiber efficacement *in vitro* la biosynthèse d'une autre mycotoxine produite par *Fusarium verticillioides*, la fumonisine (Ponts et al., 2013).

Dans ce chapitre, nous avons testé l'effet de l'acide férulique puisqu'il apparaît comme étant majoritaire chez le blé ou le maïs, mais également celui de l'acide caféique, puisque son efficacité « antimycotoxine » chez *Aspergillus* a été largement démontrée. L'effet inhibiteur de ces deux composés antioxydants a été étudié chez deux souches de *F. graminearum* de chémotype DON/ADON et NIV/FX. Comme nous n'avons à l'heure actuelle que peu de connaissances sur leur mode d'action, cet effet a également été testé chez les souches délétées pour *Fgap1*, afin d'évaluer le rôle joué par ce facteur dans la réponse aux composés antioxydants, étant donné qu'il joue un rôle dans la réponse au stress oxydant (Chapitre 1).

II- Procédures expérimentales

II-1- Souches, milieux et conditions de culture

Deux souches de *F. graminearum* de notre collection INRA ont été utilisées pour cette étude : une souche de chémotype DON/ADON (référéncée INRA 605) et une souche de chémotype NIV/FX (référéncée INRA 91). Les deux mutants $\Delta Fgap1$ respectifs de ces deux souches dont la construction est décrite dans les chapitres 1 et 2 ont également été utilisés.

Les différentes souches ont été repiquées sur milieu PDA (Potatoes, Dextrose, Agar, Difco-France). Les suspensions de spores ont été générées en plaçant une dizaine d'implants PDA de chaque souche dans 150 mL de milieu CMC (15 g/L carboxyméthyl cellulose, 1 g/L extrait de levure, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L NH_4NO_3 , 1 g/L KH_2PO_4). Le tout a été incubé à 150 rpm et 25°C pour trois jours. Après filtration de la solution à 100 μm (SEFAR AG -

Suisse), les spores ont été comptées sur une cellule de THOMA et ont servi d'inoculum pour les cultures.

Huit mL de milieu MS (KH_2PO_4 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.6 g/L, MgSO_4 0.017g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g/L, saccharose 20 g/L, biotine 0.1mg/mL, solution de sels de Vogel 0.1 mL/L) (Vogel, 1956) dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre, ont été inoculés avec 8×10^4 spores, et incubés dans le noir, à 25°C jusqu'à 15 jours de culture. Les cultures ont été supplémentées en acide caféique ou en acide férulique à une concentration finale de 0.5 mM. (Sigma Aldrich®, Saint Louis). Nous avons vérifié que l'ajout de ces composés ne modifiait pas le pH du milieu. Après incubation, le milieu de culture a été collecté par filtration sous vide et stocké à -20°C jusqu'à analyse de la concentration en trichothécènes de type B. Le mycélium a été stocké à -80°C, lyophilisé et utilisé soit pour l'extraction d'ARN, soit pour la détermination de la biomasse fongique.

II-2- Analyses HPLC

L'analyse HPLC a été réalisée avec une chaîne chromatographique liquide « Agilent Technologies 1100 series » équipée d'un détecteur à barrette de diodes DAD Agilent et du logiciel ChemStation chromatography manager (Agilent, Waldbronn, Allemagne). La séparation des composés à doser a été réalisée avec un volume d'injection de 5 μL sur une colonne kinetex 2.6U XB-C18 (4.6×150 mm) maintenue à 45°C.

Pour l'analyse des TCTB, 4 mL de milieu de culture ont été extraits avec 8 mL d'éthyle acétate (Fisher Scientific). 5 mL de la phase organique ont été évaporés sous flux d'azote à 50°C. Les échantillons secs ont été repris dans 500 μL d'un mélange méthanol/eau (1:1, v/v) et filtrés à 0.45 μm avant analyse (Phenomenex). La phase mobile est constituée d'eau acidifiée à pH 2.6 avec de l'acide orthophosphorique (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le débit est fixé à 1 mL/min. Les conditions du gradient sont fixées ainsi: 93% de A-7% de B,

Table 1 : Liste des primers utilisés pour les analyses qPCR.

Gene (accession No)	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Tm(°C)
<i>GAPDH</i> (FGSG_06257)	TCAAGGGTGTCTGGCCTAC	AGTAACCCCACTCGTTGTCG	60
<i>Tri4</i> (FGSG_03535)	TATTGTTGGCTACCCCAAGG	TGTCAGATGCGCCTTACAAA	60
<i>Tri5</i> (FGSG_03537)	GACCCTAAGCGACTACAG	GTGCTACGGATAAGGTTC	60
<i>Tri6</i> (FGSG_03536)	AGCGCCTTGCCCCCTCTTTG	AGCCTTTGGTGCCGACTTCTTG	63
<i>Tri101</i> (FGSG_07896)	AGGGCATTAGCGAGGGAAACACA	ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC	61
<i>Catalase 1</i> (FGSG_06554)	GGAAAGCCAGAACCAAAACA	CGTTGACGAGAGTGTAGGTGTTGA	58
<i>Catalase 2</i> (FGSG_02881)	TCTCTCCCTCCAACATGGTC	CAGGGTGCGTAGACTTGGTT	62
<i>MnSOD1</i> (FGSG_04454)	CTCTCCCCGATCTTCCCTAC	CGGGTAACGATGGACAGAGT	62
<i>MnSOD2</i> (FGSG_02051)	TTGCGTATCGTTACCACCAA	TCAACATAGGCAGCCTTTCC	60
<i>Cu/ZnSOD1</i> (FGSG_08721)	CACACCTTCGGTGACAACAC	GGTCTCGTCAGAAGGAGCAC	62
<i>Cu/ZnSOD2</i> (FGSG_00576)	AGCTCTCGCAGCAGTTCTTC	CAGGATCAACGTGAATGTGG	60

70% de A-30% de B en 10 min, 10% de A-90% de B en 10 min, 93% de A-7% de B en 7 min. Les surfaces des pics ont été mesurées à 230 nm et l'identification des différents TCTB a été réalisée grâce à leur temps de rétention et à leur spectre UV mesuré de 190 à 360 nm. Un étalonnage externe a permis la quantification des TCTB grâce à des composés de référence (Sigma-Aldrich[®], Saint-Louis, USA). Pour l'analyse des acides phénoliques, 500 µL de milieu ont été filtrés à 0.45 µm avant analyse (Phenomenex). La phase mobile est constituée d'eau acidifiée avec 2% d'acide formique (v/v) (solvant A) et d'acétonitrile acidifié à 2% d'acide formique (v/v) (solvant B). Le débit est fixé à 1 mL/min. Les conditions du gradient sont les suivantes : 93% de A-7% de B, 80% de A-20% de B en 7 min, 5% de A-95% de B en 5 min, 93% de A-7% de B en 10 min. Les surfaces des pics ont été mesurées à 320 nm et l'identification des différents acides phénoliques s'est faite grâce à leur temps de rétention et à leur spectre UV mesuré de 200 à 550 nm. La quantification des acides phénoliques s'est faite par étalonnage externe à l'aide de composés de référence (Sigma-Aldrich[®], Saint-Louis, USA).

II-3- Manipulation des acides nucléiques et qPCR

L'ARN total a été extrait à partir de 50 mg de mycélium congelé et lyophilisé, après broyage au TissueLyser[®] (QIAGEN) 30 sec à 30 Hz avec le kit RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN). Pour éliminer l'ADN, un traitement avec le TURBO DNA-free[™] Kit (Ambion) a été réalisé selon les instructions du fournisseur. Les échantillons ont été quantifiés à l'aide du Nanodrop ND 1000 spectrophotometer (Labtech International, UK) et leur qualité a été vérifiée sur gel d'agarose à 1,2 %. 1 µg d'ARN total a été reverse transcrit avec le kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les analyses qPCR ont ensuite été réalisées sur 1 µL d'ADNc (correspondant à 10 ng d'ARN total

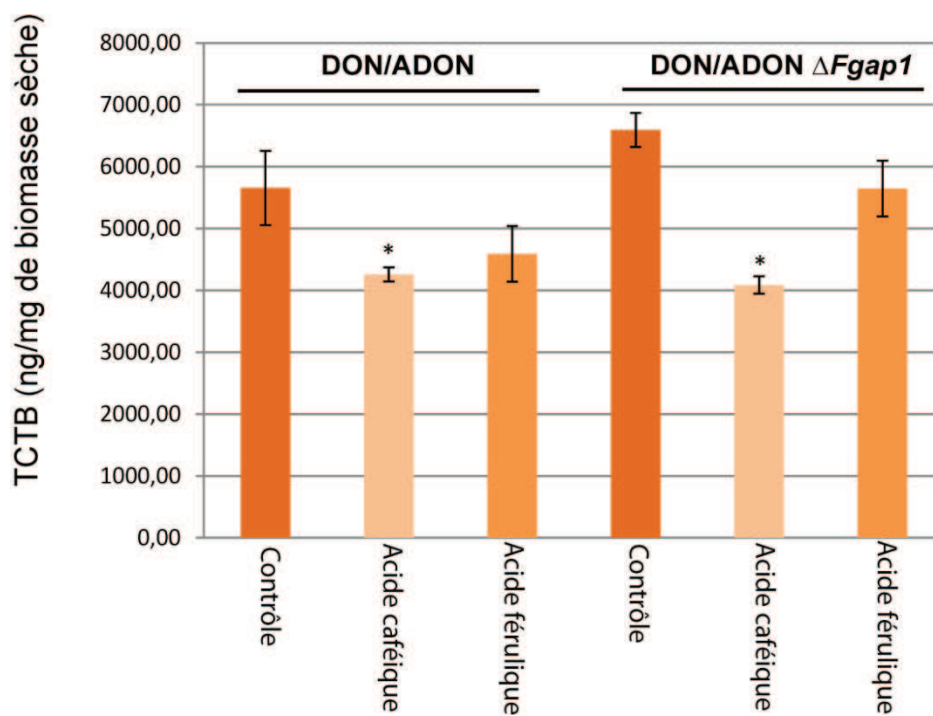


Figure 2 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'accumulation de TCTB chez une souche DON/ADON et un mutant DON/ADON $\Delta Fgap1$ après 14 jours de culture. * indique une différence significative en comparaison avec le contrôle (test de Student, $p \leq 0.05$).

reverse transcrit) dans un volume réactionnel de 10 μ L, en utilisant le kit «QuantiFast™ SYBR® Green PCR kit » (QIAGEN) selon les instructions du fournisseur. Les réactions ont été réalisées dans un LightCycler® LC2.0 avec le logiciel LightCycler 3.5.3 (Roche, Allemagne). Pour évaluer l'abondance des transcrits pour chaque gène étudié (Table 1) *GAPDH* (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) a été utilisé comme contrôle interne. Pour chaque gène, l'efficacité a été évaluée avec des dilutions sérielles de 10 en 10 des différents échantillons d'ADNc poolés. L'analyse des données, normalisées par l'expression de *GAPDH*, et l'analyse de la significativité des résultats (5000 permutations, $p = 0.05$) ont été réalisées avec le logiciel REST® software (Relative Expression Software Tool) (Pfaffl, 2001, Pfaffl et al., 2002).

III-Résultats

III-1- Analyse de la production de TCTB en réponse à l'acide férulique et à l'acide caféique

Les souches de *F. graminearum* de chémotype DON/ADON et NIV/FX, et les mutants délétés $\Delta Fgap1$ DON/ADON et $\Delta Fgap1$ NIV/FX ont été cultivés en milieu MS, supplémentés ou non avec 0,5 mM d'acide caféique ou d'acide férulique. Ces concentrations n'affectent pas la croissance fongique (résultats non figurés). La production de trichothécènes a été analysée après 14 jours de culture. Afin de connaître le devenir de l'acide férulique et de l'acide caféique, leur dosage a été réalisé. Les deux composés n'étaient plus présents dans le milieu de culture dès 4 jours quelle que soit la souche testée.

Chez la souche DON/ADON (Figure 2), après 14 jours de culture, l'acide férulique n'a pas d'effet significatif sur la production de TCTB que ce soit par la souche sauvage ou le mutant

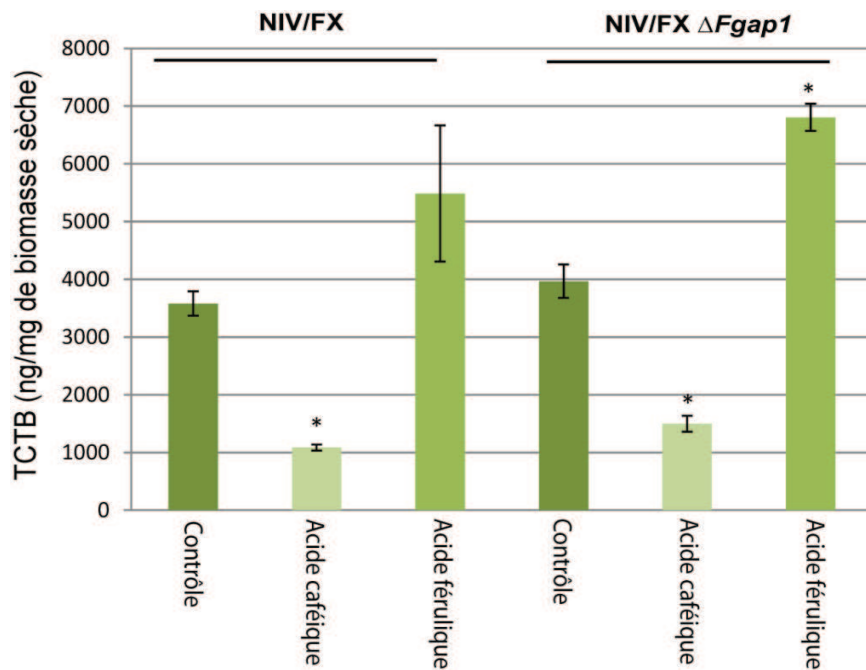


Figure 3 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'accumulation de TCTB chez une souche NIV/FX et un mutant NIV/FX $\Delta Fgap1$ après 14 jours de culture. * indique une différence significative en comparaison avec le contrôle (test de Student, $p \leq 0.05$).

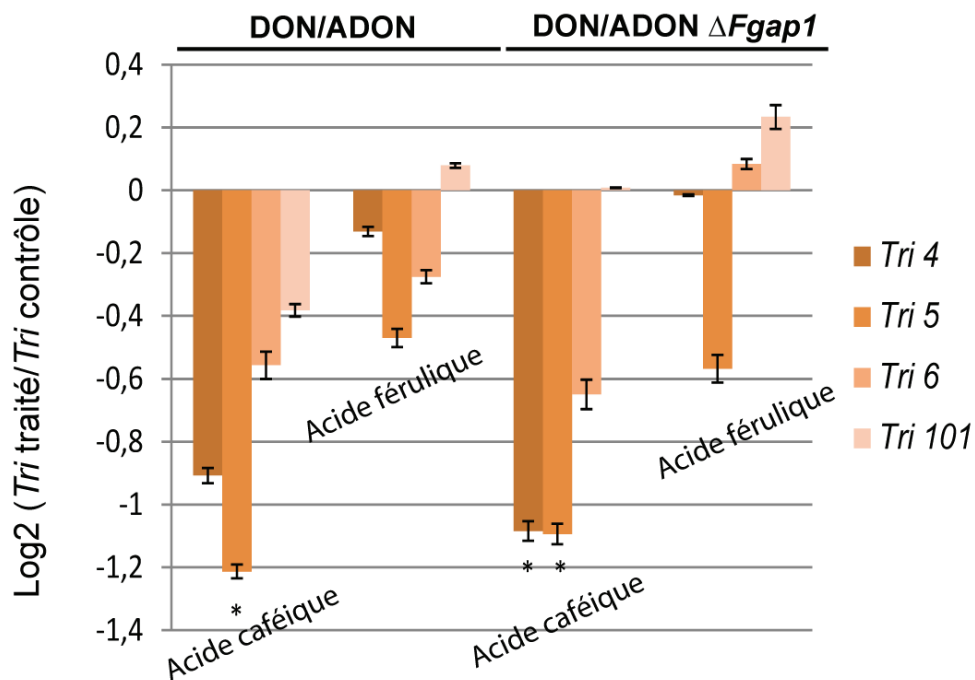


Figure 4 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'expression des gènes *Tri* chez une souche DON/ADON et un mutant DON/ADON $\Delta Fgap1$ après 4 jours de culture. * indique une différence significative en comparaison avec le contrôle ($p \leq 0.05$).

$\Delta Fgap1$. L'acide caféique inhibe quant à lui significativement la production de TCTB par ces deux souches (Figure 2). Les réponses de la souche sauvage et de la souche délétée pour *Fgap1* à l'acide caféique sont identiques. Ces données suggèrent que *Fgap1* n'intervient pas dans la réponse aux acides phénoliques testés. Chez la souche de chémotype NIV/FX (Figure 3), après 14 jours de culture, l'acide caféique inhibe significativement la production de TCTB, que ce soit pour la souche sauvage ou pour la souche $\Delta Fgap1$. L'acide férulique quant à lui active la production de TCTB, et de manière significative pour le mutant $\Delta Fgap1$. Ainsi, pour le chémotype NIV/FX, la modulation de la production de TCTB est différente en fonction de l'acide phénolique testé (Figure 3). Comme pour la souche DON/ADON, la réponse de la souche sauvage et de la souche délétée pour *Fgap1* sont identiques. *Fgap1* ne semble donc pas intervenir dans la réponse aux acides phénoliques testés.

Sur les deux acides phénoliques testés, seul l'acide caféique présente un effet inhibiteur quel que soit le chémotype de la souche testée. L'acide férulique présente un effet moins marqué, et semble même activer la production de NIV/FX.

III-2- Analyse de l'expression des gènes *Tri* en réponse à l'acide férulique et à l'acide caféique

L'analyse de l'expression des gènes *Tri* a été effectuée à partir de mycelia issus de milieu MS supplémentés ou non en acides phénoliques et arrêtés à 4 jours de culture. Les gènes *Tri 4*, et *Tri 5*, codant pour les premières étapes de la voie de biosynthèse, *Tri 6*, codant pour un régulateur de la voie de biosynthèse, et *Tri 101*, gène extérieur au cluster *Tri* ont été choisis.

Chez la souche de chémotype DON/ADON (Figure 4), l'acide caféique inhibe l'expression des gènes *Tri* chez la souche sauvage et chez le mutant délété. Cette inhibition est significative pour les gènes *Tri 4* et *Tri 5*. L'acide férulique présente un effet moins important

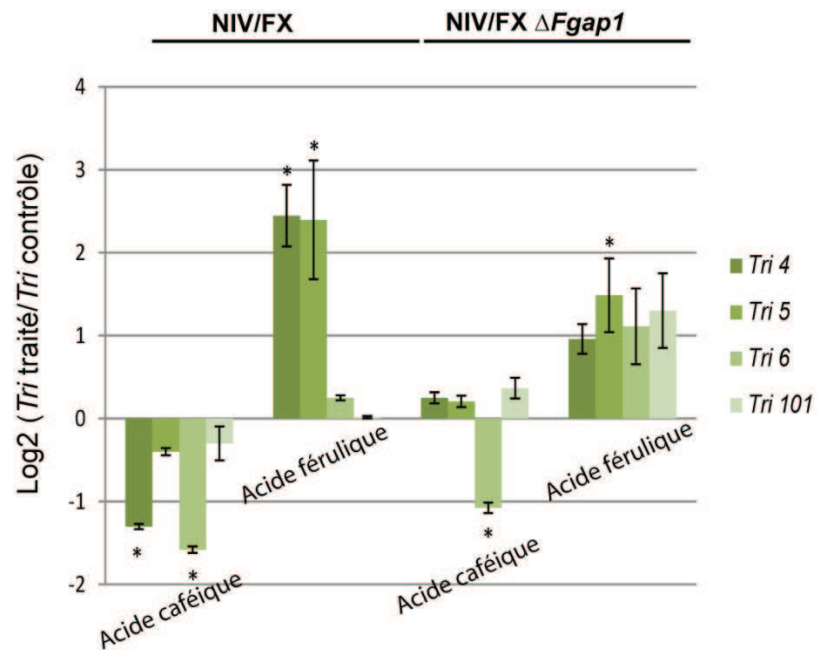


Figure 5 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'expression des gènes *Tri* chez une souche NIV/FX et un mutant NIV/FX $\Delta Fgap1$ après 4 jours de culture. * indique une différence significative en comparaison avec le contrôle ($p \leq 0.05$).

que ce soit pour la souche sauvage ou pour la souche délétée $\Delta Fgap1$. Les différences d'expression observées sont non significatives. Ces résultats sont en accord avec ceux observés pour la production de trichothécènes (Figure 2) où seul l'acide caféique inhibe significativement la production de TCTB, que ce soit pour la souche sauvage ou le mutant $\Delta Fgap1$.

Pour le chémotype NIV/FX (Figure 5), l'expression des gènes *Tri 4* et *Tri 6* est inhibée de manière significative en présence d'acide caféique pour la souche sauvage alors que l'expression des gènes *Tri 4* et *Tri 5* est activée de manière significative en présence d'acide férulique. Chez le mutant délété, seule l'expression de *Tri 6* est inhibée significativement en présence d'acide caféique alors que l'expression des gènes *Tri* est activée en présence d'acide férulique (activation significative pour *Tri 5*). Ces résultats sont à nouveau en accord avec la production de trichothécènes observée pour l'isolat NIV/FX (Figure 3). L'acide caféique inhibe la production de TCTB alors que l'acide férulique l'active.

III-3- Analyse de l'expression des gènes de réponse aux variations redox en réponse à l'acide férulique et à l'acide caféique

L'analyse de l'expression des gènes de réponse aux variations redox a été effectuée à partir de mycelia issus de cultures en milieu MS supplémenté ou non en acides phénoliques et arrêtés à 4 jours de cultures. Quatre gènes dits « antioxydants », codant pour des catalases ou des MnSOD ont été sélectionnés puisque nous avons montré que leur expression était dépendante de *Fgap1* (Chapitre 1). Deux gènes codant pour des catéchol-dioxygénases ont également été sélectionnés. Les catéchol-dioxygénases (CD) sont impliqués dans le métabolisme des composés phénoliques chez les champignons filamenteux (Santos and Linardi, 2004). L'acide caféique, composé ayant une structure ortho-diphénolique, est un de leur substrat.

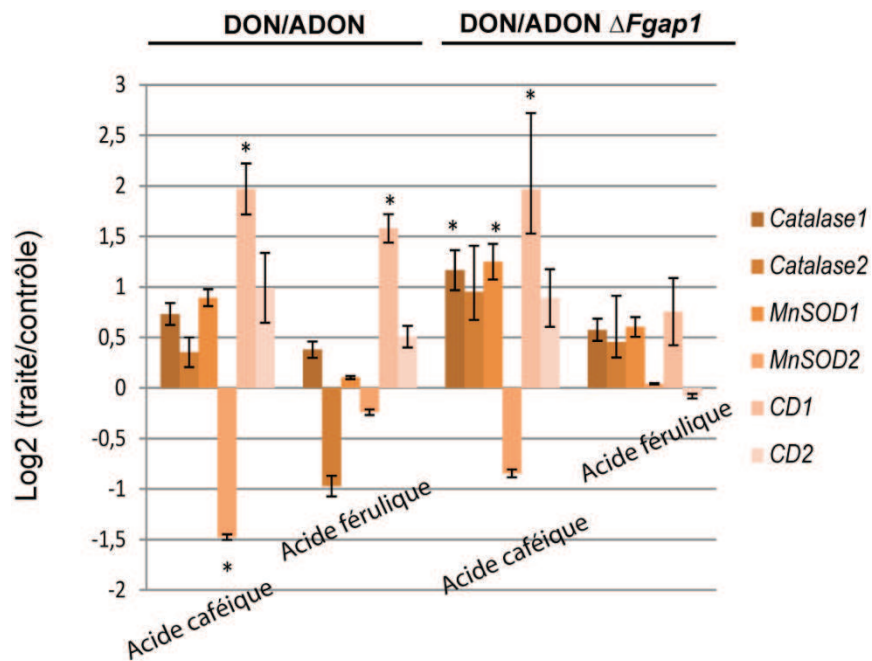


Figure 6 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'expression des gènes de réponse aux variations rédox chez une souche DON/ADON et un mutant DON/ADON $\Delta Fgap1$ après 4 jours de culture. * indique une différence significative en comparaison avec le contrôle ($p \leq 0.05$).

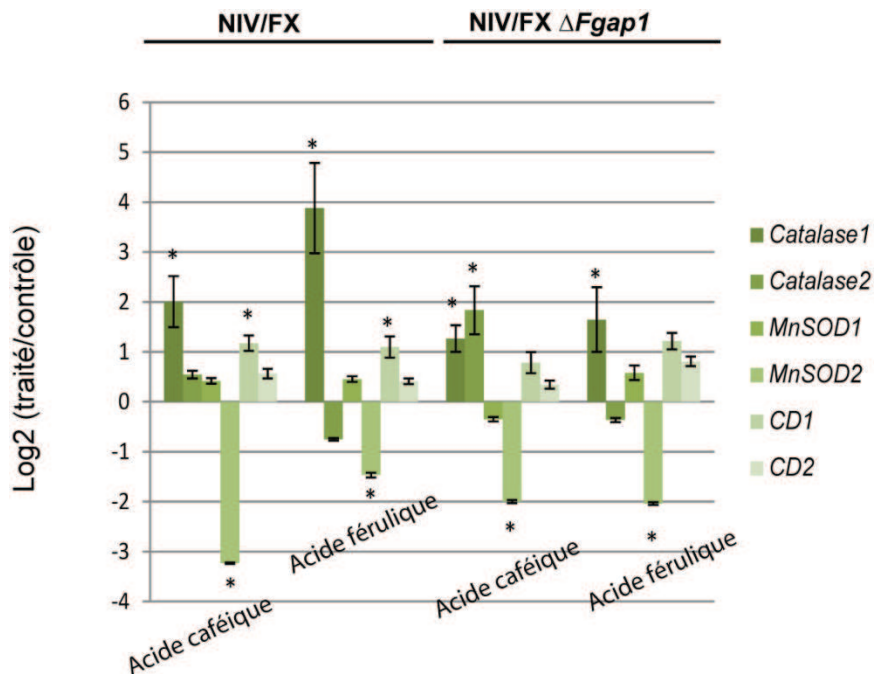


Figure 7 : Effet de l'acide caféique (0,5 mM) et de l'acide férulique (0,5 mM) sur l'expression des gènes de réponse aux variations rédox chez une souche NIV/FX et un mutant NIV/FX $\Delta Fgap1$ après 4 jours de culture. * indique une différence significative en comparaison avec le contrôle ($p \leq 0.05$).

Chez *Cochliobolus heterostrophus*, les acides phénoliques tels que l'acide férulique activent fortement l'expression d'un gène codant pour une CD (Shanmugam et al., 2010).

Pour le chémotype DON/ADON, sur les 4 gènes codant pour des activités antioxydantes testés (Figure 6), les variations d'expression ne sont globalement pas significatives, que ce soit pour la souche sauvage ou le mutant. Seul le gène codant pour MnSOD2 présente une diminution significative d'expression en présence d'acide caféique chez la souche sauvage. Le gène codant pour la catalase1 est surexprimé chez le mutant délété en présence d'acide caféique. Concernant les gènes codant des catéchol-dioxygénases, seule la CD1 présente des variations d'expression significative, avec une activation d'expression significative en présence d'acide caféique et d'acide férulique chez la souche sauvage, et en présence d'acide férulique chez le mutant délété pour *Fgap1*.

Pour l'isolat NIV/FX (Figure 7), sur les 4 gènes codant pour des activités antioxydantes, le gène codant pour la catalase1 est surexprimé chez la souche sauvage ou chez le mutant quel que soit l'acide phénolique testé. Le gène codant pour la MnSOD2 est sous-exprimé chez la souche sauvage ou chez le mutant quel que soit l'acide phénolique testé. Concernant les gènes codant les catéchol-dioxygénases, le gène codant pour la CD1 est surexprimé significativement en présence d'acides phénoliques uniquement chez la souche sauvage.

Globalement il semble que quel que soit le chémotype et l'acide phénolique testé, les gènes codant pour la catalase1 et la CD1 soient surexprimés alors que le gène codant pour la MnSOD2 soit sous-exprimé. *Fgap1* ne semble pas intervenir dans cette régulation.

IV- Discussion

Nous avons dans ce chapitre testé l'effet de deux acides phénoliques, l'acide caféique et l'acide férulique, sur la production de TCTB chez deux souches, une de chémotype

DON/ADON et une de chémotype NIV/FX. L'implication de *Fgap1* dans cette régulation a été analysée.

Tout d'abord, l'acide caféique inhibe fortement dans notre étude la production de TCTB pour les souches de chémotype DON/ADON et NIV/FX. L'acide caféique induit aussi une diminution de l'expression des gènes *Tri*, indiquant que la régulation de la production de trichothécènes est, au moins pour partie, liée à la régulation des gènes *Tri*. Ces résultats sont en accord avec ceux observés chez *Aspergillus spp.* où l'acide caféique inhibe fortement la production d'ochratoxine A (Palumbo et al., 2007) ou d'aflatoxine (Nesci and Etcheverry, 2006). Le facteur *Fgap1* ne semble pas intervenir dans cette régulation.

L'acide férulique induit quant à lui une modulation différente en fonction du chémotype de la souche testée, même si son effet n'est pas significatif comparé à l'acide caféique. L'expression des gènes *Tri* est également en accord avec la modulation de la production de TCTB. Ce résultat est en désaccord avec une étude précédemment réalisée sur des souches de *F. culmorum* (Boutigny et al., 2009). Dans cette étude, l'acide férulique inhibait fortement la production de TCTB que les souches soient de chémotype DON/ADON ou NIV/FX. Cette différence peut venir du fait que dans cette étude, la source de carbone utilisée dans le milieu de culture était du glucose, alors que dans notre étude la source de carbone est le saccharose. Il a été démontré que le saccharose est un inducteur de la toxinogénèse (Jiao et al., 2008) et cette différence de source de carbone pourrait expliquer la différence observée pour nos résultats. Cette variation d'effet entre souches est aussi en accord avec des résultats observés chez *Aspergillus spp.* où l'effet des acides phénoliques était variable entre plusieurs souches d'une même espèce (Nesci and Etcheverry, 2006). Il semblerait donc que l'effet des composés phénoliques puisse être souche dépendant.

Cette différence entre l'effet de l'acide caféique et l'effet de l'acide férulique pourrait aussi s'expliquer par leurs potentiels antioxydants. Dans l'étude de Ponts et al., (2011), ou encore dans la thèse de Boutigny en 2007, l'existence d'une relation entre potentiel antioxydant et capacité à moduler la production de TCTB a été suggérée. L'acide caféique est plus antioxydant que l'acide férulique (Castelluccio et al., 1995), il serait donc plus antimycotoxinogène.

Des études menées au laboratoire sur *F. verticillioides*, ont également montré que certains groupes de gènes étaient surexprimés spécifiquement en fonction de l'acide phénolique testé (Ponts et al., 2013). Il semblerait donc que pour une même souche, l'effet soit différent en fonction du composé phénolique testé. En complément, les acides phénoliques sont absorbés et transformés différemment en fonction de leur structure, ce qui peut entraîner des différences de capacité d'inhibition de la toxinogénèse. Il apparaît ainsi que l'activité des acides phénoliques puisse être composée dépendante.

L'expression des gènes de réponse aux variations redox a également été étudiée. Globalement les gènes codant pour des catalases sont surexprimés quels que soient la souche et le traitement considéré. Cette modulation témoigne d'un effet sur le potentiel redox provoqué par l'addition d'acides phénoliques. L'expression est la même que l'on se place chez la souche sauvage ou chez le mutant $\Delta Fgap1$ de chaque chemotype. Ce résultat suggère que *Fgap1* n'est pas l'acteur majeur de la modulation de l'expression des catalases dans notre étude. D'autres candidats, tel que *Skn7*, facteur qui agit avec *Yap1* chez la levure pour induire l'expression de gènes codant pour des activités antioxydantes, interviendraient certainement.

L'expression des catéchol-dioxygénases montre que seul le gène codant pour la CD1 est surexprimé en présence d'acides phénoliques et que son activation n'est pas dépendante de

Fgap1. Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée chez *C. heterostrophus* (Shanmugam et al., 2010), où le gène codant pour la catéchol-dioxygénase 1 était surexprimé de manière significative en présence d'acides phénoliques et où son expression n'était pas dépendante d'*ap1* pour une concentration identique à celle utilisée dans notre étude.

Le gène codant pour la MnSOD2 est quant à lui fortement sous exprimé en présence d'acides phénoliques, quelle que soit la souche testée. Cette MnSOD2 est homologue à une SOD mitochondriale et détoxifie les ROS générés par la chaîne respiratoire. Les acides phénoliques sont des piègeurs de ROS. Leur supplémentation peut induire une diminution des niveaux de ROS et en conséquence une sous-expression du gène codant pour la MnSOD2. Ce résultat suggère que les acides phénoliques testés modifient potentiellement la fonction mitochondriale, en diminuant l'expression de certains gènes mitochondriaux. Ces résultats sont en accord avec des travaux réalisés chez *Aspergillus* où l'utilisation de composés phénoliques en synergie avec des fongicides modifiait fortement la fonction mitochondriale et diminuait l'activité MnSOD (Kim et al., 2006). Cette réduction de la fonction mitochondriale résultait même, selon les auteurs, en un stress oxydant causé par un relargage anormal d'électrons de la chaîne respiratoire. Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation d'expression des gènes codant pour des catalases observée dans nos résultats.

Globalement, l'acide caféique testé ici présente une capacité antimycotoxinogène plus importante que l'acide férulique. Cette capacité passerait par une modulation de l'activité mitochondriale, *via* une régulation transcriptionnelle des gènes de détoxification, indépendante de *Fgap1*. La disparition de l'acide caféique et de l'acide férulique dès 4 jours de culture et la forte surexpression du gène *CDI* suggèrent que les acides phénoliques sont métabolisés, dégradés, ou complexés dans le mycélium dès leur supplémentation dans les 4 premiers jours de culture. Cette biotransformation a été confirmée récemment par des études

menées au laboratoire qui ont mis en évidence une voie de métabolisation de l'acide caféique en acide protocatéchique ou en acide hydroxycatécholique par *F. verticillioides* (Article soumis, Vessela Atanasova-Pénichon).

Afin de conclure plus précisément sur l'effet de ces composés phénoliques, il serait intéressant de tester l'effet de ces deux composés sur un plus grand nombre de souches de génotypes différents et d'analyser leur possible métabolisation. Cette analyse associée à celle de l'expression d'autres gènes impliqués dans leur transformation permettrait de progresser dans la connaissance des mécanismes d'inhibition de la toxinogénèse en présence d'acides phénoliques.

Références

- ATANASOVA-PENICHON, V., PONS, S., PINSON-GADAIS, L., PICOT, A., MARCHEGAY, G., BONNIN-VERDAL, M.-N., DUCOS, C., BARREAU, C., ROUCOLLE, J., SEHABIAGUE, P., CAROLO, P. & RICHARD-FORGET, F. 2012. Chlorogenic Acid and Maize Ear Rot Resistance: A Dynamic Study Investigating *Fusarium graminearum* Development, Deoxynivalenol Production, and Phenolic Acid Accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1605-1616.
- BAKAN, B., BILY, A. C., MELCION, D., CAHAGNIER, B., REGNAULT-ROGER, C., PHILOGENE, B. J. R. & RICHARD-MOLARD, D. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of Trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2826-2831.
- BOUTIGNY, A., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2008. Natural mechanisms for plant resistance to *Fusarium* mycotoxins accumulation. *Journal of European Plant Pathology*, 121, 411-423.
- BOUTIGNY, A. L. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. *thèse Université Bordeaux I*.
- BOUTIGNY, A. L., ATANASOVA-PENICHON, V., BENET, M., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2010. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *Eur J Plant Pathol*, 127, 275-286.
- BOUTIGNY, A. L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M. N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res*, 113, 746-53.
- CASTELLUCCIO, C., PAGANGA, G., MELIKIAN, N., PAUL BOLWELL, G., PRIDHAM, J., SAMPSON, J. & RICE-EVANS, C. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters*, 368, 188-192.
- JIAO, F., KAWAKAMI, A. & NAKAJIMA, T. 2008. Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett*, 285, 212-9.
- KIM, J., MAHONEY, N., CHAN, K., MOLYNEUX, R. & CAMPBELL, B. 2006. Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 735-739.
- KIM, J. H., YU, J., MAHONEY, N., CHAN, K. L., MOLYNEUX, R. J., VARGA, J., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T. E., NIERMAN, W. C. & CAMPBELL, B. C. 2008. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 49-60.
- METRAUX, J. P. & RASKIN, I. 1993. Role of phenolics in plant disease resistance. *Biotechnology in plant disease control*. New York USA: Wiley-Liss Inc.
- 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.
- NICHOLSON, R. L. & HAMMERSCHMIDT, R. 1992. Phenolic-compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369-389.

-
- PALUMBO, J., O'KEEFFE, T. & MAHONEY, N. 2007. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164, 241-248.
- 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. & DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 1-10.
- PICOT, A., ATANASOVA-PÉNICHON, V., PONS, S., MARCHEGAY, G., BARREAU, C., PINSON-GADAIS, L., ROUCOLLE, J., DAVEAU, F., CARON, D. & RICHARD-FORGET, F. 2013. Maize Kernel Antioxidants and Their Potential Involvement in *Fusarium* Ear Rot Resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3389-3395.
- PONTS, N., ZEHRAOUI, E., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013. Transcriptomic profiling of fumonisin B biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Présentation orale - 12th European Fusarium Seminar*.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BOUTIGNY, AL., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2011. Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes. *Phytopathology*, 101 (8), 929-34.
- SANTOS, V. L. & LINARDI, V. R. 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents—identification and degradation potential. *Process Biochemistry*, 39, 1001-1006.
- SHANMUGAM, V., RONEN, M., SHALABY, S., LARKOV, O., RACHAMIM, Y., HADAR, R., ROSE, M. S., CARMELI, S., HORWITZ, B. A. & LEV, S. 2010. The fungal pathogen *Cochliobolus heterostrophus* responds to maize phenolics: novel small molecule signals in a plant-fungal interaction. *Cellular Microbiology*, 12, 1421-1434.
- VOGEL, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, 13, 42-43.

Chapitre 4:
Régulation de
l'expression du
génomme de
F. graminearum et
paramètres redox

Dans les premiers chapitres, nous avons analysé le rôle du facteur Fgap1 dans la réponse au stress oxydant, en lien avec la modulation du métabolisme secondaire et plus particulièrement la production de TCTB chez *F. graminearum*. Nous avons vu que des gènes de la voie de biosynthèse du DON semblent être régulés *via* Fgap1, au moins de façon indirecte. D'autres gènes classiquement impliqués dans la réponse au stress oxydant ont, quant à eux, des profils de régulations apparemment plus complexes vis-à-vis de Fgap1. Afin de clarifier le rôle de régulateur de Fgap1 chez *F. graminearum* producteur de DON et de 15ADON, nous avons entrepris une démarche de transcriptomique globale avec le double objectif d'identifier les gènes placés sous le contrôle de Fgap1 ainsi que les réseaux de régulation mis en jeu en réponse à des changements des paramètres redox du milieu.

La souche INRA 605 DON/ADON a été cultivée en présence ou non d'H₂O₂ ou d'acide caféique. Ces transcriptomes ont été comparés à ceux de nos mutants $\Delta Fgap1$ et $Fgap1^{c_{trunc}}$ décrits dans le chapitre 1 de ce manuscrit, ainsi qu'à celui du mutant $\Delta Fgap1$ cultivé en présence d'H₂O₂. Les ARN totaux ont été récupérés après 4 et 5 jours de culture. En effet, ces temps de culture correspondent au moment où s'initie l'accumulation des trichothécènes et au moment où les trichothécènes sont bien détectés dans le milieu de culture. Les ARN messagers ont ensuite été isolés et séquencés sur une plateforme à haut-débit (Illumina Hi-Seq 2000) à l'ENS Paris. Les résultats présentés dans ce chapitre sont en cours d'analyse.

I- Introduction

La voie de biosynthèse des TCTB est maintenant identifiée et les gènes *Tri* impliqués sont caractérisés (Gardiner et al., 2009, Kimura et al., 2007, McCormick et al., 2011). Cependant, les mécanismes contrôlant l'expression de cette voie et donc l'accumulation de trichothécènes ne sont pas encore complètement compris. Des études précédentes ont, en particulier, analysé l'effet de variations redox sur la production de TCTB *in vitro*. Ainsi, un stress oxydatif par H₂O₂ stimule l'accumulation des trichothécènes et le niveau d'expression des gènes *Tri* alors que des composés antioxydants les inhibent (Boutigny et al., 2009, Ponts et al., 2007) (Chapitres 1, 2 et 3 de ce manuscrit). De plus, nous avons montré que *Fgap1* est impliqué dans la réponse au stress oxydant et dans l'accumulation de trichothécènes *via* la régulation des gènes *Tri* chez *F. graminearum* (Montibus et al., 2013)(Article soumis). Plus précisément, un mutant $\Delta Fgap1$ qui n'est plus capable d'activer les gènes de réponse au stress oxydant, produit plus de toxines que la souche sauvage, en association avec une surexpression des gènes *Tri4* et *Tri5*. De plus, l'accumulation de trichothécènes chez ce mutant n'est plus stimulée par le stress oxydant. En revanche, un mutant *Fgap1^c_{trunc}* exprimant une forme tronquée et constitutivement active de la protéine Fgap1 produit, quant à lui, de faibles quantités de trichothécènes, associées à une forte répression des gènes *Tri4* et *Tri5*, quelles que soient les conditions testées, y compris en réponse au stress (Montibus et al., 2013)(article soumis). Les mécanismes impliqués dans ces régulations ne sont cependant pas encore élucidés. Dans un contexte plus large, et malgré les avancées décrites dans les chapitres précédents de cette thèse, la régulation de la production de trichothécènes en réponse à des changements des paramètres redox du milieu n'est pas complètement comprise. L'analyse des réseaux de régulation transcriptionnelle, ainsi que leur dynamique au cours de la production de toxines en présence/absence de composés oxydants et antioxydants est nécessaire à la compréhension détaillée des mécanismes mis en jeu ici.

Une approche de transcriptomique globale pourrait ainsi mettre en avant des voies de régulation impliquées dans la réponse aux variations redox en lien avec la production de toxines et Fgap1. Une telle approche est largement simplifiée par la disponibilité d'un génome de référence entièrement séquencé pour *F. graminearum* (Cuomo et al., 2007). Ainsi, *F. graminearum* possède plus de 13700 gènes répartis sur quatre chromosomes (environ 36 Mb au total, annotation v3.1) (Wong et al., 2011).

Des données de régulations transcriptionnelles existent mais elles sont dispersées et leurs résultats restent difficiles à intégrer. Par exemple, une approche par « microarrays » a permis d'identifier plus de 3000 gènes de *F. graminearum* exprimés indifféremment en milieu restreint en azote ou restreint en carbone (Güldener et al., 2006). Ces mêmes biopuces ont permis d'identifier 395 gènes de *F. graminearum* exprimés aussi bien pendant l'infection du blé que de l'orge (Boddu et al., 2006, Lysoe et al., 2011), mais également les gènes impliqués dans les différentes étapes de la différenciation des périthèces (Hallen et al., 2007) ou encore de la germination des macroconidies (Seong et al., 2008).

Très récemment, une analyse de type RNA-seq a été réalisée chez *F. graminearum* producteur de DON dans le but d'améliorer l'annotation du génome et, en particulier, d'identifier des épissages alternatifs (Zhao et al., 2013). Cette étude a mis en évidence que 377 gènes étaient incorrectement annotés dans la base de données du Broad Institute et que 231 gènes sont soumis à des événements d'épissage alternatif. L'aspect quantitatif des niveaux d'expression des gènes n'a cependant pas été traité.

Au-delà de l'aspect structural (*i.e.* identification de transcrits par exemple), les approches de type RNA-seq présentent plusieurs avantages par rapport aux biopuces. En effet, le RNA-seq ne se limite pas à la détection de transcrits correspondant à des séquences génomiques connues mais permet de réaliser des analyses sans a priori et en incluant des éventuels

Tableau 1 : Amorces utilisées pour les analyses par q-RT-PCR.

ORF	Amorce sens 5'→3'	Amorce antisens 5'→3'
FGSG_06257- <i>GAPDH</i>	TCAAGGGTGTCTGGCCTAC	AGTAACCCCACTCGTTGTCG
FGSG_08811- <i>EF1α</i>	TGTCTACAAGATTGGCGC	CTTGCAGGCAATGTGG
FGSG_03535- <i>Tri4</i>	TATTGTTGGCTACCCCAAGG	TGTCAGATGCGCCTTACAAA
FGSG_03537- <i>Tri5</i>	GACCCTAAGCGACTACAG	GTGCTACGGATAAGGTTC
FGSG_03536- <i>Tri6</i>	AGCGCCTTGCCCCTCTTTG	AGCCTTTGGTGCCGACTTCTTG
FGSG_07896- <i>Tri101</i>	AGGGCATTAGCGAGGGAAACACA	ACGGCACGCCTTGGAGAGTAGAC

variants de séquences ou structuraux (*e.g.* polymorphisme naturel intra-espèce de type SNP). Enfin, d'un point de vue technique, le RNA-seq présente de nombreux avantages tels qu'une absence de limite supérieure de quantification, une excellente sensibilité et reproductibilité, et un besoin de peu de matériel au départ (Wang et al., 2009).

Dans cette étude, nous avons appliqué une approche de type RNA-seq en mode « paires » pour l'analyse du transcriptome de *F. graminearum* producteur de DON en comparaison avec ceux de nos souches transformées $\Delta Fgap1$ et $Fgap1^c_{trunc}$, et également en réponse à des variations redox. Les objectifs de cette étude sont d'analyser les variations d'expression de gènes en fonction des paramètres redox du milieu (*i.e.* pour notre analyse en présence de H₂O₂ ou d'acide caféique), et également d'identifier le(s) réseau(x) de régulation dans le(s)quel(s) le facteur *Fgap1* est impliqué dans le cadre de la réponse au stress oxydant.

II- Procédures expérimentales

II-1- Souches fongiques, conditions de culture, analyse des TCTB, préparation des ARNs et analyses q-RT-PCR

Ces procédures ont été réalisées comme précédemment décrit dans le Chapitre 1 de ce manuscrit. La souche sauvage I605 de chémotype DON/ADON, le mutant $\Delta Fgap1$ et deux mutants $Fgap1^c_{trunc}$ validés dans le chapitre 1 ont été utilisés ici. Les amorces utilisées pour les analyses en q-RT-PCR sont résumées dans le Tableau 1. Deux gènes de référence ont été choisis : *GAPDH* et *EF1 α* .

II-2- Préparation des banques et séquençage

Les ARN totaux de deux à trois répétitions biologiques ont été combinés. Les ARNm polyadénylés ont ensuite été purifiés en utilisant le kit NEBNext Poly(A) Magnetic Isolation Module (NEB, USA), en suivant les instructions du fournisseur. Les banques de séquençage ont ensuite été construites en utilisant le kit NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, USA) selon les instructions du fournisseur, au sein de la plateforme de séquençage Genomic Paris Centre de l'ENS Paris (J. Pouch et S. Le Crom). Cette procédure permet de préserver l'information d'orientation des ARN séquencés (mode directionnel). Les banques ont enfin été séquencées en 6-plex 2x100 pb (mode « paires ») sur une plateforme Illumina® HiSeq 2000 (réactifs Illumina Truseq v3, deux lignes de séquençage) à la plateforme de séquençage Genomic Paris Centre (J. Pouch).

II-3- Préparation des séquences et alignement sur le génome de référence

Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel CLC Genomic Workbench v6.5. Notre plan de travail est présenté en Figure S1. Les séquences ne dépassant pas un ratio signal/bruit satisfaisant (critère Illumina® chastity ≥ 0.6) ont été éliminées. Elles ont ensuite été nettoyées pour éliminer les parties correspondantes aux adaptateurs et aux amorces utilisés pour la préparation des banques et le séquençage, ainsi que les nucléotides et les séquences de qualité insuffisante (Sanger Q score < 15 , *i.e.* probabilité qu'il s'agisse d'une erreur de séquençage < 0.05). Les données de qualité mesurées avec le logiciel FastQC de S. Andrews, Babraham, Bioinformatics) ont également été prises en compte. Les séquences de longueur inférieure à 15 nucléotides à la suite de ce nettoyage ont été éliminées pour limiter les ambiguïtés d'alignement dans la suite de notre analyse. Les séquences contenant plus de 10% de N (nucléotide inconnu) ont également été retirées de notre analyse.

Enfin, seules les paires de séquences restées intactes, *i.e.* celles dont les deux membres de la paire ont une qualité satisfaisante, ont été gardées pour la suite de l'analyse. Les séquences de chaque échantillon ont ensuite été alignées sur le génome de référence de *F. graminearum* (EnsemblFungi20 annotation FG3) et les paires de séquences s'alignant sur chaque transcrit ont été comptées (selon le mode qu'une paire de séquences compte pour un alignement). Les résultats obtenus ont ensuite été normalisés en ramenant tous les résultats à 10 millions de séquences alignées puis par la méthode des quantiles et exprimés en Reads Per Kilobase Mapped ou RPKM (Mortazavi et al., 2008).

II-4- Comparaison des profils transcriptomiques

Une analyse d'expression différentielle entre échantillons pris deux à deux a ensuite été réalisée (Tableau 6). Les différences significatives d'expression ont été évaluées en utilisant le Z-test de Kal, basé sur les proportions ($p \leq 0.01$) (Kal et al., 1999), et en maintenant un taux de faux positifs en dessous de 1% ($FDR \leq 0.01$).

Tableau 2 : Résumé des conditions expérimentales testées.

Génotype considéré de <i>F. graminearum</i> , code INRA 605, DON/15ADON	Condition	Temps de culture	Code attribué
Sauvage	Non supplémentée	4 jours	A
Sauvage	H ₂ O ₂ 0.5 mM	4 jours	B
Sauvage	Acide caféique 0.5 mM	4 jours	C
$\Delta Fgap1$	Non supplémentée	4 jours	D
$\Delta Fgap1$	H ₂ O ₂ 0.5 mM	4 jours	E
$Fgap1^c_{trunc 1}$	Non supplémentée	4 jours	F
$Fgap1^c_{trunc 2}$	Non supplémentée	4 jours	G
Sauvage	Non supplémentée	5 jours	A
Sauvage	H ₂ O ₂ 0.5 mM	5 jours	B
Sauvage	Acide caféique 0.5 mM	5 jours	C
$\Delta Fgap1$	Non supplémentée	5 jours	D
$\Delta Fgap1$	H ₂ O ₂ 0.5 mM	5 jours	E

III- Résultats

III-1- Conditions biologiques utilisées pour l'analyse RNA-seq, accumulation de trichothécènes et expression des gènes *Tri* correspondant

La régulation globale des niveaux d'expression de la souche sauvage et des mutants $\Delta Fgap1$ et $Fgap1^c_{trunc}$ en réponse aux variations redox a été réalisée par analyse transcriptomique. Les conditions expérimentales choisies pour cette analyse sont regroupées dans le Tableau 2.

La production de trichothécènes a été évaluée dans ces conditions et les résultats sont présentés dans la Figure 1. Les données sont cohérentes avec celles obtenues dans les chapitres 1 et 3 de ce manuscrit. Le stress oxydant stimule la production de TCTB chez la souche sauvage (B vs A) alors que l'acide caféique l'inhibe (C vs A). Le mutant $\Delta Fgap1$ produit plus de trichothécènes que la souche sauvage (D vs A), et le stress oxydant n'a pas d'effet sur l'accumulation de toxines chez ce mutant (E vs D). Enfin, les deux mutants $Fgap1^c_{trunc}$ (F et G) produisent de très faibles quantités de trichothécènes.

Les ARN de ces conditions ont été extraits après 4 et 5 jours de culture pour l'analyse RNA-seq et ont également été utilisés pour une analyse en q-RT-PCR. Les niveaux d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6* et *Tri101* ont été analysés (Figure 2). L'effet du traitement a d'abord été analysé à 4 jours de culture (Figure 2-A). Le traitement avec H₂O₂ entraîne une augmentation générale du niveau d'expression des gènes *Tri* alors que l'acide caféique entraîne une forte inhibition (jusqu'à plus de 4 fois). Des résultats identiques sont observables à 5 jours de culture (données non présentées). Nous avons ensuite comparé le niveau d'expression des gènes *Tri* chez les mutants par rapport à la souche sauvage (Figure 2-B). Chez le mutant $\Delta Fgap1$, les gènes *Tri4* et *Tri5* sont surexprimés par rapport à la souche sauvage.

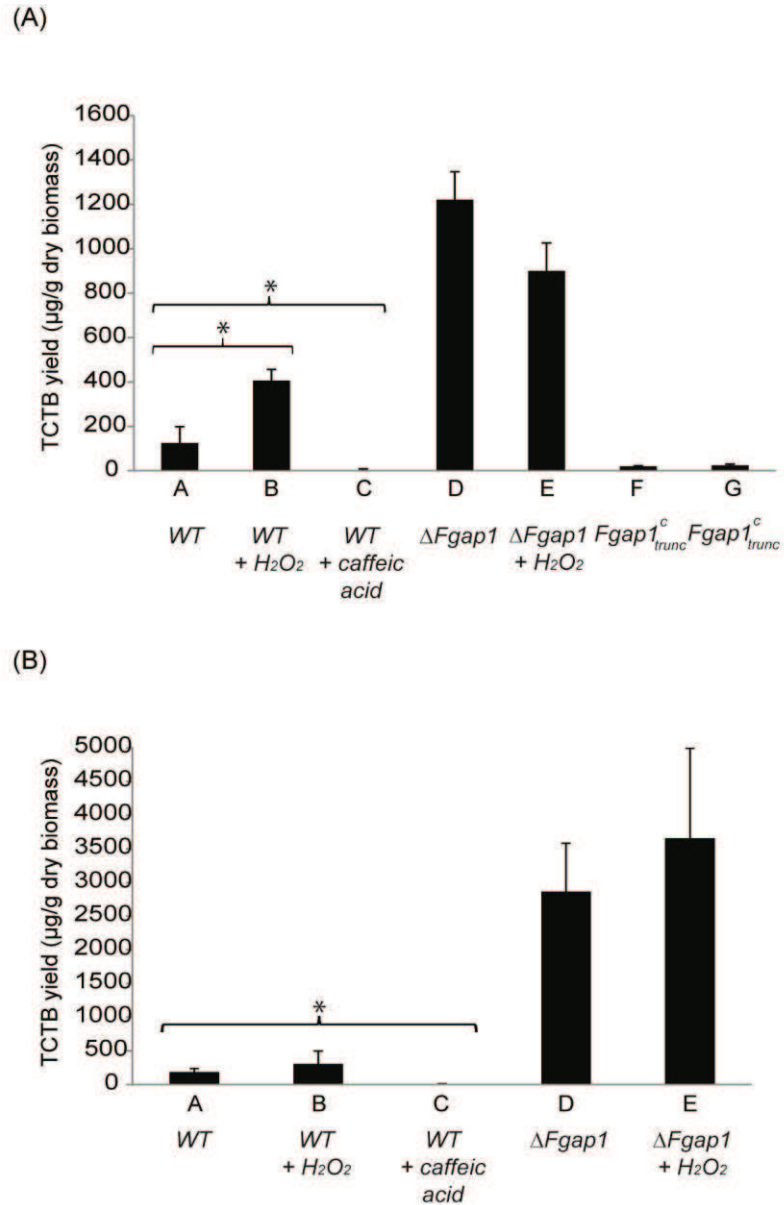


Figure 1: Production en trichothécènes pour les souches étudiées. (A) Quantité de trichothécènes (DON+15ADON) dans les différentes conditions testées après 4 jours de culture. (B) Quantité de trichothécènes (DON+15ADON) dans les différentes conditions testées après 5 jours de culture. Les conditions A, B, et C correspondent à la souche sauvage de *F. graminearum* en conditions contrôles (non supplémentées), supplémentées avec 0.5 mM de H₂O₂ ou avec 0.5 mM d'acide caféique, respectivement. Les conditions D et E correspondent au mutant $\Delta Fgap1$ en conditions contrôles (non supplémentées) ou supplémentées avec 0.5 mM de H₂O₂. Les conditions F et G correspondent aux deux mutants $Fgap1_c^{trunc}$ en conditions contrôles (non supplémentées). Les valeurs présentées sont exprimées en µg de toxines par g de biomasse sèche et correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de trois répétitions biologiques. L'étoile indique une différence significative entre les deux conditions testées (Student t-test, $p = 0.05$).

Chez les deux mutants tronqués, tous les gènes *Tri* sont fortement sous exprimés (plus de 16 fois) en comparaison à la souche sauvage. Encore une fois, les mêmes résultats sont observables à 5 jours de culture (données non présentées). Les variations des niveaux d'expression observées pour les gènes *Tri* sont en accord avec les niveaux de production de trichothécènes mesurés dans chaque condition.

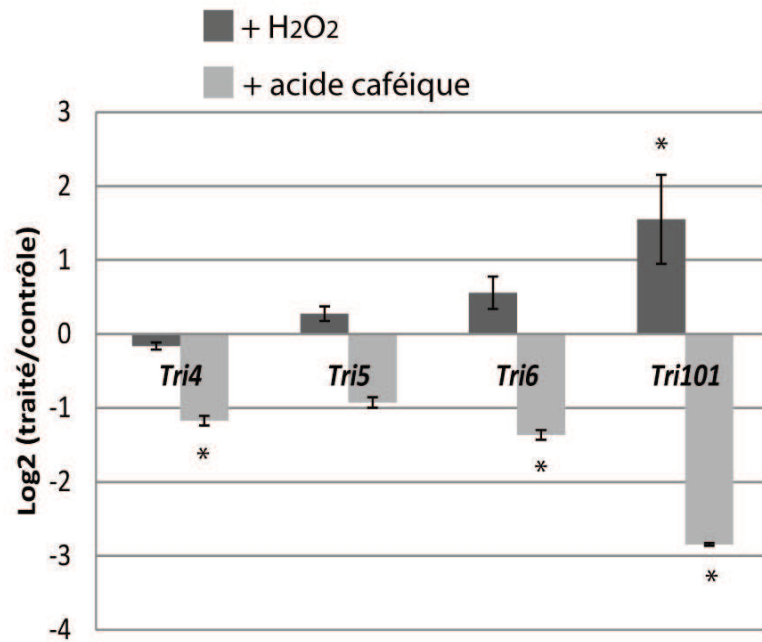
III-2- Analyse transcriptomique globale par mRNA-seq : pré-traitement des lectures de séquençage

Les échantillons ont été séquencés sur une plateforme HiSeq 2000 (Illumina®) et les séquences de qualités insuffisantes ont été exclues de l'analyse (voir la section Procédures expérimentales et la Figure S1). Plus de 17 millions de séquences de haute qualité ont ainsi été obtenues, longues de 87 à 88 nucléotides en moyenne, ce qui représente une profondeur minimale de séquençage (*i.e.* le nombre de fois où le génome de *F. graminearum* est couvert, en se basant sur une taille du génome de 36 Mb, ou X coverage) de 43 fois le génome de référence (Tableau 3). D'une manière générale, il est admis qu'une profondeur de 30X est nécessaire à la réalisation d'analyses fiables.

Tableau 3 : Rendements de séquençage.

Nom de l'échantillon	Index multiplex	Nombre de séquences (paired)	Nombre de séquences après filtre "chastity" Illumina	Nombre de séquences après nettoyage	Taille moyenne des séquences (pb)	X - coverage
WT 4j [A]	ATGTCA	21863704	21149962	17774174	87,9	43
WT H ₂ O ₂ 4j [B]	GAGTGG	30600506	29761318	23110354	88,1	57
WT caf 4j [C]	GTTTCG	91407532	88913826	84050354	88,1	206
$\Delta Fgap1$ 4j [D]	ACTGAT	22320250	21826638	20513870	88,1	50
$\Delta Fgap1$ H ₂ O ₂ 4j [E]	ATTCCT	35523774	34389680	29427316	88,0	72
<i>Fgap1</i> ^{c trunc} 1 4j [F]	TGACCA	106704640	104226134	101426076	88,2	248
<i>Fgap1</i> ^{c trunc} 2 4j [G]	GCCAAT	84101454	76213904	74205622	87,3	180
WT 5j [A]	CTTGTA	89042670	80811288	78307388	87,4	190
WT H ₂ O ₂ 5j [B]	AGTCAA	83516856	76087250	73329520	87,4	178
WT caf 5j [C]	GTCCGC	108997096	97968584	91403020	87,3	222
$\Delta Fgap1$ 5j [D]	AGTTCC	86354048	78782612	75407502	87,5	183
$\Delta Fgap1$ H ₂ O ₂ 5j [E]	GAGTGG	78912580	72184316	70111360	87,4	170

A



B

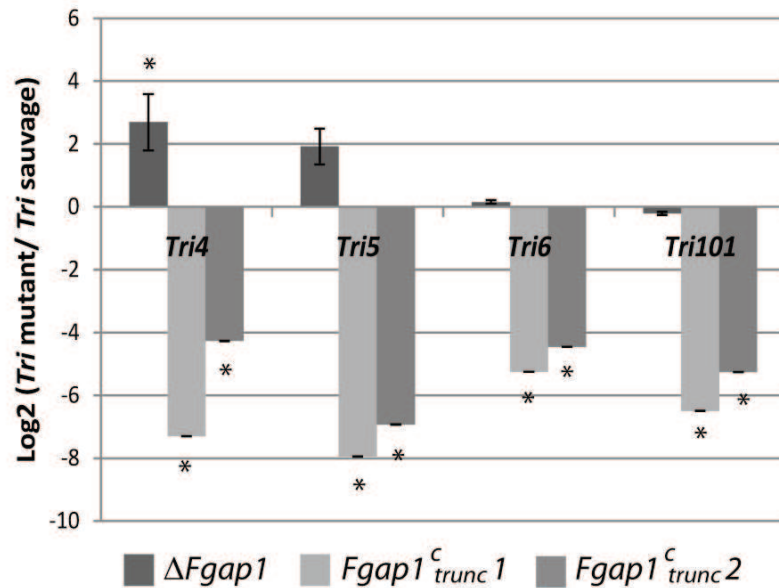


Figure 2 : Niveau d'expression des gènes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6* et *Tri101* après 4 jours de culture. (A) Effet de l'H₂O₂ et de l'acide caféique sur le niveau d'expression des gènes *Tri* chez la souche sauvage. (B) Niveau d'expression des gènes *Tri* chez les mutants comparés à la souche sauvage. Les résultats sont les ratios d'expression exprimés en log2. * indique une variation significative en comparaison avec le contrôle.

Nous avons ensuite aligné les séquences obtenues sur le génome de référence de *F. graminearum* (EnsemblFungi20, annotation FG3), avec le logiciel CLC Genomic Workbench v6.5. Deux approches ont été envisagées : un alignement sur le génome annoté afin de quantifier les niveaux d'expression des gènes dans nos différentes conditions, et un alignement sur le génome sans annotation dans le but d'identifier éventuellement de nouveaux transcrits et des transcrits antisens en utilisant le fait que nos banques de séquençage aient été construites en préservant l'information d'orientation des gènes. Seuls les résultats préliminaires sur le génome annoté sont présentés ici, le reste de l'analyse étant actuellement en cours.

L'alignement sur le génome et l'annotation de référence de *F. graminearum* a été réalisé de façon stricte, en autorisant deux mis-appariements au maximum par séquence ne trouvant d'alignement possible qu'une fois exactement dans tout le génome. Plus de 68% des séquences ont ainsi pu être alignées, pour chaque échantillon, sur le génome de référence de *F. graminearum*, donnant une profondeur de séquençage minimale de 30X.

Tableau 4 : Statistiques d'alignement sur le génome de *F. graminearum*.

Nom de l'échantillon	Index multiplex	Taille moyenne des séquences (pb)	Nombre de séquences totales	Nombre de séquences s'alignant exactement une fois avec un maximum de deux mis-appariements	X-coverage
WT 4j [A]	ATGTCA	87,9	17774174	12150654	30
WT H ₂ O ₂ 4j [B]	GAGTGG	88,1	23110354	16445301	40
WT caf 4j [C]	GTTTCG	88,1	84050354	65436850	160
$\Delta Fgap1$ 4j [D]	ACTGAT	88,1	20513870	14453516	35
$\Delta Fgap1$ H ₂ O ₂ 4j [E]	ATTCTT	88,0	29427316	23197913	57
<i>Fgap1</i> ^{c trunc} 1 4j [F]	TGACCA	88,2	101426076	86462688	212
<i>Fgap1</i> ^{c trunc} 2 4j [G]	GCCAAT	87,3	74205622	61903314	150
WT 5j [A]	CTTGTA	87,4	78307388	65796358	160
WT H ₂ O ₂ 5j [B]	AGTCAA	87,4	73329520	62279928	151
WT caf 5j [C]	GTCCGC	87,3	91403020	64042185	155
$\Delta Fgap1$ 5j [D]	AGTTCC	87,5	75407502	62366746	152
$\Delta Fgap1$ H ₂ O ₂ 5j [E]	GAGTGG	87,4	70111360	57991176	141

Un exemple d'alignement de séquences de la souche sauvage, du mutant $\Delta Fgap1$ et du mutant $Fgap1^c_{trunc} 1$ sur le gène *Fgap1* (FGSG_08800) est présenté en Figure S2. Ces alignements valident les mutants que nous avons réalisés. En effet, les 3000 lectures du séquençage s'alignent parfaitement avec les exons du gène *Fgap1*, validant l'annotation du gène et la présence de deux introns. Pour le mutant $\Delta Fgap1$, l'absence de lectures de séquences dans la partie centrale du gène valide la délétion. Pour le mutant $Fgap1^c_{trunc}$, le plus grand nombre de lectures de séquençage (facteur 10 par rapport au gène sauvage) au niveau des deux premiers exons valide la surexpression de la forme tronquée.

Etant donné qu'après alignement sur le génome de référence, la profondeur de séquençage obtenue n'est pas la même pour tous les échantillons, l'analyse de la distribution des échantillons que nous avons réalisée par box-plot montrait une dispersion variable d'un échantillon à l'autre (Figure 3). Cette dispersion pouvant venir d'une efficacité différente de séquençage, nous avons alors normalisé nos données, comme indiqué dans les procédures expérimentales, pour compenser les dispersions obtenues entre échantillons et pour pouvoir comparer convenablement les niveaux d'expression dans nos échantillons (Figure 4). Les valeurs d'expression sont exprimées en RPKM (Mortazavi et al., 2008) afin de pondérer le biais lié à des longueurs différentes de gènes. A titre d'exemple, les valeurs d'expression normalisée des gènes *Tri* sont présentées dans le Tableau 5. Ces résultats suivent ceux obtenus en q-RT-PCR : les gènes *Tri* sont sous exprimés en présence d'acide caféique chez la souche sauvage, surexprimés chez le mutant délété et très largement sous-exprimés chez les mutants où *Fgap1* est tronqué.

Tableau 5 : Valeurs d'expression normalisées pour les gènes *Tri* à 4 jours de culture.

Gène	Sauvage	Sauvage + H ₂ O ₂	Sauvage + acide caféique	$\Delta Fgap1$	$Fgap1^c_{trunc} 1$	$Fgap1^c_{trunc} 2$
<i>Tri4</i>	6467	3314	2826	10870	12	122
<i>Tri5</i>	1682	1601	1690	3798	2	13
<i>Tri6</i>	861	879	517	1119	24	74
<i>Tri101</i>	1703	878	542	2247	66	168

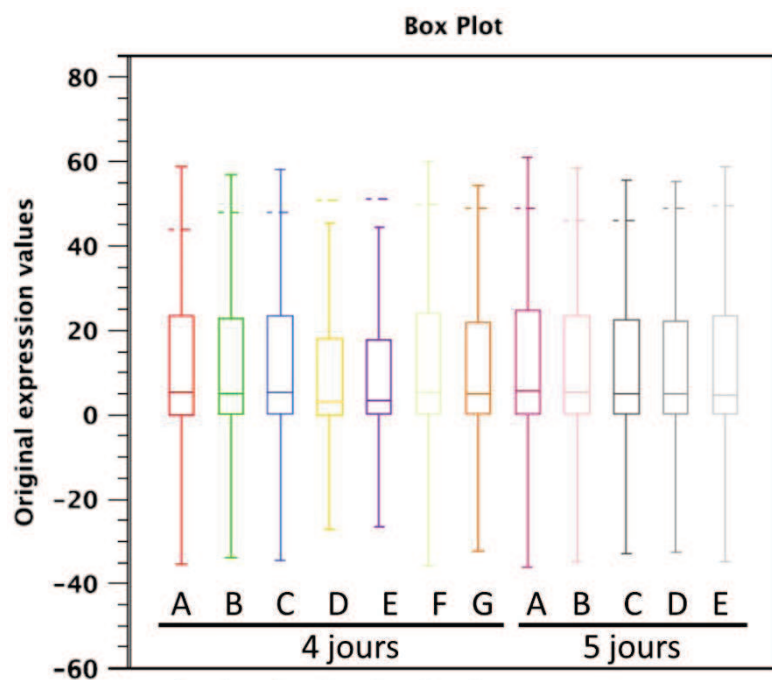


Figure 3 : Dispersion des valeurs d'expression avant la normalisation des données. Les codes A, B, C, D, E, F et G correspondent aux échantillons référencés dans le Tableau 2.

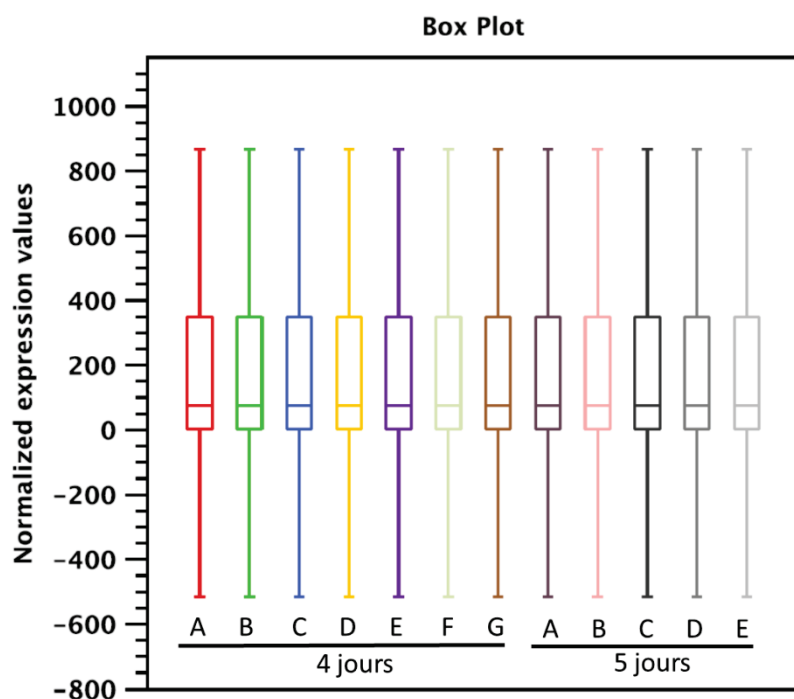


Figure 4 : Dispersion des valeurs d'expression après la normalisation des données. Les codes A, B, C, D, E, F et G correspondent aux échantillons référencés dans le Tableau 2.

III-3- Expression différentielle

Les valeurs d'expression des gènes ont été comparées dans les échantillons pris deux à deux, selon le schéma proposé en Tableau 6. Le nombre de gènes sous- et surexprimés varie en fonction des situations considérées. Nous pouvons voir que cependant, pour chaque analyse présentée ici, un nombre conséquent de gènes est surexprimé ou sous-exprimé, par rapport au nombre de gènes considérés au départ (environ 15600 gènes). Les résultats sont en cours d'analyse.

Tableau 6 : Analyse d'expression différentielle entre échantillons pris deux à deux ($p \leq 0.01$; $FDR \leq 0.01$).

Conditions comparées à 4 jours de culture	Nombre de gènes sur-exprimés	Nombre de gènes sous exprimés
Sauvage vs Sauvage + H ₂ O ₂	2556	2380
Sauvage vs Sauvage + acide caféique	2453	2755
Sauvage vs $\Delta Fgap1$	3070	3169
Sauvage vs $Fgap1^{c_{trunc} 1}$	2915	3013
Sauvage vs $Fgap1^{c_{trunc} 2}$	2535	2786

IV- Conclusion

L'analyse de nos données RNA-seq est loin d'être terminée mais les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent sont extrêmement encourageants. Nos premiers résultats ont permis de valider nos mutants et de voir que les valeurs d'expression normalisées obtenues semblaient être cohérentes avec les résultats obtenus en q-RT-PCR. De plus, les analyses d'expression différentielle semblent montrer un nombre conséquent de gènes sous-exprimés ou surexprimés de manière significative lorsque *Fgap1* est délété (environ 6000 sur 15000).

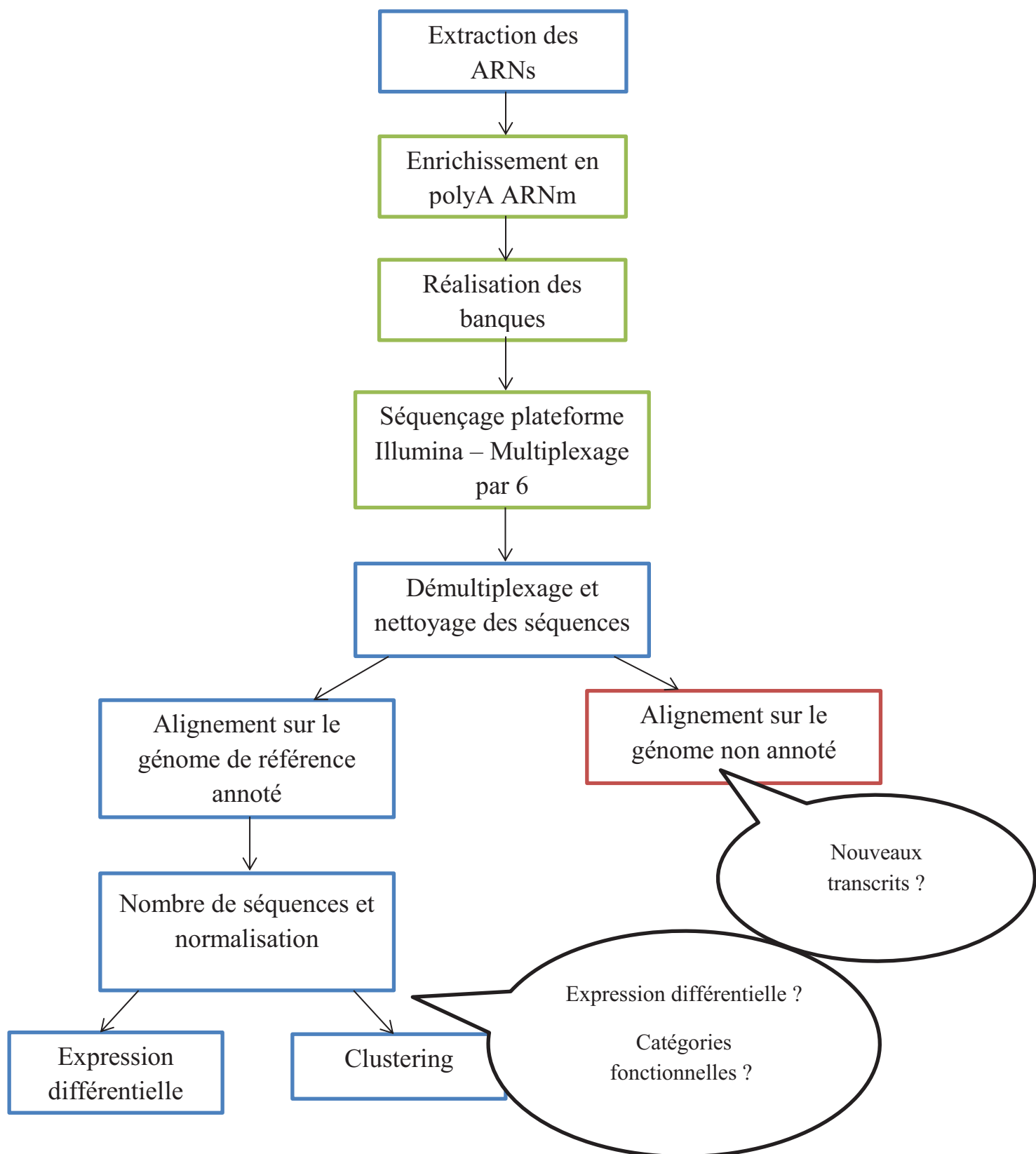


Figure S1 : Plan de réalisation du séquençage et de son analyse. Les rectangles verts correspondent aux étapes réalisées par l'ENS-Paris. Les rectangles bleus correspondent aux étapes réalisées par nos soins. Le rectangle rouge correspond à une analyse envisagée par la suite.

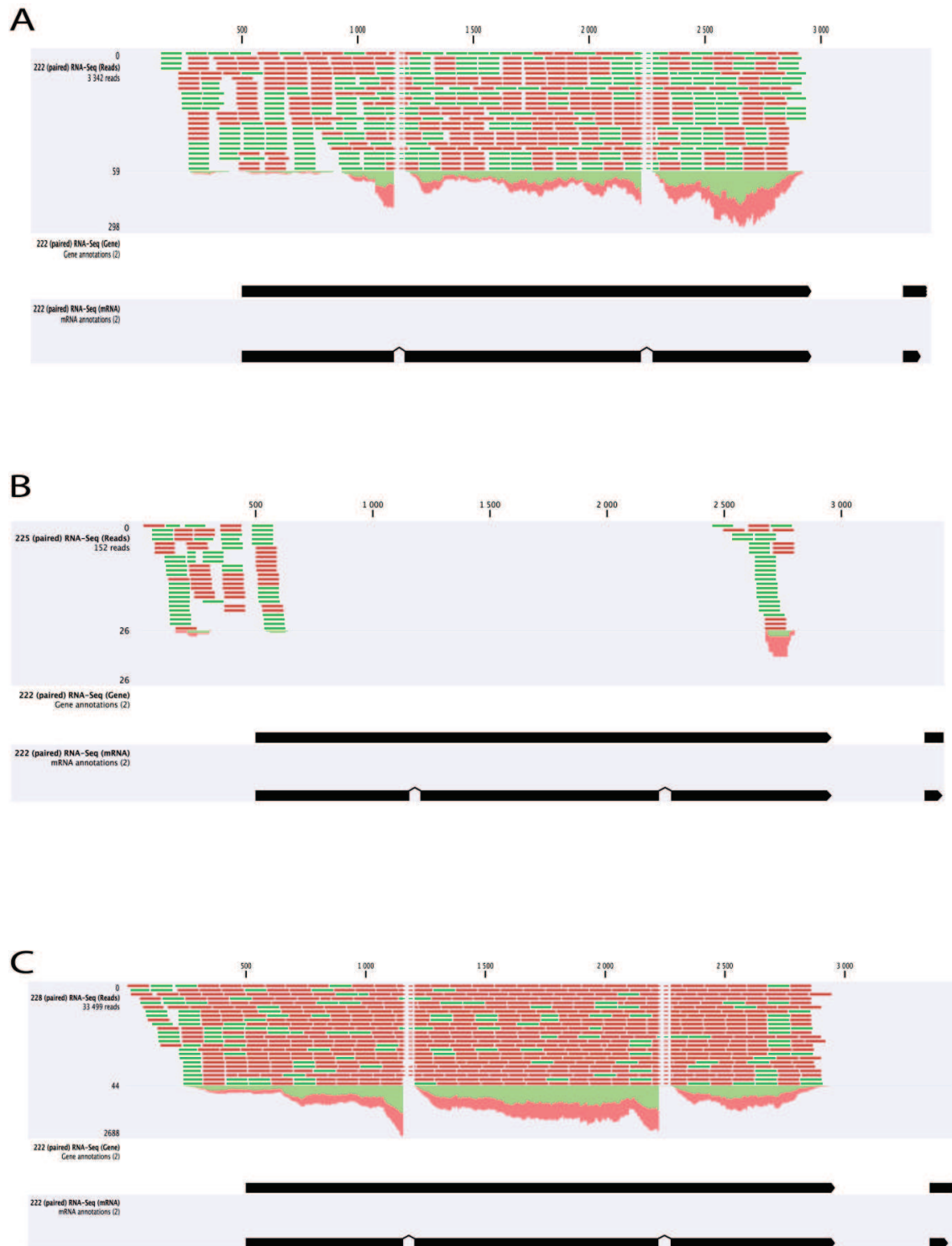


Figure S2 : Alignements des lectures de séquençages sur le gène FGSG_088000 (*Fgap1*). (A). Souche INRA605 à 4 jours de culture. 3342 séquences s'alignent sur les exons de *Fgap1*. (B). Mutant $\Delta Fgap1$ à 4 jours de culture. 152 séquences s'alignent avec les parties 5' et 3' de *Fgap1*. La partie centrale n'est effectivement plus exprimée. (C). Mutant *Fgap1*^{c trunc} 1 à 4 jours de culture. 33499 séquences s'alignent sur les exons de *Fgap1*. Le nombre important de séquences présentes sur les deux premiers exons reflète la surexpression de la forme tronquée de *Fgap1*. Les séquences s'alignant sur la fin du transcrit proviennent uniquement de la copie sauvage de *Fgap1*.

Un travail important reste cependant à faire, avec l'analyse fonctionnelle de ces données et l'identification des gènes placés sous le contrôle de Fgap1 ainsi que les réseaux de régulation mis en place en réponse à des changements des paramètres oxydants du milieu. De façon plus exploratoire, une recherche de nouveaux transcrits (en incluant les évènements d'épissage alternatif) et de transcrits antisens éventuels a également été entreprise.

Très récemment, nous avons entrepris une autre analyse de transcriptomique par RNA-seq, en partenariat avec la plateforme de génotypage INRA-Pierroton (F. Salin), cette fois pour comparer les différences qui peuvent exister entre les souches de chémotype DON et celles de chémotype NIV. Les souches INRA 605 de chémotype DON/15ADON et INRA 91 de chémotype NIV/FX ont ainsi été cultivées pendant 4 jours en présence ou absence d'acide caféique avant la préparation d'ARN totaux déplétés de leurs séquences ribosomales pour un séquençage sur la plateforme Proton® de Ion Torrent – Life Technologies. Cette approche expérimentale est en cours d'évaluation.

Références

- BODDU, J., CHO, S., KRUGER, W. M. & MUEHLBAUER, G. J. 2006. Transcriptome analysis of the barley-Fusarium graminearum interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 407-17.
- BOUTIGNY, A. L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M. N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in Fusarium liquid cultures. *Mycol Res*, 113, 746-53.
- 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., KENNEL, 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, 1400-2.
- GARDINER, D. M., KAZAN, K. & MANNERS, J. M. 2009. Novel Genes of *Fusarium graminearum* That Negatively Regulate Deoxynivalenol Production and Virulence. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 1588-600.
- GÜLDENER, U., SEONG, K.-Y., BODDU, J., CHO, S., TRAIL, F., XU, J.-R., ADAM, G., MEWES, H.-W., MUEHLBAUER, G. J. & KISTLER, H. C. 2006. Development of a Fusarium graminearum Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genetics and Biology*, 43, 316-325.
- HALLEN, H. E., HUEBNER, M., SHIU, S. H., GULDENER, U. & TRAIL, F. 2007. Gene expression shifts during peritheciium development in Gibberella zeae (anamorph Fusarium graminearum), with particular emphasis on ion transport proteins. *Fungal Genet Biol*, 44, 1146-56.
- KAL, A. J., VAN ZONNEVELD, A. J., BENES, V., VAN DEN BERG, M., KOERKAMP, M. G., ALBERMANN, K., STRACK, N., RUIJTER, J. M., RICHTER, A., DUJON, B., ANSORGE, W. & TABAK, H. F. 1999. Dynamics of Gene Expression Revealed by Comparison of Serial Analysis of Gene Expression Transcript Profiles from Yeast Grown on Two Different Carbon Sources. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 1859-1872.
- KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S. & FUJIMURA, M. 2007. Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 2105-23.
- LYSOE, E., SEONG, K. Y. & KISTLER, H. C. 2011. The transcriptome of Fusarium graminearum during the infection of wheat. *Mol Plant Microbe Interact*, 24, 995-1000.
- MCCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3, 802-814.
- MONTIBUS, M., DUCOS, C., BONNIN-VERDAL, M. N., BORMANN, J., PONTS, N., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013. The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in Fusarium graminearum. *Submitted to Plos One*.

- MORTAZAVI, A., WILLIAMS, B. A., MCCUE, K., SCHAEFFER, L. & WOLD, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Meth*, 5, 621-628.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BARREAU, C., RICHARD-FORGET, F. & OUELLET, T. 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *Febs Letters*, 581, 443-447.
- SEONG, K.-Y., ZHAO, X., XU, J.-R., GÜLDENER, U. & KISTLER, H. C. 2008. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 389-399.
- WANG, Z., GERSTEIN, M. & SNYDER, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10, 57-63.
- WONG, P., WALTER, M., LEE, W., MANNHAUPT, G., MUNSTERKOTTER, M., MEWES, H. W., ADAM, G. & GULDENER, U. 2011. FGDB: revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Res*, 39, D637-9.
- ZHAO, C., WAALWIJK, C., DE WIT, P. J. G. M., TANG, D. & VAN DER LEE, T. 2013. RNA-Seq analysis reveals new gene models and alternative splicing in the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics*, 14, 21.

Discussion

générale et

Perspectives

Un des moteurs principaux ayant motivé les nombreuses études sur *F. graminearum* est la synthèse par ce champignon filamentueux phytopathogène de métabolites secondaires toxiques, les trichothécènes de type B (TCTB). Ces toxines vont s'accumuler dans les grains, et sont à l'origine de conséquences sanitaires et économiques importantes. Le niveau de toxines accumulées dépend du climat, des pratiques culturales, de la disponibilité de l'inoculum mais également du niveau de résistance des variétés de céréales utilisées. Ce niveau est donc très variable. Un des éléments essentiels pour progresser dans la maîtrise de la contamination est une compréhension fine des mécanismes induisant ou réprimant la biosynthèse des TCTB *in planta*.

Les étapes conduisant à la voie de biosynthèse des TCTB sont maintenant identifiées et les gènes *Tri* codant pour les enzymes impliquées dans cette voie sont désormais connus (Gardiner et al., 2009, McCormick et al., 2011). Plusieurs facteurs externes ont été démontrés comme modulant la voie de biosynthèse des trichothécènes (Merhej et al., 2011). Les sources de nutriment jouent un rôle important dans cette modulation (Gardiner et al., 2009, Jiao et al., 2008). Des études précédentes menées au laboratoire ont également montré l'implication, *via* des facteurs de transcription, de facteurs environnementaux tels que le pH ou la lumière (Merhej et al., 2010). Les variations du potentiel redox du milieu ont également été étudiées. Ainsi, un stress oxydant induit une surexpression des gènes *Tri* et en conséquence active la production de trichothécènes chez *F. graminearum* (Ponts et al., 2007). A l'opposé, les composés antioxydants tels que l'acide férulique inhibent la production de toxines et l'expression des gènes *Tri* (Boutigny et al., 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette modulation n'étaient pas encore élucidés. Ce travail s'est intéressé à la caractérisation de la réponse aux variations redox chez une souche de chémotype DON/ADON et chez une souche de chémotype NIV/FX. L'identification du facteur Fgap1 et sa caractérisation comme acteur de la réponse aux variations redox ont été entreprises.

I- Réponse aux variations redox et chémotype

L'effet de stress oxydatifs a été analysé sur notre souche modèle pour ce travail, la souche *F. graminearum* référencée INRA 605, de chémotype DON/ADON. H_2O_2 , testée dans notre étude à la concentration de 0,5 mM, active la production de trichothécènes et l'expression des gènes *Tri* chez la souche DON/ADON. Une comparaison a été réalisée avec une souche *F. graminearum* de chémotype NIV/FX et a montré que chez ce chémotype, H_2O_2 n'activait pas la production de trichothécènes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment sur un panel plus large de souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* (Ponts et al., 2009). La différence observée pourrait s'expliquer par le fait que les souches de chémotype NIV/FX possèdent un meilleur équipement catalase. Les catalases sont responsables de la dismutation de l' H_2O_2 . Les souches NIV/FX développeraient une meilleure adaptation au stress oxydant induit par H_2O_2 comparées aux souches DON/ADON.

Nous avons ensuite analysé l'effet d'un autre oxydant, le diamide, sur la production de trichothécènes chez les deux souches de chémotype DON/ADON et NIV/FX. Dans les deux cas, le diamide active très fortement la production de trichothécènes. Notre analyse en RT-PCR semi-différentielle n'a cependant pas permis de montrer une modulation significative de l'expression des gènes *Tri* associée à cette augmentation de la production de toxines. Une analyse en q-RT-PCR permettrait d'analyser avec une plus grande sensibilité l'existence de différences d'expression (mêmes faibles) de ces gènes *Tri*. Le fait que, contrairement à H_2O_2 , le diamide ait le même effet quel que soit le chémotype, peut s'expliquer par sa capacité à oxyder les fonctions thiols et sa perception chez le champignon qui passe par le système glutathion (Pocsi et al., 2005). Le diamide entraîne en effet une oxydation du glutathion

résultant en un déséquilibre GSH/GSSG alors que H_2O_2 induit une augmentation intracellulaire de ROS tels que l'anion superoxide ou le radical hydroxyle (Toledano et al., 2003). Ces deux mécanismes d'action différents pourraient induire des réseaux de régulation différents, comme déjà suggéré (Pocsi et al., 2005). Pour valider cet effet du diamide, il serait intéressant d'analyser les effets de cet oxydant sur un plus grand nombre de souches de chémotype DON/ADON et NIV/FX et d'analyser l'expression des gènes *Tri* en q-RT-PCR. De même, il serait intéressant de tester un autre oxydant potentiel des fonctions thiols, tel que la ménadione (Pocsi et al., 2005), et d'étudier si, comme pour le diamide, l'effet est le même quel que soit le chémotype.

Le contrôle exercé par des molécules antioxydantes comme les composés phénoliques a ensuite été analysé sur notre souche de référence de chémotype DON/ADON et sur la souche de chémotype NIV/FX. L'acide férulique, déjà testé sur d'autres souches au laboratoire (Boutigny et al., 2008) et l'acide caféique ont été choisis. L'acide caféique présente un potentiel antimycotoxinogène important puisqu'il entraîne une diminution significative de la production de trichothécènes quel que soit le chémotype considéré, associée à une diminution d'expression des gènes *Tri*. L'acide férulique présente quant à lui un effet moins marqué. Ces résultats sont en désaccord avec ceux observés par Boutigny et al., en 2008, chez des souches de *F. culmorum*, où l'acide caféique et l'acide férulique inhibaient tous les deux la biosynthèse de TCTB. Ces résultats suggèrent un effet souche dépendant des composés testés. Ces deux composés phénoliques ont été testés récemment au laboratoire sur un plus grand nombre de souches de chémotype DON/ADON ou NIV/FX appartenant aux deux espèces *F. graminearum* et *F. culmorum*. L'acide caféique et l'acide férulique étaient globalement inhibiteurs de la toxinogénèse même si un effet souche dépendant était parfois observable.

Le dosage de l'acide caféique et de l'acide férulique dans nos milieux de culture a montré une disparition totale de ces composés dès 4 jours de culture. Ceci suggère que les acides phénoliques testés pénètrent dans les cellules fongiques et sont potentiellement métabolisés ou complexés par le champignon, ou qu'ils sont dégradés dans le milieu de culture. Dans cette étude, il aurait été intéressant de pouvoir identifier de manière plus précoce les métabolites retrouvés dans les milieux de culture, mais également dans le mycélium. L'existence d'une voie de métabolisation des acides phénoliques en présence de *F. graminearum* est renforcée par l'étude de Bily et al., en 2003, qui a démontré que l'acide férulique pouvait pénétrer la paroi et la membrane plasmique de *F. graminearum*, et par l'étude de Atanasova-Pénichon, communication personnelle, qui a mis en évidence une voie de métabolisation de l'acide caféique en acide protocatéchique et en acide hydroxycatéchol par *F. verticillioides*. De plus, des études réalisées chez *Fusarium flocciferum* et chez d'autres champignons filamenteux tels qu'*Aspergillus spp.*, *Cochliobolus heterostrophus* ou *Penicillium spp.* ont mis en avant la capacité de dégradation des composés phénoliques par ces champignons (Santos et Linardi, 2004). En particulier, une catéchol-dioxygénase mise en évidence chez *Fusarium spp.*, et aussi chez *C. heterostrophus* semble jouer un rôle important dans l'oxydation de ces composés (Santos et Linardi, 2004, Shanmugam et al., 2010). Dans notre étude, le gène codant pour cette CD1 est fortement surexprimé en présence d'acide caféique, et un peu moins en présence d'acide férulique, quel que soit le chémotype testé. Une aptitude différente des souches à métaboliser les acides phénoliques pourrait expliquer la sensibilité différente d'une souche à plusieurs composés phénoliques mais également la différence de réponse entre plusieurs espèces du même genre pour un composé phénolique donné. Une perspective intéressante serait d'étudier en détails la bio-dégradation et la complexation des composés phénoliques ajoutés dans le milieu de culture.

Il semble donc que l'effet des acides phénoliques ne soit pas uniquement lié à leur potentiel antioxydant, comme plusieurs études l'avaient déjà suggéré (Boutigny et al., 2008, Ponts et al., 2011), mais que leur effet varie en fonction des souches testées, grâce notamment à une possible transformation/métabolisation souche dépendante. Le mécanisme d'action des acides phénoliques reste cependant peu documenté.

Nous pouvons tout de même noter que la seule souche de *F. graminearum* de chémotype NIV/FX que nous avons à notre disposition était la souche référencée INRA 91. Cette souche produit peu de trichothécènes *in vitro* et il aurait été intéressant d'introduire dans notre étude une souche possédant un pouvoir toxigène plus important. Nous pourrions disposer à l'avenir de plusieurs souches de *F. graminearum* de chémotype NIV/FX (souches isolées en Angleterre) et vérifier si leur comportement est identique à celui de notre souche de référence INRA 91.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui relient la réponse aux stress oxydant et la production de trichothécènes de type B et de progresser dans la connaissance des mécanismes d'action des acides phénoliques *via* leurs potentiels redox, nous avons réalisé des mutants du gène *Fgap1* chez *F. graminearum*.

II- Implication de *Fgap1* dans la réponse aux variations redox

Nous avons dans un premier temps analysé l'implication de *Fgap1* chez notre souche de référence INRA 605 de chémotype DON/ADON. Pour cela, nous avons utilisé deux mutants : Un mutant « perte de fonction » délété pour *Fgap1* et un mutant *Fgap1^c_{trunc}*, exprimant une forme tronquée constitutivement active de la protéine. Ces mutants ont dans un premier temps été cultivés sur milieu solide en les soumettant à différents stress. Le mutant $\Delta Fgap1$ est notamment plus sensible aux stress osmotiques induit par le sorbitol ou le NaCl, tandis que le mutant *Fgap1^c_{trunc}* semble plus résistant à ces deux types de stress. Ce phénomène pourrait venir du fait que comme chez la levure, *apl* appartient au même signal de transduction que la voie des MAP kinases, impliquées dans la réponse à différents stress (Toone et al., 1998). Ceci suggère un réseau de régulation où plusieurs voies de réponse seraient interconnectées. Cette hypothèse pourra être validée grâce à notre analyse RNA-seq, quand celle-ci aura été complétée.

L'effet de ces mutations sur la production de trichothécènes a ensuite été analysé. De façon surprenante, le mutant délété pour *Fgap1* a produit plus de trichothécènes que la souche sauvage, et le stress oxydant n'a pas induit plus d'accumulation de la production de TCTB chez ce mutant. Par ailleurs, les mutants *Fgap1^c_{trunc}* produisent très peu de toxines, que ce soit en présence ou non d'un stress oxydant. Ces résultats corroborent avec le niveau d'expression des gènes *Tri* observé, confirmant qu'il y a bien une régulation au niveau transcriptionnel. Nous pouvons noter que les mutants *Fgap1^c_{trunc}* ont été réalisés chez la souche sauvage. Il aurait été intéressant de réaliser ces mutants chez la souche $\Delta Fgap1$ pour éliminer totalement la copie sauvage de *Fgap1* et ne garder que la fonction de la forme tronquée. Cependant, il

faut remarquer que la forme tronquée a un effet dominant ; on pourrait en conséquence s'attendre à un effet identique en l'absence du gène sauvage.

Il faut admettre que nous nous attendions à obtenir l'effet inverse chez ces mutants en présence d'H₂O₂, c'est-à-dire une diminution de la production de trichothécènes chez le mutant $\Delta Fgap1$, liée à une absence d'activation des gènes *Tri* par Fgap1 et une augmentation de la production de trichothécènes chez le mutant $Fgap1^{c_{trunc}}$, liée à une surexpression des gènes *Tri*. Cette hypothèse de travail était renforcée par les travaux de Merhej et al., en 2010 qui ont permis d'identifier la séquence canonique « TGAATA » de fixation du facteur Yap1 de levure dans les séquences promotrices des gènes *Tri5* et *Tri10* de *F. graminearum* (Merhej et al., 2010, Rodrigues-Pousada et al., 2004). Ceci suggérait que Fgap1 puisse activer l'expression de ces deux gènes du cluster. En fait, les résultats que nous avons obtenus suggèrent plutôt un rôle de régulateur négatif de Fgap1 sur l'expression des gènes *Tri*, au moins pour la forme tronquée. Ces résultats sont renforcés par nos analyses préliminaires de RNA-seq qui montrent que chez deux mutants $Fgap1^{c_{trunc}}$, une forte diminution de la production de TCTB est associée dans les deux cas à une forte diminution du niveau d'expression des gènes *Tri*. Pour expliquer ce rôle de régulateur négatif pour la forme tronquée, une hypothèse serait que Fgap1 agit en réponse au stress oxydant avec un partenaire non identifié X, qui lui serait activé par le stress oxydant. En conditions normales, Fgap1 non complexé à ce partenaire agirait comme répresseur pour limiter l'expression des gènes *Tri*. Suite à un stress oxydant, Fgap1 interagirait avec le partenaire X localisé au noyau pour cette fois activer l'expression des gènes *Tri*. Chez le mutant délété, Fgap1 ne pourrait plus réprimer l'expression des gènes *Tri*, conduisant à une forte expression de ces gènes avec ou sans stress. Enfin, la forme tronquée, potentiellement constitutivement localisée au noyau, ne pourrait pas interagir avec le partenaire X du fait de l'absence du NES, et donc réprimerait fortement les gènes *Tri* quel que soit le traitement appliqué. Une analyse par ChIP-seq permettrait de

réellement identifier les séquences promotrices sur lesquelles se fixe Fgap1 et de montrer si le facteur se fixe ou non sur les séquences « TGACTAA » des gènes *Tri*. Pour cela, il faudrait taguer le facteur Fgap1 ou générer des anticorps dirigés contre la protéine pour réaliser une immunoprécipitation. Cependant, une autre interprétation pour expliquer nos résultats pourrait être que Fgap1 exerce un effet indirect sur l'expression des gènes *Tri*. En effet, une autre hypothèse serait que *Fgap1* active un autre facteur répresseur de l'expression des gènes *Tri*, uniquement sous sa forme tronquée.

Nous avons également comparé la production de TCTB de nos deux mutants délétés pour *Fgap1* chez notre souche de référence DON/ADON et chez la souche NIV/FX. Nous avons obtenu des résultats identiques pour les deux souches. En présence de diamide, on observe chez les deux souches sauvages une stimulation significative de la production de trichothécènes et cette stimulation est perdue chez les mutants délétés pour *Fgap1*. Cette observation confirme bien que *Fgap1* est impliqué dans la modulation de la production de trichothécènes en réponse au stress oxydant quel que soit le chémotype et que la réponse au stress oxydant induit par le diamide passe également par Fgap1. Ces résultats sont en accord avec Delaunay et al., qui ont montré en 2000 chez *S. cerevisiae* que même si l'effet du diamide et de H₂O₂ sont différents pour activer Yap1, ce facteur reste un élément central de la réponse au stress oxydant. H₂O₂ active Yap1 par la formation d'un pont disulfide entre les cystéines 303 et 598 de la protéine alors que le diamide modifie une ou plusieurs cystéines de la partie C-Terminale de la protéine.

Nous avons par la suite analysé le niveau d'expression de certains gènes à activité détoxifiante, codant pour des catalases et des SOD, sachant que en général chez les champignons filamenteux, l'expression de ces gènes peut être régulée par ap1 (Montibus et

al., 2013). Chez notre souche de référence de chémotype DON/ADON, trois gènes sont particulièrement surexprimés en présence d'H₂O₂ : les gènes codant pour la catalase1, la catalase3 et la MnSOD1. Le gène codant pour la MnSOD1 est fortement surexprimé. Une perspective intéressante de travail serait de tester le niveau d'expression de ces gènes en q-PCR en réponse à d'autres molécules pro-oxydantes telles que le diamide ou la ménadione. L'analyse de ces gènes a également été réalisée pour la souche de chémotype DON/ADON et pour la souche de chémotype de NIV/FX. Seule l'expression des gènes codant pour les catalases semble varier en réponse au stress oxydant. Cependant, ces analyses ont été réalisées en RT-PCR semi-différentielle et pour pouvoir observer avec plus de certitude des variations d'expression même faibles, il serait intéressant d'analyser les niveaux d'expression en q-RT-PCR.

Nous avons ensuite analysé l'implication de *Fgap1* dans l'expression de gènes de réponse au stress oxydant, codant pour des catalases ou pour des SOD. Chez le mutant $\Delta Fgap1$, les gènes codant pour les catalases et pour les Cu/ZnSOD sont fortement sous-exprimés, ce qui indique bien que *Fgap1* intervient dans la modulation de l'expression des gènes à activité détoxifiante. Chez le mutant constitutif *Fgap1^{c trunc}*, un seul gène est surexprimé, le gène codant pour la MnSOD1. Nous pensons que chez ce mutant, où *Fgap1* est théoriquement constitutivement actif et ciblé au noyau, les gènes de réponse au stress oxydant seraient surexprimés. Le fait que seul le gène codant pour la MnSOD1 soit surexprimé chez ce mutant peut venir du fait que, comme précédemment démontré chez *S. cerevisiae*, deux facteurs de transcription Yap1 et Skn7 coopèrent pour activer certains gènes de réponse au stress oxydant, *via* le signal d'export nucléaire de Yap1 (Lee et al., 1999, Mulford et Fassler., 2011). Etant donné que notre mutant est tronqué au niveau du signal d'export nucléaire, il se peut qu'il ne puisse plus coopérer et donc activer l'expression de certains gènes à activité détoxifiante.

Une perspective intéressante serait d'identifier les partenaires de *Fgap1* potentiellement impliqués dans l'activation de ces gènes de réponse au stress. Encore une fois, taguer par exemple notre protéine d'intérêt ou générer des anticorps permettrait de purifier la protéine et ses partenaires potentiels.

Le niveau d'expression des gènes de réponse au stress oxydant a ensuite été analysé en présence d'acide caféique et d'acide férulique pour la souche de chémotype DON/ADON mais aussi pour la souche de chémotype NIV/FX. Dans les deux cas, le gène codant pour la MnSOD2 était sous exprimé quel que soit le chémotype et les gènes codant pour des catalases étaient surexprimés. Une de nos hypothèses est que, comme déjà démontré chez *Aspergillus* (Kim et al., 2006), les composés phénoliques inhiberaient la fonction mitochondriale, entraînant potentiellement un stress oxydant causé par un relargage d'électrons de la chaîne respiratoire.

Nous avons ensuite analysé l'implication de *Fgap1* dans la réponse à l'exposition à l'acide caféique et à l'acide férulique. Nos résultats semblent montrer que *Fgap1* n'intervient pas dans cette réponse, et ne module pas l'expression des gènes *Tri* associée à la production de trichothécènes, aux concentrations que nous avons testées. De même, lors de la réponse aux acides phénoliques testés, *Fgap1* ne semble pas être impliqué dans l'expression de gènes de réponse aux variations redox, tels que les catalases ou les catéchol-dioxygénases. Ces résultats sont en accord, aux concentrations testées, avec ceux observés chez *C. heterostrophus* où *ChAPI*, l'orthologue de *Fgap1*, n'était pas nécessaire à l'expression d'une catéchol-dioxygénase en présence d'acide caféique (Shanmugam et al., 2010). Cependant, à des concentrations plus élevées, *ChAPI* était nécessaire à l'expression de cette catéchol-dioxygénase et était même transloqué au noyau en présence d'acide caféique ou d'acide férulique (Shanmugam et al., 2010). Ce résultat est cependant à prendre en compte avec

parcimonie étant donné qu'aucun marquage au DAPI, pour colorer les noyaux, n'a été réalisé en parallèle de ces manipulations.

Ainsi, nos résultats démontrent que l'effet des composés phénoliques testés ne passe pas par le facteur *Fgap1* et ne semble donc pas être lié à leur potentiel antioxydant.

Enfin, nos résultats semblent démontrer que *Fgap1* n'est pas impliqué dans la virulence de *F. graminearum*. Il serait intéressant de reproduire ce résultat pour le confirmer avec notre souche NIV/FX délétée pour *Fgap1*. Ce résultat est en accord avec d'autres résultats obtenus chez *B. cinerea* ou encore chez *C. heterostrophus* (Lev et al., 2005, Temme et Tudzynski, 2009) mais en désaccord avec ce qui a été observé chez *M. oryzae* (Guo et al., 2011). Il se pourrait que la fonction d'*ap1* comme facteur de pathogénicité soit limité aux pathogènes biotrophes.

D'une manière plus globale, une analyse RNA-seq a été entreprise pour caractériser la réponse au stress oxydant et l'implication du facteur *Fgap1* dans cette réponse à l'échelle du transcriptome de *F. graminearum*. Les premiers résultats obtenus semblent montrer que la délétion de *Fgap1* induit l'expression différentielle d'environ 6000 gènes sur les 15600 de départ. Ce résultat suggère qu'il existe une complexité des réseaux de régulation impliqués. Sur ces 6000 gènes, environ 3000 sont sous-exprimés, validant le rôle de *Fgap1* comme facteur de transcription impliqué dans l'activation des gènes de réponse aux variations redox. De plus, 3000 gènes sont également surexprimés, suggérant que la délétion de *Fgap1* peut entraîner une réorganisation des réseaux de régulation ou que *Fgap1* peut jouer un rôle de répresseur.

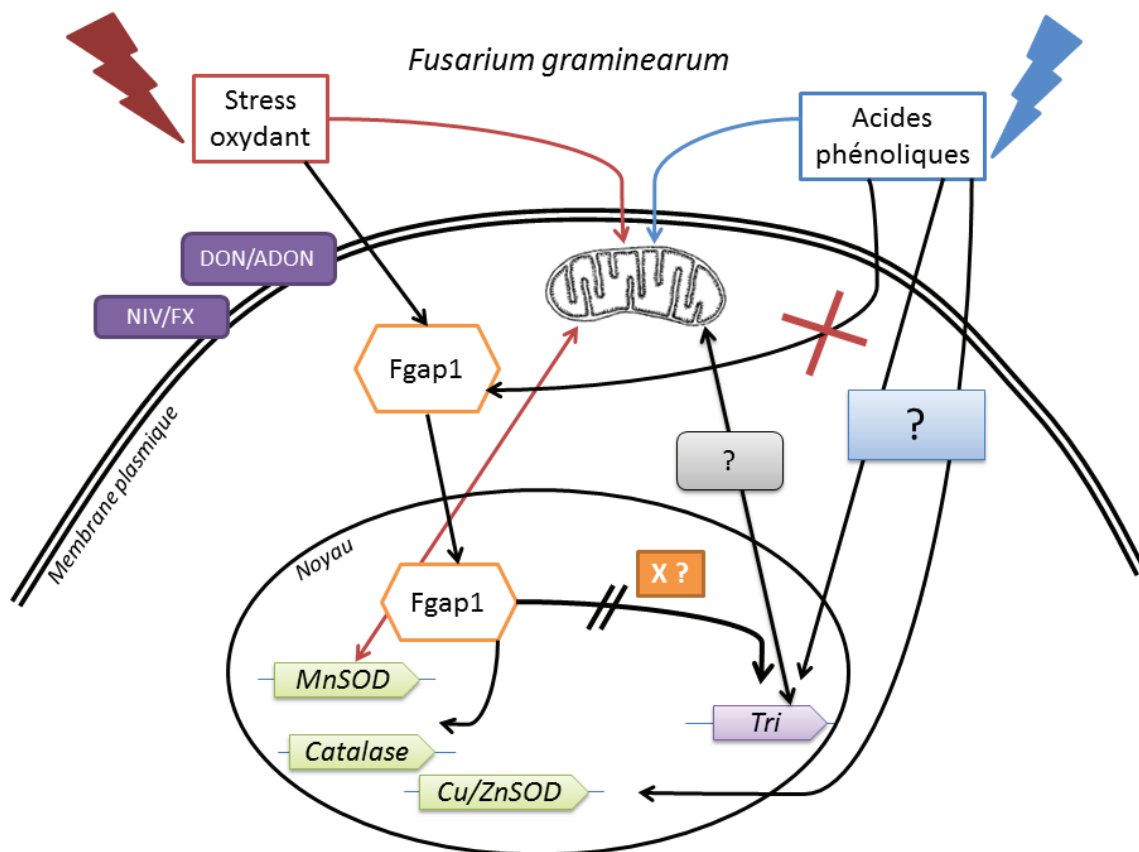


Figure 1 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de cette thèse. Le facteur de transcription Fgap1 est impliqué dans la réponse au stress oxydant pour les souches de chémotype DON/ADON et NIV/FX. Le facteur active l'expression des gènes de réponse au stress oxydant. Il est également impliqué dans la modulation de l'expression des gènes *Tri*, potentiellement par le biais d'un partenaire X. Fgap1 n'intervient pas dans la réponse à une exposition aux acides phénoliques : la modulation de l'expression des gènes *Tri* et des gènes de réponse aux variations redox passe par un mécanisme encore inconnu. La mitochondrie, élément important de réponse aux variations redox, pourrait être impliquée dans la modulation de l'expression des gènes *Tri*.

III- Conclusion et perspectives

Nous avons donc démontré que chez *F. graminearum*, *Fgap1* intervenait dans la modulation de la production de trichothécènes *via* une régulation de l'expression des gènes *Tri* en réponse au stress oxydant, quel que soit le chémotype considéré. Nous avons également montré que *Fgap1* était nécessaire pour l'activation de l'expression de certains gènes de réponse au stress oxydant. Les résultats majeurs de ce manuscrit sont schématisés dans la Figure 1. Pour totalement valider le rôle de *Fgap1* chez *F. graminearum*, plusieurs points devront être repris et complétés : i) Tout d'abord, il faudrait suivre un plus grand nombre de gènes dont l'expression est activée par *Fgap1* en réponse au stress oxydant pour avoir une vue plus globale du rôle de *Fgap1* chez *F. graminearum*. Ce point pourra être réalisé grâce à l'analyse RNA-seq que nous avons initiée. ii) Une démonstration formelle de la relocalisation de *Fgap1* au noyau suite à un stress oxydant est également nécessaire. De même, la démonstration de la localisation constitutive de notre mutant *Fgap1^ctrunc* au noyau est indispensable pour pouvoir totalement le valider. iii) Une identification de l'implication de chaque cystéine située dans le CRD de la protéine serait intéressante. Pour cela, il pourrait être envisagé de réaliser une mutagenèse dirigée contre chaque cystéine identifiée dans l'alignement protéique que nous avons réalisé dans le Chapitre 1 de ce manuscrit comme précédemment réalisé chez la levure (Kuge et al., 2001). Nous pourrions ainsi identifier quelles sont les cystéines primordiales pour assurer la fonction de *Fgap1*, et expliciter la différence d'action entre diamide et H₂O₂ observée chez la levure (Delaunay et al., 2000).

Enfin l'analyse RNA-seq entreprise nous permettra de pouvoir analyser plus globalement l'implication de *Fgap1* dans la réponse au stress oxydant, dans l'espoir d'identifier l'ensemble des réseaux de régulation mis en jeu.

Les résultats que nous avons obtenus donnent une perspective de travail intéressante concernant le rôle de la mitochondrie dans la régulation du stress oxydant en lien avec le métabolisme secondaire. Visiblement, d'après les résultats de niveaux d'expression des gènes de réponse au stress oxydant obtenus, la mitochondrie ou le peroxysome pourraient être fortement impliqués dans la réponse aux variations redox, puisque les gènes codant pour des MnSOD subissent des variations d'expression importantes face aux composés que nous avons testés dans ce manuscrit. Ces résultats pourront être validés suite à notre analyse RNA-seq.

Une perspective intéressante suite à ces travaux de thèse serait alors d'utiliser des inhibiteurs de la fonction mitochondriale telle que par exemple la strobilurine, pour voir si un lien existe entre la fonction mitochondriale et le métabolisme secondaire (Kim et al., 2006). La strobilurine cible spécifiquement le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale, et inhibe ainsi le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Cette inhibition résulte éventuellement en un stress oxydant causé par un relargage anormal d'électrons de la chaîne respiratoire, et nous permettrait de faire un lien entre la fonction mitochondriale, le stress oxydant et potentiellement la production de TCTB.

Une modification du réseau des organelles impliqués dans la gestion des espèces oxydantes pourrait également être envisagée. La construction de mutants surexprimant la protéine Pex11, comme déjà réalisée chez *Penicillium chrysogenum* (Kiel et al., 2005) pourrait être réalisée. Ces mutants chez *P. chrysogenum* développent notamment un réseau mitochondrial plus important que la souche sauvage et dans un même temps, produisent plus de pénicilline. Egalement, la réalisation de mutants transformés avec le gène p33 du virus Cymbidium ringspot, comme déjà réalisé chez *A. flavus*, pourrait être envisagé (Reverberi et al., 2012). Ces mutants, comparés à une souche

sauvage présentent un plus grand réseau de peroxyosomes et de mitochondries, associé à une surexpression du gène *pex11*. Ces mutants produisent également des niveaux d'aflatoxine plus importants que la souche sauvage. Le lien entre développement mitochondrial, et production de trichothécènes chez *F. graminearum* pourrait ainsi être étudié grâce à ces différentes méthodes.

Les travaux de thèse présentés ici et résumés dans la Figure 1 vont permettre de développer une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à une forte induction de la biosynthèse des trichothécènes. Ces travaux ouvrent alors des perspectives sur la compréhension des mécanismes d'accumulation des toxines dans les grains, étape essentielle pour l'optimisation de stratégies de contrôle du risque mycotoxique chez les céréales. Ces travaux permettront à long terme d'identifier des gènes cibles fongiques et d'utiliser des biomolécules aux propriétés antifongiques permettant de lutter contre le risque « mycotoxines ».

Références bibliographiques

- ABEGG, M. A., ALABARSE, P. V. G., CASANOVA, A., HOSCHEID, J., SALOMON, T. B., HACKENHAAR, F. S., MEDEIROS, T. M. & BENFATO, M. S. 2010. Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia*, 170, 11-20.
- AEBI, H. 1947. *Methods in Enzymology*. Ed. Bergmeyer ed. New York: Academic Press.
- AFSSA 2009. *Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale*. .
- ALARCO, A.-M., BALAN, I., TALIBI, D., MAINVILLE, N. & RAYMOND, M. 1997. AP1-mediated Multidrug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* Requires FLR1 Encoding a Transporter of the Major Facilitator Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19304-19313.
- ALARCO, A. M. & RAYMOND, M. 1999. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *Journal of bacteriology*, 181, 700-8.
- ALASSANE-KPEMBI, I., KOLF-CLAUW, M., GAUTHIER, T., ABRAMI, R., ABIOLA, F. A., OSWALD, I. P. & PUEL, O. 2013. New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272, 191-198.
- ALEXANDER, N. J., MCCORMICK, S. P., LARSON, T. M. & JURGENSON, J. E. 2004. Expression of Tri15 in *Fusarium sporotrichioides*. *Current Genetics*, 45, 157-162.
- ALEXANDER, N. J., MCCORMICK, S. P., WAALWIJK, C., VAN DER LEE, T. & PROCTOR, R. H. 2011. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 485-495.
- ALEXANDER, N. J., PROCTOR, R. H. & MCCORMICK, S. P. 2009. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28, 198-215.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- ANDERSON, D. W., BLACK, R. M., LEE, C. G., POTTAGE, C., RICKARD, R. L., SANDFORD, M. S., WEBBER, T. D. & WILLIAMS, N. E. 1989. Structure-activity studies of trichothecenes: cytotoxicity of analogues and reaction products derived from T-2 toxin and neosolaniol. *J Med Chem*, 32, 555-62.
- 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.
- ATANASOVA-PENICHON, V., PONS, S., PINSON-GADAIS, L., PICOT, A., MARCHEGAY, G., BONNIN-VERDAL, M.-N., DUCOS, C., BARREAU, C., ROUCOLLE, J., SEHABIAGUE, P., CAROLO, P. & RICHARD-FORGET, F. 2012. Chlorogenic Acid and Maize Ear Rot Resistance: A Dynamic Study Investigating *Fusarium graminearum* Development, Deoxynivalenol Production, and Phenolic Acid Accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 1605-1616.
- BAKAN, B., BILY, A. C., MELCION, D., CAHAGNIER, B., REGNAULT-ROGER, C., PHILOGÈNE, 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.
- BALZER, A., TARDIEU, D. & BAILLY, J. D. 2004. Les trichothécènes: nature des toxines, présence dans les aliments et moyens de lutte. *revue Med.Vet*, 155, 299 - 314.

- 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.
- BECKMAN, K. B. & AMES, B. N. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78, 547-81.
- BENNETT, J. W. & KLICH, M. 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16, 497-516.
- BERMINGHAM-MCDONOGH, O., GRALLA, E. B. & SELVERSTONE VALENTINE, J. 1988. *The copper, zinc-superoxide dismutase gene of Saccharomyces cerevisiae: cloning, sequencing, and biological activity*, Washington, DC, ETATS-UNIS, National Academy of Sciences.
- BERTHILLER, F., LEMMENS, M., WERNER, U., KRSKA, R., HAUSER, M. T., ADAM, G. & SCHUHMACHER, R. 2007. Short review: Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone in plants. *Mycotoxin Res*, 23, 68-72.
- BETINA, V. 1989. Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. *Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects*. Amsterdam Netherlands: Elsevier.
- 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.
- BLEE, E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci*, 7, 315-22.
- BLEE, K. A., YANG, K. Y. & ANDERSON, A. J. 2004. Activation of defense pathways: synergism between reactive oxygen species and salicylic acid and consideration of field applicability. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 203-212.
- BODDU, J., CHO, S., KRUGER, W. M. & MUEHLBAUER, G. J. 2006. Transcriptome analysis of the barley-*Fusarium graminearum* interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 407-17.
- BOENISCH, M. & SCHAFER, W. 2011. *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology*, 11, 110.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. & DIEFENBACH, A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*, 12, 64-76.
- 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.
- BOURDAIS, A., BIDARD, F., ZICKLER, D., BERTEAUX-LECELLIER, V., SILAR, P. & ESPAGNE, E. 2012. Wood utilization is dependent on catalase activities in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Plos One*, 7.
- BOUTIGNY, A. L., ATANASOVA-PENICHON, V., BENET, M., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2010. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *Eur J Plant Pathol*, 127, 275-286.
- BOUTIGNY, A. L., BARREAU, C., ATANASOVA-PENICHON, V., VERDAL-BONNIN, M. N., PINSON-GADAIS, L. & RICHARD-FORGET, F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res*, 113, 746-53.
- BOUTIGNY, A., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2008. Natural mechanisms for plant resistance to *Fusarium* mycotoxins accumulation. *Journal of European Plant Pathology*, 121, 411-423.

- BOUTIGNY, A. L. 2007. Identification dans les grains de blé dur de composés inhibiteurs de la biosynthèse des trichothécènes B par *Fusarium*. *thèse Université Bordeaux I*.
- BRAKHAGE, A. A., BRUNS, S., THYWISSEN, A., ZIPFEL, P. F. & BEHNSEN, J. 2010. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 409-415.
- BREWSTER, J. L., DE VALOIR, T., DWYER, N. D., WINTER, E. & GUSTIN, M. C. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259, 1760-3.
- BROWN, N. A., URBAN, M., VAN DE MEENE, A. M. & HAMMOND-KOSACK, K. E. 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biol*, 114, 555-71.
- BUERSTMAYR, H., B., S., HARTL, L., GRIESSER, M., ANGERER, N. & LENGAUER, D. 2003. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Springer-Verlag*, 107, 503-8.
- BURNS, C., GERAGHTY, R., NEVILLE, C., MURPHY, A., KAVANAGH, K. & DOYLE, S. 2005. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 319-327.
- CAO, C. W., LIU, W. & LI, R. Y. 2009. *Penicillium marneffei* SKN7, a Novel Gene, could Complement the Hypersensitivity of *S. cerevisiae* skn7 Disruptant Strain to Oxidative Stress. *Mycopathologia*, 168, 23-30.
- CARROLL, A. M., SWEIGARD, A. J. & VALENT, B. 1994. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genet. Newsl.*, 41, 22.
- CASTELLUCCIO, C., PAGANGA, G., MELIKIAN, N., PAUL BOLWELL, G., PRIDHAM, J., SAMPSON, J. & RICE-EVANS, C. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters*, 368, 188-192.
- CHAMBERGO, F. S., VALENCIA, E. Y., FERREIRA-JUNIOR, J. R., CAMILO, C. M. & CAMPANA, P. T. 2012. Conformational stability of recombinant manganese superoxide dismutase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Int J Biol Macromol*, 50, 19-24.
- 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.
- CHANG, P.-K., SCHARFENSTEIN, L. L., LUO, M., MAHONEY, N., MOLYNEUX, R. J., YU, J., BROWN, R. L. & CAMPBELL, B. C. 2011. Loss of *msnA*, a Putative Stress Regulatory Gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* Increased Production of Conidia, Aflatoxins and Kojic Acid. *Toxins*, 3, 82-104.
- CHARY, P., DILLON, D., SCHROEDER, A. L. & NATVIG, D. O. 1994. Superoxide dismutase (*sod-1*) null mutants of *Neurospora crassa*: oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to mutagens. *Genetics*, 137, 723-30.
- CHARY, P. & NATVIG, D. O. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *Journal of bacteriology*, 171, 2646-52.
- CHAUHAN, N., LATGE, J.-P. & CALDERONE, R. 2006. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Micro*, 4, 435-444.
- CHEN, F., ZHANG, J., SONG, X., YANG, J., LI, H., TANG, H. & LIAO, Y.-C. 2011. Combined Metabonomic and Quantitative Real-Time PCR Analyses Reveal Systems Metabolic Changes of *Fusarium graminearum* Induced by *Tri5* Gene Deletion. *Journal of Proteome Research*, 10, 2273-2285.

- CHOI, J. H., LOU, W. & VANCURA, A. 1998. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273, 29915-22.
- CHRIST, D. S., GODECKE, R., VON TIEDEMANN, A. & VARRELMANN, M. 2011. Pathogenicity, symptom development, and mycotoxin formation in wheat by *Fusarium* species frequently isolated from sugar beet. *Phytopathology*, 101, 1338-45.
- CHUNG, K.-R. 2012. Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. *Scientifica*, 2012, 17.
- COENJAERTS, F. E. J., HOEPELMAN, A. I. M., SCHARRINGA, J., AARTS, M., ELLERBROEK, P. M., BEVAART, L., VAN STRIJP, J. A. G. & JANBON, G. 2006. The Skn7 response regulator of *Cryptococcus neoformans* is involved in oxidative stress signalling and augments intracellular survival in endothelium. *Fems Yeast Research*, 6, 652-661.
- COLLINSON, L. P. & DAWES, I. W. 1995. Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene*, 156, 123-7.
- COLLOPY, P. D., COLOT, H. V., PARK, G., RINGELBERG, C., CREW, C. M., BORKOVICH, K. A. & DUNLAP, J. C. 2010. High-throughput construction of gene deletion cassettes for generation of *Neurospora crassa* knockout strains. *Methods in molecular biology*, 638, 33-40.
- COLMENARES, A. J., ALEU, J., DURAN-PATRON, R., COLLADO, I. G. & HERNANDEZ-GALAN, R. 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *J Chem Ecol*, 28, 997-1005.
- CROMEY, M. G., PARKES, R. A. & FRASER, P. M. 2001. *Fusarium* levels in grain harvested from New Zealand wheat and barley crops in 2000. *New Zealand Plant Protection Volume 54, 2001. Proceedings of a conference, Quality Hotel, Palmerston North, New Zealand, 14-16 August 2001*.
- 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., KENNEL, J. C., KROKEN, S., MAGNUSON, J. K., MANNHAUPT, G., MAUCIEL, 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, 1400-2.
- DAVIES, J. M., LOWRY, C. V. & DAVIES, K. J. 1995. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Archives of biochemistry and biophysics*, 317, 1-6.
- DAVIES, P. J. 2004. Plant Hormones. *Book*.
- DELAUNAY, A., PFLIEGER, D., BARRAULT, M.-B., VINH, J. & TOLEDANO, M. B. 2002. A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation. *Cell*, 111, 471-481.
- DELAUNAY, A., ISNARD, A.D., & TOLEDANO, M.B. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO journal*, 19, 5157-5166.

- DESAI, P. R., THAKUR, A., GANGULI, D., PAUL, S., MORSCHHÄUSER, J. & BACHHAWAT, A. K. 2011. Glutathione Utilization by *Candida albicans* Requires a Functional Glutathione Degradation (DUG) Pathway and OPT7, an Unusual Member of the Oligopeptide Transporter Family. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 41183-41194.
- 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. & HOHN, T. M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 147-152.
- DIAZ, A., RANGEL, P., MONTES DE OCA, Y., LLEDIAS, F. & HANSBERG, W. 2001. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free radical biology & medicine*, 31, 1323-33.
- 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.
- DOLASHKI, A., ABRASHEV, R., STEVANOVIC, S., STEFANOVA, L., ALI, S. A., VELKOVA, L., HRISTOVA, R., ANGELOVA, M., VOELTER, W., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J. & DOLASHKA-ANGELOVA, P. 2008. Biochemical properties of Cu/Zn-superoxide dismutase from fungal strain *Aspergillus niger* 26. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 71, 975-83.
- DYER, R. B., PLATTNER, R. D., KENDRA, D. F. & BROWN, D. W. 2005. *Fusarium graminearum* TRI14 Is Required for High Virulence and DON Production on Wheat but Not for DON Synthesis in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9281-9287.
- ERIKSEN, G. S. 2003. Metabolism and toxicity of trichothecenes. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae - Agraria*. Alnarp Sweden: Sveriges Lantbruksuniversitet (Swedish University of Agricultural Sciences).
- 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.
- ESHAGHI, M., LEE, J. H., ZHU, L., POON, S. Y., LI, J. T., CHO, K. H., CHU, Z. Q., KARUTURI, R. K. M. & LIU, J. 2010. Genomic Binding Profiling of the Fission Yeast Stress-Activated MAPK Sty1 and the bZIP Transcriptional Activator Atf1 in Response to H₂O₂. *Plos One*, 5.
- ESTRUCH, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS microbiology reviews*, 24, 469-86.
- EUDES, F., COMEAU, A., RIOUX, S. & COLLIN, J. 2000. Phytotoxicity of eight mycotoxins associated with *Fusarium* in wheat head blight. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 286-292.
- FANG, G. C., HANAU, R. M. & VAILLANCOURT, L. J. 2002. The SOD2 gene, encoding a manganese-type superoxide dismutase, is up-regulated during conidiogenesis in the plant-pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 36, 155-65.
- FASSLER, J. S. & WEST, A. H. 2011. Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryotic Cell*, 10, 156-67.
- FERRARI, C. K. B., SOUTO, P. C. S., FRANÇA, E. L. & HONORIO-FRANÇA, A. C. 2011. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: From effective defense to immunity evasion mechanisms. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 59, 441-448.

- FLORENT, M., NOËL, T., RUPRICH-ROBERT, G., DA SILVA, B., FITTON-OUHABI, V., CHASTIN, C., PAPON, N. & CHAPELAND-LECLERC, F. 2009. Nonsense and Missense Mutations in FCY2 and FCY1 Genes Are Responsible for Flucytosine Resistance and Flucytosine-Fluconazole Cross-Resistance in Clinical Isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2982-2990.
- FRASER, J. A., DAVIS, M. A. & HYNES, M. J. 2002. A gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. *Applied and environmental microbiology*, 68, 2802-8.
- GARDINER, D. M., KAZAN, K. & MANNERS, J. M. 2009a. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol*, 46, 604-613.
- GARDINER, D. M., KAZAN, K. & MANNERS, J. M. 2009. Novel Genes of *Fusarium graminearum* That Negatively Regulate Deoxynivalenol Production and Virulence. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 1588-600.
- GARDINER, D. M., KAZAN, K., PRAUD, S., TORNEY, F. J., RUSU, A. & MANNERS, J. M. 2010. Early activation of wheat polyamine biosynthesis during *Fusarium* head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. *BMC Plant Biol*, 10, 289.
- GARDINER, D. M., OSBORNE, S., KAZAN, K. & MANNERS, J. M. 2009b. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology*.
- GARRE, V., MÜLLER, U. & TUDZYNSKI, P. 1998. Cloning, Characterization, and Targeted Disruption of *cpcat1*, Coding for an in Planta Secreted Catalase of *Claviceps purpurea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 772-783.
- GILES, SS., STAJICH, JE., NICHOLS, C., GERRALD, QD., ALSPAUGH, JA., DIETRICH, F., & PERFECT, JR. 2006. The *Cryptococcus neoformans* Catalase Gene Family and Its Role in Antioxidant Defense. *Eukaryotic Cell* 5: 1447-1459.
- GOLKARI, S., GILBERT, J., PRASHAR, S. & PROCUNIER, J. D. 2007. Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnol J*, 5, 38-49.
- GORNER, W., DURCHSCHLAG, E., MARTINEZ-PASTOR, M. T., ESTRUCH, F., AMMERER, G., HAMILTON, B., RUIS, H. & SCHULLER, C. 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & development*, 12, 586-97.
- GORNER, W., DURCHSCHLAG, E., WOLF, J., BROWN, E. L., AMMERER, G., RUIS, H. & SCHULLER, C. 2002. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *The EMBO journal*, 21, 135-44.
- GOSWAMI, R. S. & KISTLER, H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
- GOVRIN, E. M. & LEVINE, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology : CB*, 10, 751-7.
- GRALLA, E. B., THIELE, D. J., SILAR, P. & VALENTINE, J. S. 1991. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 8558-62.
- GUIDOT, D. M., MCCORD, J. M., WRIGHT, R. M. & REPINE, J. E. 1993. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 268, 26699-703.

- GÜLDENER, U., SEONG, K.-Y., BODDU, J., CHO, S., TRAIL, F., XU, J.-R., ADAM, G., MEWES, H.-W., MUEHLBAUER, G. J. & KISTLER, H. C. 2006. Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genetics and Biology*, 43, 316-325.
- GULSHAN, K., ROVINSKY, S. A., COLEMAN, S. T. & MOYE-ROWLEY, W. S. 2005. Oxidant-specific Folding of Yap1p Regulates Both Transcriptional Activation and Nuclear Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 40524-40533.
- GUO, M., CHEN, Y., DU, Y., DONG, Y., GUO, W., ZHAI, S., ZHANG, H., DONG, S., ZHANG, Z., WANG, Y., WANG, P. & ZHENG, X. 2011. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens*, 7, e1001302.
- GUO, M., GUO, W., CHEN, Y., DONG, S., ZHANG, X., ZHANG, H., SONG, W., WANG, W., WANG, Q., LV, R., ZHANG, Z., WANG, Y. & ZHENG, X. 2010. The basic leucine zipper transcription factor Moatf1 mediates oxidative stress responses and is necessary for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 23, 1053-68.
- HAGIWARA, D., MIZUNO, T. & ABE, K. 2011. Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. *Current genetics*, 57, 103-14.
- HALLEN, H. E., HUEBNER, M., SHIU, S. H., GULDENER, U. & TRAIL, F. 2007. Gene expression shifts during perithecium development in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*), with particular emphasis on ion transport proteins. *Fungal Genet Biol*, 44, 1146-56.
- HALLIWELL, B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & aging*, 18, 685-716.
- HAMPTON, M. B., KETTLE, A. J. & WINTERBOURN, C. C. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92, 3007-17.
- HANSBERG, W., SALAS-LIZANA, R. & DOMINGUEZ, L. 2012. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. *Arch Biochem Biophys*, 525, 170-80.
- HARRIS, E. D. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6, 2675-83.
- HASAN, R., LEROY, C., ISNARD, A.-D., LABARRE, J., BOY-MARCOTTE, E. & TOLEDANO, M. B. 2002. The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Molecular Microbiology*, 45, 233-241.
- HASENBERG, M., BEHNSEN, J., KRAPPMANN, S., BRAKHAGE, A. & GUNZER, M. 2011. Phagocyte responses towards *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 436-444.
- HELLER, J. & TUDZYNSKI, P. 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: Signaling, development, and disease. *Annual review of phytopathology* [Online], 49.
- HISADA, H., HATA, Y., KAWATO, A., ABE, Y. & AKITA, O. 2005. Cloning and expression analysis of two catalase genes from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 562-8.
- HONG, S. Y., ROZE, L. V. & LINZ, J. E. 2013a. Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins (Basel)*, 5, 683-702.
- HONG, S. Y., ROZE, L. V., WEE, J. & LINZ, J. E. 2013b. Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *Microbiologyopen*, 2, 144-60.

- ICHINOE, M., KURATA, H., SUGIURA, Y. & UENO, Y. 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Appl Environ Microbiol*, 46, 1364-9.
- ILGEN, P., HADELER, B., MAIER, F. J. & SCHÄFER, W. 2009. Developing Kernel and Rachis Node Induce the Trichothecene Pathway of *Fusarium graminearum* During Wheat Head Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 899-908.
- 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, 351-62.
- JAMIESON, D. J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 1511-27.
- 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.
- JAVERZAT, J. P., BHATTACHERJEE, V. & BARREAU, C. 1993. Isolation of telomeric DNA from the filamentous fungus *Podospora anserina* and construction of a self-replicating linear plasmid showing high transformation frequency. *Nucleic Acids Res*, 21, 497-504.
- JAYASHREE, T. & SUBRAMANYAM, C. 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free radical biology & medicine*, 29, 981-5.
- JENCZMIONKA, N. & SCHÄFER, W. 2005. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Current Genetics*, 47, 29-36.
- JIAO, F., KAWAKAMI, A. & NAKAJIMA, T. 2008. Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett*, 285, 212-9.
- KACHROO, A., HE, Z., PATKAR, R., ZHU, Q., ZHONG, J., LI, D., RONALD, P., LAMB, C. & CHATTOO, B. B. 2003. Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic research*, 12, 577-86.
- KAL, A. J., VAN ZONNEVELD, A. J., BENES, V., VAN DEN BERG, M., KOERKAMP, M. G., ALBERMANN, K., STRACK, N., RUIJTER, J. M., RICHTER, A., DUJON, B., ANSORGE, W. & TABAK, H. F. 1999. Dynamics of Gene Expression Revealed by Comparison of Serial Analysis of Gene Expression Transcript Profiles from Yeast Grown on Two Different Carbon Sources. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 1859-1872.
- KANDROR, O., BRETSCHNEIDER, N., KREYDIN, E., CAVALIERI, D. & GOLDBERG, A. L. 2004. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Molecular cell*, 13, 771-81.
- KAWASAKI, L. & AGUIRRE, J. 2001. Multiple Catalase Genes Are Differentially Regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of bacteriology*, 183, 1434-1440.
- KAWASAKI, L., WYSONG, D., DIAMOND, R. & AGUIRRE, J. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *Journal of bacteriology*, 179, 3284-92.
- KETELA, T., BROWN, J. L., STEWART, R. C. & BUSSEY, H. 1998. Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Molecular & general genetics : MGG*, 259, 372-8.

- KIEL, J. A., VAN DER KLEI, I. J., VAN DEN BERG, M. A., BOVENBERG, R. A. & VEENHUIS, M. 2005. Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol*, 42, 154-64.
- KIM, J. H., YU, J., MAHONEY, N., CHAN, K. L., MOLYNEUX, R. J., VARGA, J., BHATNAGAR, D., CLEVELAND, T. E., NIERMAN, W. C. & CAMPBELL, B. C. 2008. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 49-60.
- KIM, J., MAHONEY, N., CHAN, K., MOLYNEUX, R. & CAMPBELL, B. 2006. Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 735-739.
- 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. *J Biol Chem*, 273, 1654-61.
- KIMURA, M., TOKAI, T., TAKAHASHI-ANDO, N., OHSATO, S. & FUJIMURA, M. 2007. Molecular and genetic studies of *fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 2105-23.
- KLOTZ, L. O. 2002. Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biological chemistry*, 383, 443-56.
- KONO, Y., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, M. & KOMADA, H. 1995. Alterations in superoxide dismutase and catalase in *Fusarium oxysporum* during starvation-induced differentiation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1268, 35-40.
- KREINER, M., M., H. L. & BRIAN, M. 2002. *Oxidative stress response of a recombinant Aspergillus niger to exogenous menadione and H[2]O[2] addition*, Amsterdam, PAYS-BAS, Elsevier.
- KUGE, S., ARITA, M., MURAYAMA, A., MAETA, K., IZAWA, S., INOUE, Y. & NOMOTO, A. 2001. Regulation of the Yeast Yap1p Nuclear Export Signal Is Mediated by Redox Signal-Induced Reversible Disulfide Bond Formation. *Molecular and cellular biology*, 21, 6139-6150.
- KUGE, S., JONES, N. & NOMOTO, A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO journal*, 16, 1710-20.
- KVIETYS, P. R. & GRANGER, D. N. 2012. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free radical biology & medicine*, 52, 556-92.
- LAMARRE, C., IBRAHIM-GRANET, O., DU, C., CALDERONE, R. & LATGÉ, J.-P. 2007. Characterization of the SKN7 ortholog of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 682-690.
- LAMBETH, J. D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews. Immunology*, 4, 181-9.
- LARA-ROJAS, F., SANCHEZ, O., KAWASAKI, L. & AGUIRRE, J. 2011. *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Molecular Microbiology*, 80, 436-454.
- LAWRENCE, C. L., MAEKAWA, H., WORTHINGTON, J. L., REITER, W., WILKINSON, C. R. M. & JONES, N. 2007. Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 5160-5170.

- LEAL, S. M., VAREECHON, C., COWDEN, S., COBB, B. A., LATG, XE, JEAN-PAUL, MOMANY, M. & PEARLMAN, E. 2012. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *The Journal of clinical investigation*, 122, 2482-2498.
- LEE, J., GODON, C., LAGNIEL, G., SPECTOR, D., GARIN, J., LABARRE, J. & TOLEDANO, M. B. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 274, 16040-6.
- LEE, P., CHO, B. R., JOO, H. S. & HAHN, J. S. 2008. Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Molecular Microbiology*, 70, 882-895.
- LEE, P., PAIK, S. M., SHIN, C. S., HUH, W. K. & HAHN, J. S. 2011. Regulation of yeast Yak1 kinase by PKA and autophosphorylation-dependent 14-3-3 binding. *Mol Microbiol*, 79, 633-46.
- 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.
- LEGOAHEC, L. 2012. Apport d'une approche métabolomique pour l'étude de la régulation de la toxinogénèse chez *F. graminearum*. *Rapport Stage de Master 2*.
- LEONARD, K. J. & BUSHNELL, W. R. 2003. *Fusarium head blight of wheat and barley*, St. Paul, Minn., APS Press.
- LESLIE, J. F. & SUMMERELL, B. A. 2005. The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell Publishing*.
- LEV, S., HADAR, R., AMEDEO, P., BAKER, S. E., YODER, O. C. & HORWITZ, B. A. 2005. Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryotic cell*, 4, 443-54.
- LI, G. & YEN, Y. 2008. Jasmonate and Ethylene Signaling Pathway May Mediate *Fusarium* Head Blight Resistance in Wheat All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher. Permission for printing and for reprinting the material contained herein has been obtained by the publisher. *Crop Sci.*, 48, 1888-1896.
- LI, Q., MCNEIL, B. & HARVEY, L. M. 2008. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radical Biology and Medicine*, 44, 394-402.
- LIMA, O. C., LARCHER, G., VANDEPUTTE, P., LEBOUIL, A., CHABASSE, D., SIMONEAU, P. & BOUCHARA, J. P. 2007. Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu,Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. *Microbes Infect*, 9, 558-65.
- LIU, X., ZHANG, X. & ZHANG, Z. 2010. Cu,Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 584, 1245-1250.
- LONG, L. K., YANG, J., AN, Y. & LIU, G. 2012. Disruption of a glutathione reductase encoding gene in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of its growth, cephalosporin production and antioxidative ability which is recovered by exogenous methionine. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 49, 114-22.
- LUSHCHAK, V. I. & GOSPODARYOV, D. V. 2005. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell biology international*, 29, 187-92.

- LYSOE, E., SEONG, K. Y. & KISTLER, H. C. 2011. The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Mol Plant Microbe Interact*, 24, 995-1000.
- MAGGIO-HALL, L. A., WILSON, R. A. & KELLER, N. P. 2005. Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production in planta. *Mol Plant Microbe Interact*, 18, 783-93.
- 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.
- MALAGNAC, F., KLAPHOLZ, B. & SILAR, P. 2007. PaTrx1 and PaTrx3, two cytosolic thioredoxins of the filamentous ascomycete *Podospira anserina* involved in sexual development and cell degeneration. *Eukaryotic cell*, 6, 2323-31.
- MAREK, E. T., SCHARDL, C. L. & SMITH, D. A. 1989. Molecular transformation of *Fusarium solani* with an antibiotic resistance marker having no fungal DNA homology. *Curr Genet*, 15, 421-428.
- MARKELL, S. G. & FRANCL, L. J. 2003. *Fusarium* Head Blight Inoculum: Species Prevalence and *Gibberella zeae* Spore Type. *Plant Disease*, 87, 814-820.
- MARTÍNEZ-PASTOR, M. T., MARCHLER, G., SCHÜLLER, C., MARCHLER-BAUER, A., RUIS, H. & ESTRUCH, F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO Journal*, 15, 2227-2235.
- MCCORMICK, S. P., STANLEY, A. M., STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3, 802-814.
- MCMULLEN, M., JONES, R. & GALLENBERG, D. 1997. Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease*, 81, 1340-1348.
- MERHEJ, J. 2010. Mécanismes moléculaires contrôlant la biosynthèse de mycotoxines par le champignon micromycète *Fusarium graminearum*. . *Thèse Université Bordeaux I*.
- MERHEJ, J., BOUTIGNY, A. L., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2010. Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 1-8.
- MERHEJ, J., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2011a. The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 275-284.
- MERHEJ, J., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2011b. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Applied microbiology and biotechnology*, 91, 519-28.
- MERHEJ, J., URBAN, M., DUFRESNE, M., HAMMOND-KOSACK, K. E., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2012. The velvet gene, FgVel1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 363-374.
- METRAUX, J. P. & RASKIN, I. 1993. Role of phenolics in plant disease resistance. *Biotechnology in plant disease control*. New York USA: Wiley-Liss Inc.
- MILLAR, J. B., BUCK, V. & WILKINSON, M. G. 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & development*, 9, 2117-30.

- 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.
- MONTIBUS, M., PONTS, N., ZEHRAOUI, E., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013. Fgap1-mediated response to oxidative stress in trichothecene-producing *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Reports*, 60, 410.
- MONTIBUS, M., DUCOS, C., BONNIN-VERDAL, M. N., BORMANN, J., PONTS, N., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013a. The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *Submitted to Plos One*.
- MONTIBUS, M., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F., BARREAU, C. & PONTS, N. 2013b. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, in press.
- MORGAN, B. A., BANKS, G. R., TOONE, W. M., RAITT, D., KUGE, S. & JOHNSTON, L. H. 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 16, 1035-44.
- MORTAZAVI, A., WILLIAMS, B. A., MCCUE, K., SCHAEFFER, L. & WOLD, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Meth*, 5, 621-628.
- MORTAZAVI, A., WILLIAMS, B. A., MCCUE, K., SCHAEFFER, L. & WOLD, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Meth*, 5, 621-628.
- MOTOYAMA, T., OCHIAI, N., MORITA, M., IIDA, Y., USAMI, R. & KUDO, T. 2008. Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity. *Current genetics*, 54, 185-95.
- MOYE-ROWLEY, W. S. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryotic cell*, 2, 381-9.
- MOYE-ROWLEY, W. S., HARSHMAN, K. D. & PARKER, C. S. 1989. Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes & development*, 3, 283-92.
- MULFORD, K. E. & FASSLER, J. S. 2011. Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic Cell*, 10, 761-9.
- MULLER, E. G. 1996. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Molecular Biology of the Cell*, 7, 1805-13.
- MULLER-TAUBENBERGER, A. & ANDERSON, K. I. 2007. Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 1-12.
- NAGAO, K., TAGUCHI, Y., ARIOKA, M., KADOKURA, H., TAKATSUKI, A., YODA, K. & YAMASAKI, M. 1995. bfr1+, a novel gene of *Schizosaccharomyces pombe* which confers brefeldin A resistance, is structurally related to the ATP-binding cassette superfamily. *J Bacteriol*, 177, 1536-43.
- NANDA, A. K., ANDRIO, E., MARINO, D., PAULY, N. & DUNAND, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of integrative plant biology*, 52, 195-204.

- NATHUES, E., JOSHI, S., TENBERGE, K. B., VON DEN DRIESCH, M., OESER, B., BAUMER, N., MIHLAN, M. & TUDZYNSKI, P. 2004. CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 17, 383-93.
- NAVARRO, R. E., STRINGER, M. A., HANSBERG, W., TIMBERLAKE, W. E. & AGUIRRE, J. 1996. catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Current genetics*, 29, 352-9.
- 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 Manag Sci*, 62, 775-84.
- NGUYEN, T. V., KRÖGER, C., BÖNNIGHAUSEN, J., SCHÄFER, W. & BORMANN, J. 2013. The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- NGUYEN, L. N., BORMANN, J., LE, G. T. T., STÄRKEL, C., OLSSON, S., NOSANCHUK, J. D., GIESE, H. & SCHÄFER, W. 2011. Autophagy-related lipase FgATG15 of *Fusarium graminearum* is important for lipid turnover and plant infection. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 217-224.
- NICHOLLS, S., STRAFFON, M., ENJALBERT, B., NANTEL, A., MACASKILL, S., WHITEWAY, M. & BROWN, A. J. P. 2004. Msn2- and Msn4-Like Transcription Factors Play No Obvious Roles in the Stress Responses of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 3, 1111-1123.
- NICHOLSON, R. L. & HAMMERSCHMIDT, R. 1992. Phenolic-compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369-389.
- OBeregger, H., ZADRA, I., SCHOESER, M. & HAAS, H. 2000. Iron starvation leads to increased expression of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Aspergillus*. *FEBS letters*, 485, 113-6.
- OSIEWACZ, H. D. 2011. Mitochondrial quality control in aging and lifespan control of the fungal aging model *Podospira anserina*. *Biochem Soc Trans*, 39, 1488-92.
- OUYANG, X., TRAN, Q. T., GOODWIN, S., WIBLE, R. S., SUTTER, C. H. & SUTTER, T. R. 2011. Yap1 activation by H₂O₂ or thiol-reactive chemicals elicits distinct adaptive gene responses. *Free radical biology & medicine*, 50, 1-13.
- PALUMBO, J. D., O'KEEFFE, T. L. & MAHONEY, N. E. 2007. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*, 164, 241-8.
- PARRY, D. W., JENKINSON, P. & MCLEOD, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- PESTKA, J. J. 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol*, 84, 663-79.
- 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. & DEMPFLER, L. 2002. Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 1-10.
- PICOT, A., ATANASOVA-PÉNICHON, V., PONS, S., MARCHEGAY, G., BARREAU, C., PINSON-GADAIS, L., ROUCOLLE, J., DAVEAU, F., CARON, D. & RICHARD-FORGET, F. 2013. Maize Kernel Antioxidants and Their Potential Involvement in *Fusarium* Ear Rot Resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3389-3395.

- 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.
- POCSI, I., MISKEI, M., KARANYI, Z., EMRI, T., AYOUBI, P., PUSZTAHELYI, T., BALLA, G. & PRADE, R. A. 2005. Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures--linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics*, 6, 182.
- POLLEY, R. W. & TURNER, J. A. 1995. Survey of stem base diseases and *Fusarium* ear diseases in winter wheat in England, Wales and Scotland, 1989-1990. *Annals of Applied Biology*, 126, 45-59.
- PONTS, N., ZEHRAOUI, E., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013. Transcriptomic profiling of fumonisin B biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Présentation orale - 12th European Fusarium Seminar*.
- PONTS, N., ZEHRAOUI, E., PINSON-GADAIS, L., RICHARD-FORGET, F. & BARREAU, C. 2013. Transcriptomic profiling of fumonisin B biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Présentation orale - 12th European Fusarium Seminar*.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BOUTIGNY, AL., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2011. Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes. *Phytopathology*, 101 (8), 929-34.
- PONTS, N., COUEDELO, L., PINSON-GADAIS, L., VERDAL-BONNIN, M. N., BARREAU, C. & RICHARD-FORGET, F. 2009. *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent. *FEMS microbiology letters*, 293, 255-62.
- PONTS, N., PINSON-GADAIS, L., BARREAU, C., RICHARD-FORGET, F. & OUELLET, T. 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS letters*, 581, 443-7.
- 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. & RICHARD-FORGET, F. 2003. H₂O₂ effects on trichothecenes B (DON, ADON) production by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *Aspects of Applied Biology*, 68.
- PROCTOR, R. H., HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 593-601.
- PROCTOR, R. H., HOHN, T. M. & MCCORMICK, S. P. 1997. Restoration of wild-type virulence to Tri5 disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology*, 143 (Pt 8), 2583-91.
- PUNT, P. J., DINGEMANSE, M. A., KUYVENHOVEN, A., SOEDE, R. D. M., POUWELS, P. H. & VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. 1990. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93, 101-109.
- PUSZTAHELYI, T., KLEMENT, E., SZAJLI, E., KLEM, J., MISKEI, M., KARANYI, Z., EMRI, T., KOVACS, S., OROSZ, G., KOVACS, K. L., MEDZIHRADESKY, K. F., PRADE, R. A. & POCSI, I. 2011. Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 92-103.

- QI, M. & ELION, E. A. 2005. MAP kinase pathways. *J Cell Sci*, 118, 3569-72.
- QIAO, J., LIU, W. & LI, R. 2010. Truncated Afp1 Attenuates Antifungal Susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to Voriconazole and Confers Adaptation of the Fungus to Oxidative Stress. *Mycopathologia* [Online], 170.
- RAITT, D. C., JOHNSON, A. L., ERKINE, A. M., MAKINO, K., MORGAN, B., GROSS, D. S. & JOHNSTON, L. H. 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Molecular biology of the cell*, 11, 2335-47.
- RAMSDALE, M., SELWAY, L., STEAD, D., WALKER, J., YIN, Z. K., NICHOLLS, S. M., CROWE, J., SHEILS, E. M. & BROWN, A. J. P. 2008. MNL1 Regulates Weak Acid-induced Stress Responses of the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 4393-4403.
- REVERBERI, M., FABBRI, A. A., ZJALIC, S., RICELLI, A., PUNELLI, F. & FANELLI, C. 2005. Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Applied microbiology and biotechnology*, 69, 207-15.
- REVERBERI, M., GAZZETTI, K., PUNELLI, F., SCARPARI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., FABBRI, A. & FANELLI, C. 2012. Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 1293-1304.
- REVERBERI, M., PUNELLI, M., SMITH, C. A., ZLAJIC, S., SCARPARI, M., SCALA, V., CARDINALI, G., ASPITE, N., PINZARI, F., PAYNE, G. A., FABBRI, A. A. & FANELLI, C. 2012. How peroxisomes affect aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *PLOS One*, 7, 10.
- REVERBERI, M., RICELLI, A., ZJALIC, S., FABBRI, A. A. & FANELLI, C. 2010. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 899-911.
- REVERBERI, M., ZJALIC, S., RICELLI, A., PUNELLI, F., CAMERA, E., FABBRI, C., PICARDO, M., FANELLI, C. & FABBRI, A. A. 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryotic cell*, 7, 988-1000.
- ROBINSON, M. J. & COBB, M. H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 180-6.
- ROCHA, O., ANSARI, K. & DOOHAN, F. M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22, 369-378.
- RODRIGUES-POUSADA, C., MENEZES, R. A. & PIMENTEL, C. 2010. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*, 27, 245-258.
- RODRIGUES-POUSADA, C. A., NEVITT, T., MENEZES, R., AZEVEDO, D., PEREIRA, J. & AMARAL, C. 2004. Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS letters*, 567, 80-85.
- ROETZER, A., GREGORI, C., JENNINGS, A. M., QUINTIN, J., FERRANDON, D., BUTLER, G., KUCHLER, K., AMMERER, G. & SCHULLER, C. 2008. *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Molecular Microbiology*, 69, 603-620.
- ROETZER, A., KLOPF, E., GRATZ, N., MARCET-HOUBEN, M., HILLER, E., RUPP, S., GABALDÓN, T., KOVARIK, P. & SCHÜLLER, C. 2011. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS letters*, 585, 319-327.

- ROLKE, Y., LIU, S., QUIDDE, T., WILLIAMSON, B., SCHOUTEN, A., WELTRING, K.-M., SIEWERS, V., TENBERGE, K. B., TUDZYNSKI, B. & TUDZYNSKI, P. 2004. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology*, 5, 17-27.
- ROZE, L. V., CHANDA, A., WEE, J., AWAD, D. & LINZ, J. E. 2011. Stress-related Transcription Factor AtfB Integrates Secondary Metabolism with Oxidative Stress Response in *Aspergilli*. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 35137-35148.
- SAIJO, T., MIYAZAKI, T., IZUMIKAWA, K., MIHARA, T., TAKAZONO, T., KOSAI, K., IMAMURA, Y., SEKI, M., KAKEYA, H., YAMAMOTO, Y., YANAGIHARA, K. & KOHNO, S. 2010. Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, 169, 81-90.
- SAKAMOTO, K., ARIMA, T.-H., IWASHITA, K., YAMADA, O., GOMI, K. & AKITA, O. 2008. *Aspergillus oryzae* atfB encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 922-932.
- SAKAMOTO, K., IWASHITA, K., YAMADA, O., KOBAYASHI, K., MIZUNO, A., AKITA, O., MIKAMI, S., SHIMOI, H. & GOMI, K. 2009. *Aspergillus oryzae* atfA controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 887-897.
- SANSO, M., GOGOL, M., AYTE, J., SEIDEL, C. & HIDALGO, E. 2008. Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryotic cell*, 7, 826-35.
- SANTOS, V. L. & LINARDI, V. R. 2004. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents—identification and degradation potential. *Process Biochemistry*, 39, 1001-1006.
- SATO, I., SHIMATANI, K., FUJITA, K., ABE, T., SHIMIZU, M., FUJII, T., HOSHINO, T. & TAKAYA, N. 2011. Glutathione Reductase/Glutathione Is Responsible for Cytotoxic Elemental Sulfur Tolerance via Polysulfide Shuttle in Fungi. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 20283-20291.
- SCHAAFSMA, A. W. & HOOKER, D. C. 2006. *Applications in forecasting deoxynivalenol in wheat using DONcast*.
- SCHACHERMAYR, G. & FRIED, P. M. 2000. Fusarioses et mycotoxines: le tour du problème. *Revue suisse d'Agriculture*, 32, 241-246.
- SHANMUGAM, V., RONEN, M., SHALABY, S., LARKOV, O., RACHAMIM, Y., HADAR, R., ROSE, M. S., CARMELI, S., HORWITZ, B. A. & LEV, S. 2010. The fungal pathogen *Cochliobolus heterostrophus* responds to maize phenolics: novel small molecule signals in a plant-fungal interaction. *Cellular Microbiology*, 12, 1421-1434.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W. & BROWN, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 467-70.
- SCHMIDT, M., AKASAKA, K., MESSERLY, J. T. & BOYER, M. P. 2012. Role of Hog1, Tps1 and Sod1 in boric acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 158, 2667-78.
- SCHMITT, A. P. & MCENTEE, K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 5777-82.

- SCHOUTEN, A., TENBERGE, K. B., VERMEER, J., STEWART, J., WAGEMAKERS, L., WILLIAMSON, B. & VAN KAN, J. A. L. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 3, 227-238.
- SCOTT, B. & EATON, C. J. 2008. Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 488-493.
- SEHATI, S., CLEMENT, M. H., MARTINS, J., XU, L., LONGO, V. D., VALENTINE, J. S. & GRALLA, E. B. 2011. Metabolic alterations in yeast lacking copper-zinc superoxide dismutase. *Free radical biology & medicine*, 50, 1591-8.
- SEONG, K. Y., PASQUALI, M., ZHOU, X., SONG, J., HILBURN, K., MCCORMICK, S., DONG, Y., XU, J. R. & KISTLER, H. C. 2009. Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis. *Mol Microbiol*, 72, 354-67.
- SEONG, K.-Y., ZHAO, X., XU, J.-R., GÜLDENER, U. & KISTLER, H. C. 2008. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 389-399.
- SHETTY, N., JØRGENSEN, H., JENSEN, J., COLLINGE, D. & SHETTY, H. 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 267-280.
- SHIN, Y. H., PARK, E. H., FUCHS, J. A. & LIM, C. J. 2002. Characterization, expression and regulation of a third gene encoding glutathione S-transferase from the fission yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 1577, 164-70.
- SINGH, P., CHAUHAN, N., GHOSH, A., DIXON, F. & CALDERONE, R. 2004. SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infection and immunity*, 72, 2390-4.
- 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.
- SMITH, A., WARD, M. P. & GARRETT, S. 1998. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *The EMBO journal*, 17, 3556-64.
- SMITH, J. L., DE MORAES, C. M. & MESCHER, M. C. 2009. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science*, 65, 497-503.
- STACK, R. W. 2000. Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. *Plant Health Progress*
- STEPHEN, D. W. S. & JAMIESON, D. J. 1996. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 141, 207-212.
- 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.
- SUZUKI, T., YOKOYAMA, A., TSUJI, T., IKESHIMA, E., NAKASHIMA, K., IKUSHIMA, S., KOBAYASHI, C. & YOSHIDA, S. 2011. Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112, 107-113.
- SWEENEY, M. J. & DOBSON, A. D. W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *Fems Microbiology Letters*, 175, 149-163.

- TAKAHASHI, M., YAMASHITA, K., SHIOZAWA, A., ICHIISHI, A., FUKUMORI, F. & FUJIMURA, M. 2010. An AP-1-Like Transcription Factor, NAP-1, Regulates Expression of the Glutathione S-Transferase and NADH:Flavin Oxidoreductase Genes in *Neurospora crassa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74, 746-752.
- TAKEDA, T., TODA, T., KOMINAMI, K. I., KOHNOSU, A., YANAGIDA, M. & JONES, N. 1995. *Schizosaccharomyces pombe* atf1(+) encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *Embo Journal*, 14, 6193-6208.
- TEMME, N., OESER, B., MASSAROLI, M., HELLER, J., SIMON, A., GONZÁLEZ COLLADO, I., VIAUD, M. & TUDZYNSKI, P. 2012. BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 13, 704-718.
- TEMME, N. & TUDZYNSKI, P. 2009. Does botrytis cinerea Ignore H₂O₂-induced oxidative stress during infection? Characterization of botrytis activator protein 1. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22, 987-98.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, Chapter 2, Unit 2.3.
- TOLEDANO, M., DELAUNAY, A., BITEAU, B., SPECTOR, D. & AZEVEDO, D. 2003. Oxidative stress responses in yeast. In: HOHMANN, S. & MAGER, W. (eds.) *Yeast Stress Responses*. Springer Berlin Heidelberg.
- TOONE, W. M. & JONES, N. 1999. AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev*, 9, 55-61.
- TOONE, W. M., KUGE, S., SAMUELS, M., MORGAN, B. A., TODA, T. & JONES, N. 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes & development*, 12, 1453-63.
- TRAIL, F. 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol*, 149, 103-10.
- TRAIL, F., XU, H., LORANGER, R. & GADOURY, D. 2002. Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia*, 94, 181-189.
- TURNER, J. G., ELLIS, C. & DEVOTO, A. 2002. The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14 Suppl, S153-64.
- VAN LOON, A. P. G. M., PESOLD-HURT, B. & SCHATZ, G. 1986. *A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen*, Washington, DC, ETATS-UNIS, National Academy of Sciences.
- VAN NGUYEN, T., HADELER, B., KRÖGER, C., SCHÄFER, W. & BORMANN, J. 2013. The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production and stress tolerance in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics Reports*, 60, 546.
- VEAL, E. A., TOONE, W. M., JONES, N. & MORGAN, B. A. 2002. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*, 277, 35523-31.
- VELUCHAMY, S., WILLIAMS, B., KIM, K. & DICKMAN, M. B. 2012. The CuZn superoxide dismutase from *Sclerotinia sclerotiorum* is involved with oxidative stress tolerance, virulence, and oxalate production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 14-23.

- VIVANCOS, A., JARA, M., ZUIN, A., SANSÓ, M. & HIDALGO, E. 2006. Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 495-502.
- VOGEL, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, 13, 42-43.
- WALTER, S., NICHOLSON, P. & DOOHAN, F. M. 2009. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytol*, 185, 54-66.
- WALTHER, A. & WENDLAND, J. 2012. Yap1-dependent oxidative stress response provides a link to riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 697-707.
- WAN, L. Y. M., TURNER, P. C. & EL-NEZAMI, H. 2013. Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 276-283.
- 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.
- WANG, Z., GERSTEIN, M. & SNYDER, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10, 57-63.
- WANG, Z., HE, Z., SHEN, Q., GU, Y., LI, S. & YUAN, Q. 2005. Purification and partial characterization of recombinant Cu, Zn containing superoxide dismutase of *Cordyceps militaris* in *E.coli*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 826, 114-21.
- WATANABE, Y. & YAMAMOTO, M. 1996. *Schizosaccharomyces pombe* pcr1⁺ encodes a CREB/ATF protein involved in regulation of gene expression for sexual development. *Molecular and cellular biology*, 16, 704-11.
- WEMMIE, J. A., STEGGERDA, S. M. & MOYE-ROWLEY, W. S. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* AP-1 protein discriminates between oxidative stress elicited by the oxidants H₂O₂ and diamide. *The Journal of biological chemistry*, 272, 7908-14.
- WILCOXON, R. D., KOMMEDAHL, T., OZMON, E. A. & WINDELS, C. 1988. Occurrence of *Fusarium* species in scabby wheat from Minnesota and their pathogenicity to wheat. *Phytopathology*, 78, 586-589.
- WILKINSON, M. G., SAMUELS, M., TAKEDA, T., TOONE, W. M., SHIEH, J. C., TODA, T., MILLAR, J. B. & JONES, N. 1996. The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & development*, 10, 2289-301.
- WINDELS, C. 2000. Economic and social impacts of *Fusarium* Head Blight : Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology*, 90, 17-21.
- WOJTASZEK, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*, 322 (Pt 3), 681-92.
- WOOD, M. 2002. Gene jockey fight *Fusarium* head blight. *Agricultural Research*, 50, 12-13.
- WORMLEY, F. L., JR., HEINRICH, G., MILLER, J. L., PERFECT, J. R. & COX, G. M. 2005. Identification and characterization of an SKN7 homologue in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*, 73, 5022-30.
- WONG, P., WALTER, M., LEE, W., MANNHAUPT, G., MUNSTERKOTTER, M., MEWES, H. W., ADAM, G. & GULDENER, U. 2011. FGDB: revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Res*, 39, D637-9.

- WU, A. L. & MOYE-ROWLEY, W. S. 1994. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular and cellular biology*, 14, 5832-9.
- XU, X. & NICHOLSON, P. 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 83-103.
- YAMASHITA, K., SHIOZAWA, A., WATANABE, S., FUKUMORI, F., KIMURA, M. & FUJIMURA, M. 2008. ATF-1 transcription factor regulates the expression of ccg-1 and cat-1 genes in response to fludioxonil under OS-2 MAP kinase in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 1562-1569.
- YAN, C., LEE, L. H. & DAVIS, L. I. 1998. Crmlp mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *The EMBO journal*, 17, 7416-29.
- YANG, F., SVENSSON, B. & FINNIE, C. 2011. Response of germinating barley seeds to *Fusarium graminearum*: The first molecular insight into *Fusarium* seedling blight. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*, 49, 1362-8.
- YANG, S. L., LIN, C.-H. & CHUNG, K.-R. 2009. Coordinate control of oxidative stress tolerance, vegetative growth, and fungal pathogenicity via the AP1 pathway in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 100-110.
- YU, J. H. & KELLER, N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 437-458.
- ZHAO, C., WAALWIJK, C., DE WIT, P. J. G. M., TANG, D. & VAN DER LEE, T. 2013. RNA-Seq analysis reveals new gene models and alternative splicing in the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics*, 14, 21.
- ZHOU, W., 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 / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada*, 48, 770-80.
- ZHOU, X. W., WANG, X. F. & LI, Q. Z. 2012. Expression and characteristic of the Cu/Zn superoxide dismutase gene from the insect parasitizing fungus *Cordyceps militaris*. *Mol Biol Rep*, 39, 10303-11.
- ZINTEL, S., BERNHARDT, D., ROGOWSKA-WRZESINSKA, A. & OSIEWACZ, H. D. 2011. PaCATB, a secreted catalase protecting *Podospora anserina* against exogenous oxidative stress. *Aging*, 3, 768-81.

Annexes

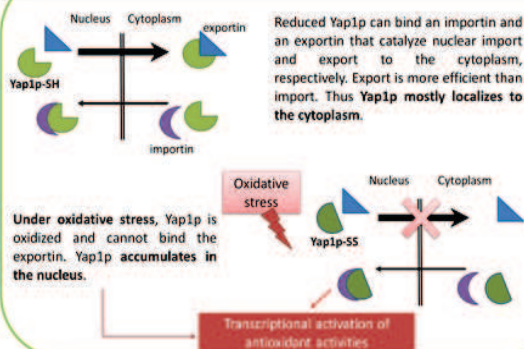
Fusarium graminearum Fgap1 regulates *Tri* genes expression and trichothecene B production in response to oxidative stress

Mathilde Montibus, Enric Zehraoui, Nadia Ponts, Florence Forget and Christian Barreau
UR1264 MycSA INRA Bordeaux, BP81, F-33883 Villenave d'Ornon cedex, France
Email : mathilde.montibus@bordeaux.inra.fr

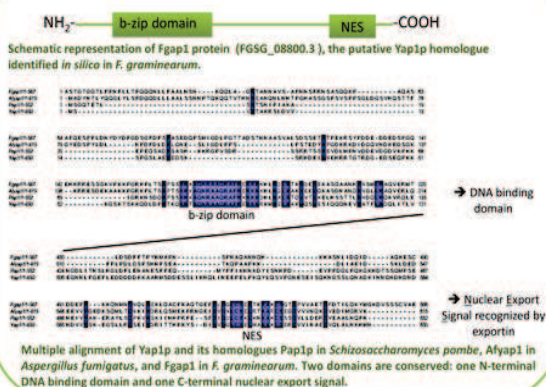


The filamentous fungus *Fusarium graminearum* causes *Fusarium* Head Blight and produces mycotoxins belonging to the trichothecenes family. The biosynthetic pathway leading to the accumulation of toxins in kernels has been elucidated and involves specific *Tri* genes. Nevertheless, the molecular events regulating toxin biosynthesis remain enigmatic. We previously observed that *Tri* genes are up-regulated in the presence of oxidative stress with H_2O_2 , and toxin accumulation is enhanced¹. In *Saccharomyces cerevisiae*, the transcription factor Yap1p regulates redox stress². Here, we investigate the potential role of a Yap1p *F. graminearum* homologue in oxidative stress adaptation and toxin accumulation.

Yap1p in *Saccharomyces cerevisiae*



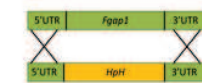
Fgap1 in *Fusarium graminearum*



Construction of Fgap1 mutants

Δ Fgap1: a deletion mutant

- The genomic copy of Fgap1 was replaced by a hygromycin resistance cassette (double homologous recombination).
- Fgap1 is not expressed.



Δ Fgap1 - Loss of function



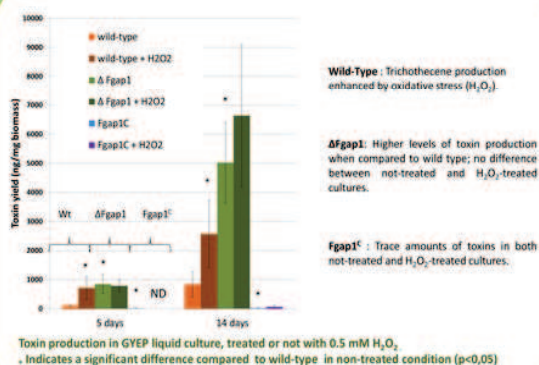
Fgap1^C: a constitutively activated form of fgap1

- The genomic copy of Fgap1 was replaced by a truncated version, i.e., without the nuclear export signal (NES), and placed under the control of the pGPD strong promoter and the TrpC terminator.
- Fgap1^C is always expressed and should be located in the nucleus.



Fgap1^C - Constitutively active (Nuclear localization)

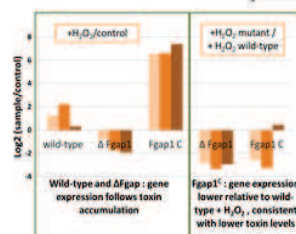
Fgap1 interferes with toxin production



Fgap1 interferes with *Tri* genes expression

Δ Fgap1: No significant difference between the wild type and the deleted mutant.

Fgap1^C: Significant down-regulation of *Tri* genes compared to wild type.



✓ The putative Yap1p homologue in *Fusarium graminearum*, Fgap1, has been identified
✓ This factor is involved in the regulation of trichothecene biosynthesis and interferes with the expression of *Tri* genes

FGAP1-MEDIATED RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS IN TRICHOHECENE- PRODUCING *FUSARIUM GRAMINEARUM*



M. MONTIBUS¹, E. ZEHRAOUI¹, C. DUCOS¹, N. PONTS¹, F. RICHARD-FORGET¹, C. BARREAU¹

The filamentous fungus *Fusarium graminearum* infects cereals and corn. It is one of the main causal agent of "Fusarium Head Blight" and "Maize Ear Rot". During infection, it produces mycotoxins belonging to the **trichothecenes** family that accumulate in the grains. Although the biosynthetic pathway involving specific **Tri genes** has been elucidated, the global regulation of toxin biosynthesis remains enigmatic. It is now established that **oxidative stress** modulates the production of toxins by *F. graminearum*. H_2O_2 added in liquid cultures of this fungus enhances trichothecenes B accumulation (deoxynivalenol and its acetylated forms, or DON and ADON) and increases **Tri genes** expression. Our working hypothesis is that a **transcription factor regulates redox homeostasis, and is involved in Tri genes regulation**. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the transcription factor Yap1p mediates response to oxidative stress via nuclear re-localization and activation of genes coding for detoxification enzymes. In this study, we used **reverse genetics approaches** to investigate the role of Yap1 homolog in *F. graminearum*, **Fgap1**, in response to oxidative stress and its eventual role in the regulation of trichothecene production.

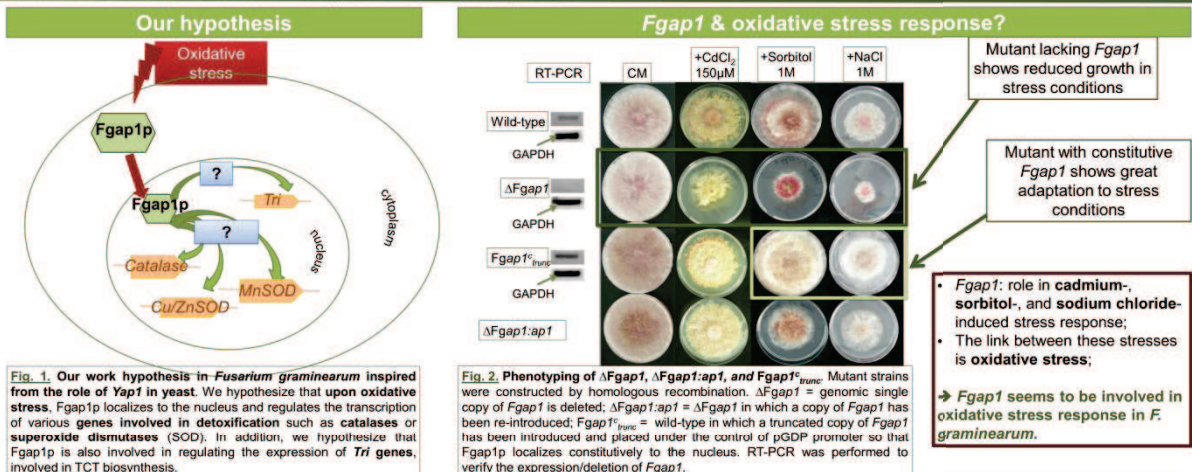
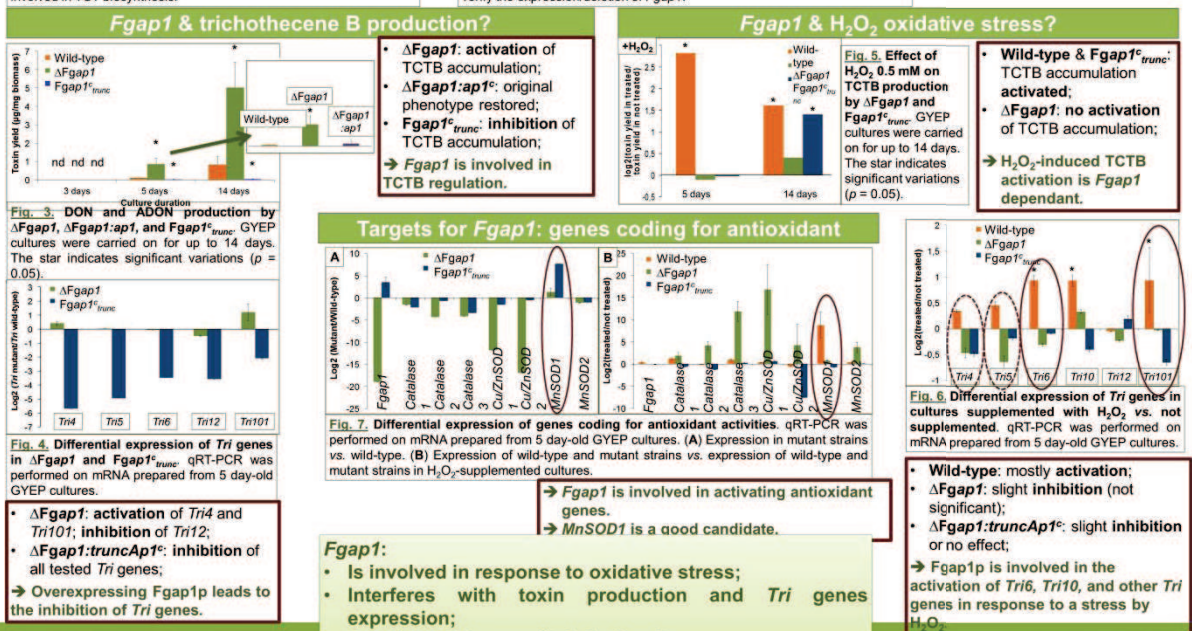


Fig. 1. Our work hypothesis in *Fusarium graminearum* inspired from the role of Yap1 in yeast. We hypothesize that upon oxidative stress, Fgap1p localizes to the nucleus and regulates the transcription of various genes involved in detoxification such as catalases or superoxide dismutases (SOD). In addition, we hypothesize that Fgap1p is also involved in regulating the expression of **Tri genes**, involved in TCT biosynthesis.

Fig. 2. Phenotyping of Δ*Fgap1*, Δ*Fgap1:ap1*, and *Fgap1*^{trunc}. Mutant strains were constructed by homologous recombination. Δ*Fgap1* = genomic single copy of *Fgap1* is deleted; Δ*Fgap1:ap1* = Δ*Fgap1* in which a copy of *Fgap1* has been re-introduced; *Fgap1*^{trunc} = wild-type in which a truncated copy of *Fgap1* has been introduced and placed under the control of pGDP promoter so that Fgap1p localizes constitutively to the nucleus. RT-PCR was performed to verify the expression/deletion of *Fgap1*.



¹INRA, UR1264-MycSA, CS20032, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France



MONTIBUS M, 2013 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de la production de trichothécènes de type B par *Fusarium graminearum* en réponse au stress oxydant.

Fusarium graminearum est un champignon phytopathogène responsable de la fusariose de l'épi, maladie affectant les céréales telles que le blé ou le maïs. Le champignon peut également produire des métabolites secondaires toxiques ou mycotoxines, tels que les trichothécènes de type B qui sont stables d'un point de vue chimique et thermique. Ces mycotoxines peuvent contaminer les grains avant récolte. Aucun procédé à l'heure actuelle ne permet de les éliminer ou de limiter leur toxicité. Un moyen de lutte efficace est donc de limiter la biosynthèse de ces toxines. Cette voie implique les gènes *Tri* qui sont regroupés dans un cluster dont la régulation est complexe. Lors de l'infection de la plante hôte, le champignon se retrouve potentiellement en contact avec des molécules pro ou antioxydantes intervenant dans les mécanismes de défense de la plante. *In vitro*, ces molécules pro-oxydantes activent la production de trichothécènes *via* la surexpression des gènes *Tri* alors que les composés antioxydants la répriment, *via* la répression des gènes *Tri*.

Le facteur de transcription Fgap1, homologue au facteur Yap1 de levure impliqué dans la réponse au stress oxydant, a été identifié chez *F. graminearum* et son rôle potentiel dans la régulation de la biosynthèse des trichothécènes a été étudié. Des souches recombinantes ont été construites et ont permis de montrer l'implication de ce facteur non seulement dans l'activation de l'expression des gènes de détoxification, mais aussi dans la modulation de la production de trichothécènes en réponse au stress oxydant. Ce facteur n'intervient cependant pas dans la réponse aux composés antioxydants. Une analyse RNA-seq a été entreprise pour identifier plus globalement les réseaux de régulation impliqués en réponse aux variations redox.

Mots-clés : *Fusarium graminearum*, stress oxydant, *Fgap1*, gènes *Tri*

MONTIBUS M, 2013: Molecular mechanisms involved in the modulation of type B trichothecene biosynthesis by *Fusarium graminearum* in response to oxidative stress.

Fusarium graminearum is a pathogenic fungus responsible for “*Fusarium* Head Blight”, a disease affecting cereals, including wheat or maize. The fungus can produce toxic secondary metabolites belonging to the type B trichothecene family. These metabolites are heat and chemically stable molecules. These toxins can be found in grains before harvest and no available decontamination process can eliminate or detoxify trichothecenes. The best way to restrict their occurrence is to limit their biosynthesis. The *Tri* genes involved in the biosynthetic pathway are clustered and their regulation is complex. During plant/pathogen interaction, the fungus must cope with pro or antioxidants, involved in plant defense mechanisms. *In vitro*, prooxidant molecules stimulate trichothecenes biosynthesis *via Tri* genes overexpression, whereas antioxidants compounds repress *Tri* genes expression and toxin accumulation.

The transcription factor Fgap1, homologous to Yap1 in yeast and involved in response to oxidative stress, was identified in *F. graminearum* and its potential role in the regulation of trichothecenes biosynthesis was investigated. Using recombinant strains, we demonstrated that, in response to oxidative stress, *Fgap1* is not only involved in expression of detoxifying activities, but also in the modulation of trichothecene accumulation. Nonetheless, *Fgap1* is not involved in response to antioxidant compounds. RNA-seq analysis has been initiated to identify regulatory network involved in response to redox variations.

Keywords: *Fusarium graminearum*, oxidative stress, *Fgap1*, *Tri* genes