



Décrypter la modulation de la biosynthèse d'enniatines par *Fusarium avenaceum* sous l'effet de stress abiotiques

Charlotte Gautier

► To cite this version:

Charlotte Gautier. Décrypter la modulation de la biosynthèse d'enniatines par *Fusarium avenaceum* sous l'effet de stress abiotiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0266 . tel-03130239

HAL Id: tel-03130239

<https://theses.hal.science/tel-03130239>

Submitted on 3 Feb 2021

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
SPÉCIALITÉ Microbiologie-Immunologie

Par
Charlotte GAUTIER

**“ Décrypter la modulation de la biosynthèse d’enniatines
par *Fusarium avenaceum* sous l’effet de stress abiotiques ”**

Soutenue le 15 Décembre 2020

Membres du jury :

M. NOEL Thierry, Professeur, Université de Bordeaux, Président du jury
Mme. VIAUD Muriel, Directrice de recherche, INRAE de Versailles-Grignon, Rapporteur
M. GROVEL Olivier, Professeur, Université de Nantes, Rapporteur
Mme. CLUZET Stéphanie, Maître de conférences, Université de Bordeaux, Examineur
M. LE FLOCH Gaétan, Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale, Examineur
Mme. RICHARD-FORGET Florence, Directrice de recherche, INRAE de Bordeaux, Directrice de thèse

Remerciements

Cette thèse, réalisée au laboratoire de Mycologie et Sécurité des Aliments à l'INRAE de Bordeaux, n'aurait pas été possible sans le soutien financier du département MICA-INRAE et de la région Nouvelle-Aquitaine dans le cadre d'une bourse de doctorat.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ces travaux.

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

Mes plus vifs remerciements à mon encadrante de thèse, Florence Richard-Forget. Merci infiniment pour votre bienveillance, votre disponibilité et la confiance que vous m'avez accordée. Il y a eu des moments difficiles (en même temps qui a dit que ce serait facile ?) ... J'ai fait de mon mieux et espère avoir été à la hauteur. Je n'avais jusqu'à présent jamais rencontré personne de plus exigeante que moi. Votre exigence aura eu du bon car « c'est en forgeant que l'on devient forgeron ». Pas vrai ?

Merci à ma coach personnelle, Marie. Vous avez eu une double casquette : collègue et amie ; jouant parfois la maman de substitution en l'absence de la chef et celle qui écoute, donne des conseils. Toujours là en cas de coups de blues ! Votre patience aura été sans faille lors de nos longues (longues) discussions scientifiques, des plus tortueuses parfois. La prise de recul, ça a du bon.

La génét et moi, ça fait deux. N'est-ce pas Nadia ? Votre aide a été des plus précieuses aussi bien pour les trucs et astuces de paillasse (extraction d'ADN, dosage nanodrop...) que pour nos échanges sur les résultats (parce que c'est complexe, si bien que j'en ai des nœuds au cerveau). Et je vous le confirme, pour avoir fait les deux : une thèse, c'est un marathon.

Je souhaite également remercier Vessela et Sylvain, pour votre participation plus qu'active à ces travaux de recherche. Merci pour votre gentillesse et votre sincérité Vessela. Merci à toi Sylvain car je sais à présent apprivoiser la bête (alias HUPLC). Je n'oublierai pas non plus, cette virée en Irlande qui fût mon premier colloque européen (et pas le dernier j'espère).

Merci Leatitia pour votre sympathie ainsi que vos connaissances aiguisées en microbiologie et Qpcr. Le montage du manuscrit n'a pas été si sportif finalement et ce grâce à vous.

Un grand merci à Christine, Marie-Noëlle, Nathalie et Magalie pour les manips réalisées ensemble ou non. Vous m'avez beaucoup aidé ces derniers mois pour les nombreuses expériences à lancer, continuer ou terminer si bien que les résultats figurent aujourd'hui dans le manuscrit.

D'énormes remerciements à la « Team PhD », Aurélie, Valentin et Jean-Marie. Merci pour tout, ne changez pas. Ces moments de complicité me manqueront. Je vous souhaite le meilleur.

Merci beaucoup pour votre bienveillance Thierry. Les petits tracas informatiques étaient vite oubliés grâce à vous.

J'aimerais remercier Gérard pour cette initiation à l'enseignement.

Petite pensée également aux anciens membres de MycSA. Nathalie, vous avez été un repère à mon arrivée au labo. Merci pour votre amitié et vos nombreuses douceurs sucrées qui font du bien en toutes circonstances. Merci à toi Enric pour ton aide technique. Je n'oublie pas non plus Gisou, toujours de bonne humeur et prête à donner un p'tit coup de mains.

A mon club des quatre : Isabelle, Maïwenn, Judith et Carolina. Merci à vous les filles, pour votre collaboration à ce projet de thèse et vos petits mots d'encouragements. Je ne sais pas si je vous ai donné la fibre de la recherche mais en tout cas, j'ai pris beaucoup de plaisir (et de fous rires) à travailler avec vous. Bon continuation !

Merci également aux secrétaires, Corine et Marie-France, de m'avoir aidé dans la paperasse administrative et pour vos nombreux services.

Sans aucun doute, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur si vous n'aviez pas été tous là... et je n'y serai jamais arrivée seule. Ces trois années sont passées bien vite. Il y a eu des hauts et des bas dans cette aventure mais l'aboutissement de cette thèse est une réussite collective.

Merci à mes beaux-parents (je sais que vous n'aimez pas que je vous appelle comme ça), Catherine et Bernard, de m'avoir poussé à toujours donner le meilleur de moi-même. Votre soutien et vos conseils m'ont été précieux.

Mamie Jeanine, merci de croire en moi comme tu le fais et j'ai bien sûr une pensée pour Mamie Gisèle.

Un grand merci à mes parents. Sans vous je n'aurais pas pu en arriver là. Je vous dois beaucoup. Je suis fière d'avoir des parents comme vous.

Enfin, un infini merci à celui qui partage ma vie et qui me supporte depuis plusieurs années. Merci Mon Nicolas pour ton soutien, ta patience, ton affection durant ces moments de stress et de doute.

If it's above your strength, go beyond yourself !

- Emily Dickson -

Publications scientifiques

Gautier C., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F. 2020. ***Fusarium* Mycotoxins Enniatins: an updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 68, 17, 4788-4798; doi: 10.1021/acs.jafc.0c00411

Ponts N., Gautier C., Gouzy J., Pinson-Gadais L., Foulongne-Oriol M., Ducos C., Richard-Forget F., Savoir J-M., Zhao C., Barroso G. 2020. **Evolution of *Fusarium tricinctum* and *Fusarium avenaceum* mitochondrial genomes is driven by mobility of introns and of a new type of palindromic microsatellite repeats.** BMC Genomics; 21:358, 1-16 doi: 10.1186/s12864-020-6770-2

Gautier C., Pinson-Gadais L., Verdal-Bonnin M-N., Ducos C., Tremblay J., Chéreau S., Atanasova V., Richard-Forget F. **Investigating the efficiency of hydroxycinnamic phenolic acids to inhibit the production of enniatins by *F. avenaceum* and modulate the expression of biosynthetic genes.** Accepted for publication with minor revisions (Oct. 2020) in Toxins

Communications scientifiques

- Communications orales -

Gautier C., Gadras M., Chéreau S., Zehraoui E., Ponts N., Richard-Forget F. **Deciphering the effect of ambient pH on the production of enniatins by *Fusarium avenaceum***. 11èmes Journées des Doctorants SPE, Rennes, France, 21-23 Mai 2019

Gautier C., Ferrer N., Chéreau S., Zehraoui E., Ponts N., Richard-Forget F. **Deciphering the effect of ambient pH on enniatins production by *Fusarium avenaceum***. Journées des Mycotoxines, Brest, France, 30-31 Janvier 2020

- Présentations poster -

Gautier C., Ferrer N., Chéreau S., Pinson-Gadais L., Oriol-Foulongne M., Ponts N., Richard-Forget F. **Deciphering the modulation of the biosynthesis of enniatins by *Fusarium spp.* by abiotic stresses**. 10èmes Journées des Doctorants SPE, Nice, France, 27-29 Juin 2018

Gautier C., Gadras M., Chéreau S., Zehraoui E., Ponts N., Richard-Forget F. **Deciphering the effect of ambient pH on the production of enniatins by *Fusarium avenaceum***. The World Mycotoxin Forum, Belfast, Irlande du nord, 14-16 Octobre 2019

Gautier C., Gadras M., Chéreau S., Zehraoui E., Ponts N., Richard-Forget F. **Deciphering the effect of ambient pH on the production of enniatins by *Fusarium avenaceum***. 15th European Conference on Fungal Genetics, Rome, Italie, 17-20 Février 2020

Table des matières

Avant-propos.....	3
Introduction.....	7
I. La fusariose du blé.....	7
I.1. Origine et cause de la maladie	7
I.2. Les principales espèces fongiques responsables du FHB.....	9
I.3. Les mycotoxines de <i>Fusarium</i> : réglementation et conséquences toxicologiques ...	13
I.4. Cycle infectieux des espèces du complexe FHB.....	17
I.5. Moyens de contrôle de la contamination des céréales par les mycotoxines de <i>Fusarium</i>	19
II. Régulation de la production de mycotoxines sous l'effet de facteurs abiotiques : variation du pH et potentiel redox.....	25
II.1. Homéostasie du pH, facteur de transcription PacC et production de mycotoxines	26
II.2. Effet d'antioxydants naturels, les acides phénoliques, sur la croissance fongique et production de mycotoxines.....	29
III. <i>F. avenaceum</i> : un agent majeur de la fusariose des blés et de la contamination des récoltes par les enniatines.....	32
III.1. Revue: " <i>Fusarium</i> Mycotoxins Enniatins: an updated review of their occurrence, the producing <i>Fusarium</i> species and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests", Gautier et al., 2020.....	32
III.2. Données de caractérisation de l'espèce <i>F. avenaceum</i>	45
IV. Projet de thèse	48
V. Bibliographie.....	51
« Préambule » : caractéristiques de croissance et toxinogénèse de <i>F. avenaceum</i> dans les conditions de culture utilisées.....	67
I. Résultats.....	67

II. Matériels et méthodes	71
II.1. Préparation de l'inoculum	71
II.2. Milieux et conditions de culture.....	71
II.3. Extraction et dosage des enniatines.....	72
II.4. Suivi de l'expression de gènes cibles.....	73
III. Bibliographie	77
Chapitre 1 : Caractérisation de la diversité phénotypique intraspécifique chez <i>F. avenaceum</i>.....	81
Article : "Phenotypic variations within <i>Fusarium avenaceum</i> : variable and versatile behaviours according to abiotic conditions" Gautier et al, soumis prochainement	81
I. Introduction.....	83
II. Materials and methods	85
II.1. <i>F. avenaceum</i> strains and inoculum production.....	85
II.2. Pigmentation and growth assay.....	85
II.3. Cultures in liquid media	87
II.4. Toxin analyses.....	87
II.5. Statistical analysis	88
III. Results and discussion	88
III.1. Visual and RGB comparison of the colours of aerial mycelia	88
III.2. <i>In vitro</i> fungal growth	92
III.3. Production of enniatin in FDM media	95
III.4. Effect of temperature on the fungal biomass and enniatins production by <i>F.</i> <i>avenaceum</i>	97
III.5. Effect of ambient pH on fungal biomass and enniatins production by <i>F.</i> <i>avenaceum</i> strains	100
III.6. High diversity between strains of the same species.....	104
IV. Conclusion	105

V. References	107
Chapitre 2 : Rôle du facteur de régulation Pac1 dans la modulation de la production d’enniatines par le pH ambiant chez <i>F. avenaceum</i>	115
I. Résultats.....	116
<u>I.1. pH et production d’enniatines par <i>F. avenaceum</i> : résultats marquants (« Préambule », Chapitre 1).....</u>	<u>116</u>
<u>I.2. Identification et caractérisation d’un orthologue putatif de <i>FgPac1</i> chez <i>F. avenaceum</i></u>	<u>117</u>
<u>I.3. Construction de mutants délétés pour le gène <i>FavPac1</i></u>	<u>119</u>
<u>I.4. Impact de la délétion de <i>FavPac1</i> sur la capacité de <i>F. avenaceum</i> à produire des spores</u>	<u>120</u>
<u>I.5. Impact de la délétion de <i>FavPac1</i> sur la réponse au stress chez <i>F. avenaceum</i>.....</u>	<u>121</u>
<u>I.6. La délétion de <i>FavPac1</i> affecte la réponse de <i>F. avenaceum</i> au pH ambiant en termes de croissance et de production d’enniatines</u>	<u>123</u>
II. Discussion.....	127
III. Matériels et méthodes.....	131
<u>III.1. Souches, milieux et conditions de culture</u>	<u>131</u>
<u>III.2. Identification in silico de Pac1 chez <i>F. avenaceum</i>.....</u>	<u>132</u>
<u>III.3. Ingénierie des mutants <i>FavΔPac1</i></u>	<u>132</u>
<u>III.4. Séquençage et analyses</u>	<u>132</u>
IV. Bibliographie	134
Chapitre 3 : Modulation de la biosynthèse d’enniatines par les acides phénoliques	139
Article: “Investigating the efficiency of hydroxycinnamic phenolic acids to inhibit the production of enniatins by <i>F.avenaceum</i> and modulate the expression biosynthetic genes.” Gautier et al., 2020.	139

Discussion et Perspectives	163
I. L’existence d’une diversité phénotypique importante chez <i>F. avenaceum</i> pourrait être un élément d’explication de sa présence très large et de la fréquence des évènements de contamination par les enniatines.....	165
II. Le pH ambiant régule la croissance et la production de toxines, cette modulation est pour partie contrôlée par <i>FavPac1</i>.....	166
III. Les acides phénoliques, inhibiteurs efficaces de la production d’enniatines à pH acide.....	169
IV. Bibliographie	171
Conclusion	177
I. Bibliographie	178
Annexes	181
I. Composition des milieux de culture	181
II. Article:” Evolution of <i>Fusarium tricinctum</i> and <i>Fusarium avenaceum</i> mitochondrial genomes is driven by mobility of introns and of a new type of palindromic microsatellite repeats” Ponts et al., 2020	183

Table des illustrations

- Introduction -

Figure 1 : Symptômes caractéristiques de la fusariose de l'épi sur blé. p8

Figure 2 : Cladogramme du règne fongique. p9

Figure 3 : Principales mycotoxines produites par les espèces fongiques du genre *Fusarium*. p10

Figure 4 : Principales espèces de *Fusarium* responsables du FHB dans les grains de blé tendre (BT) et de blé dur (BD) récoltés sur trois années (2007, 2008 et 2009) en France. p11

Figure 5 : Fréquence d'infection par différentes espèces fusariennes des grains de blé tendre et dur, récoltés sur trois années (2007, 2008 et 2009) en France. p12

Tableau 1 : Teneurs maximales autorisées en mycotoxines dans les denrées destinées à l'alimentation humaine. p15

Tableau 2 : Effets toxiques des principales mycotoxines. p16

Figure 6 : Cycle de vie de *F. graminearum* lors de la fusariose du blé. p18

Figure 7 : Facteurs de modulation et facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biosynthèse de déoxynivalénol. p25

Figure 8 : Mécanismes de régulation de la voie de signalisation du pH en milieu alcalin chez *A. nidulans*. p26

Figure 9 : Représentation des domaines protéiques de PacC chez *A. nidulans*. p27

Figure 10 : Structure des acides phénoliques, dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique. p30

Figure 1 (revue). Chemical structures and schematic model of the biosynthesis of ENNs A, A1, B, and B1. p34

Figure 2 (revue). European map of ENN occurrence. p34

Table 1 (revue). Data Reporting the Occurrence of ENNs in Cereal Crops Published in the Last 15 Years. p35

Figure 3 (revue). *Fusarium* species reported as producers of ENNs on cereals or other non-cereal host plants. p37

Figure 11 : Caractéristiques morphologiques de *F. avenaceum* en milieu solide PDA et des macroconidies cultivées en milieu CMC. p45

Figure 12 : Arbre phylogénétique des espèces de *Fusarium* établi à partir des séquences de 30 gènes de ménage. p46

Figure 13 : Quelques connaissances du pathosystème et questions de recherche. p50

- Préambule -

Figure 1 : Cinétique de la croissance fongique de I612, de la production de toxines et de l'évolution du pH dans le milieu liquide FDM. p68

Figure 2 : Expression relative des gènes *esyn1*, *kivr* et *FavPac1* dans le milieu liquide FDM. p70

Tableau 1. Liste des souches de *F. avenaceum* utilisées au cours de l'étude. p72

Tableau 2 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des enniatines pour l'UPLC-DAD. p73

Tableau 3 : Paramètres d'amplification de la PCR quantitative pour vérifier l'absence de contamination des ARNs en ADN génomique. p74

Tableau 4 : Paramètres d'amplification de la PCR quantitative pour l'étude de l'expression des gènes. p74

Tableau 5 : Caractéristiques des amorces choisies pour les gènes de référence et les gènes ciblés. p76

- Chapitre 1 -

Table 1. Strains of *F. avenaceum* used in this study. p86

Figure 1. Mycelium aspect of the twelve *F. avenaceum* strains after 11 days of culture at 25°C in CM medium with a spore inoculation. p88

Figure 2. Box-plot of RGB values related to *F. avenaceum* mycelia after 11 days of culture on CM medium inoculated with spores. p90

Figure 3. RGB channel values obtained at day 11 for strains of *F. avenaceum* cultivated in CM culture medium. p91

Figure 4. Mycelium area (cm²) of *F. avenaceum* strains after 11 days of culture in PDA and CM media, with a spore (noted s) or plug (noted p) inoculation procedure. p92

Figure 5. Average surfaces (cm²) of mycelia of *F. avenaceum* strains after 11 days of cultures inoculated with A) plugs or B) spores in CM culture medium. p93

Figure 6. Kinetics of mycelial growth (cm²) from A) plugs or B) spores inoculated CM cultures of *F. avenaceum* strains. p94

Figure 7. Cumulative histogram of enniatins (A, A1, B and B1) produced (µg/g) after 11 days of culture in FDM medium for A) the 12 strains of *F. avenaceum* and B) a zoom on the low toxin-producing strains. p96

Figure 8. Fungal biomass quantified in 11-day-old FDM broths inoculated with the twelve *F. avenaceum* strains and incubated at 15°C, 20°C, 25°C and 30°C. p97

Figure 9. Enniatin amounts (sum of A, A1, B and B1 in µg/g) quantified in 11-day-old FDM broths inoculated with the twelve *F. avenaceum* strains and incubated at 15°C, 20°C, 25°C and 30°C. p98

Figure 10. Temperature effect (15°C, 20°C, 25°C or 30°C) on the production of enniatins by the different strains of *F. avenaceum* after 11 days of culture in FDM medium. p99

Figure 11. Fungal biomass quantified in 11-day-old FDM broths (buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH 7) inoculated with the twelve *F. avenaceum* strains. p100

Figure 12. Differences in fungal biomass according to pH conditions (FDM buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH 7) for each of the twelve strains after 11 days of culture. p101

Figure 13. Enniatin amounts (sum of A, A1, B and B1 in µg/g) quantified in 11-day-old FDM broths (buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH 7) inoculated with the twelve *F. avenaceum* strains. p102

Figure 14. Differences in enniatins amounts (sum of A, A1, B and B1 in µg/g) according to pH conditions (FDM buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH 7) for each of the twelve strains after 11 days of culture. p103

Figure 15. Score Plot of principal component 1 (Dim 1) and 2 (Dim 2) based on variables issued from the studies of colour and growth of mycelium, effect of pH and temperature on biomass and toxin production for the twelve different strains of *F. avenaceum*. p104

Figure 16. Loadings plot of principal component (PC) one and two of the principal component analysis. p105

- Chapitre 2 -

Figure 1. Effet du pH (en milieu FDM ou FDM tamponné à pH 4, pH 5, pH 6 et pH 7) sur la production d'enniatines (somme des enniatines A, A1, B et B1 en µg/g de biomasse sèche) par quatre souches de *F. avenaceum* (I494, I497, I612 et I874) après 11 jours de culture. p117

Figure 2. Alignement de séquences protéiques multiple de FavPac1 avec d'autres séquences homologues de PacC caractérisées. p118

Figure 3. Construction et validation des mutants *FavΔPac1*. p119

Tableau 1. Nombre de transformants obtenus puis validés par PCR et séquençage comme étant des mutants KO. p120

Figure 4. Comparaison de la sporulation moyenne entre WT et *ΔPac1*. p121

Figure 5. Etude de la croissance radiale des souches sauvages et des mutants de *F. avenaceum*. p122

Figure 6. Comparaison entre WT et *ΔPac1* A) de la biomasse fongique (en mg) et B) de la production d'enniatines (somme ENS A, A1, B et B1 en µg/g) après 12 jours de culture en milieu FDM ou FDM tamponné. p124

Tableau 2. Facteurs de régulation en Log2 obtenus pour les gènes *esyn1* et *kivr* de la souche *F. avenaceum* I612Δ2 par rapport à la souche sauvage I612 en milieu FDM pH 4 après 4 jours de culture. p126

Tableau 3. Synthèse des résultats obtenus. p126

Tableau 4. Liste des souches *F. avenaceum* utilisées pour l'étude. p131

Tableau 5. Liste des amorces utilisées pour la construction et la validation des mutants *ΔPac1* chez *F. avenaceum*. p133

- Chapitre 3 -

Figure 1 (article). Chemical structure of enniatins A, A1, B and B1. p143

Table 1 (article). Experimental half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of hydroxycinnamic acids against *F. avenaceum* I612 cultivated on solid Potato Dextrose Agar medium. p144

Table 2 (article). Effect of hydroxycinnamic acids at 0.5 mM on the production of enniatins by *F. avenaceum* I612 in *Fusarium* defined medium buffered at pH 3 and pH 6. p145

Figure 2 (article). Effect of (a, d) caffeic acid, (b, e) *p*-coumaric acid and (c, f) ferulic acid at 0.5 mM on the fungal biomass weights of six *F. avenaceum* strains in 10-day-old broths buffered at (a, b, c) pH 4 and at (d, e, f) pH 7. p146

Figure 3 (article). Effect of (a, d) caffeic acid, (b, e) *p*-coumaric acid and (c, f) ferulic acid at 0.5 mM on enniatins production by six *F. avenaceum* strains in 10-day-old broths buffered at (a, b, c) pH 4 and at (d, e, f) pH 7. p147

Figure 4 (article). Kinetics of (a) fungal growth and (b) enniatins production by *F. avenaceum* I612 in *Fusarium* defined media buffered at pH 4 (grey) and at pH 7 (black) supplemented (striped grey or striped black) or not (full grey or full black) with ferulic acid at 0.5 mM. p148

Table 3 (article). Log2 regulation factors obtained for *esyn1* and *kivr* genes in the ferulic acid supplemented culture relative to the control culture. p149

Figure 5 (article). Time-course of ferulic acid decline in *F. avenaceum* I612 cultures in *Fusarium* defined medium buffered at (a) pH 4 and at (b) pH 7. p150

Table 4 (article). Origin, isolation characteristics and toxigenic potential of the *F. avenaceum* strains used in this study. p152

Table 5 (article). Targeted genes and associated primers used to amplify cDNA by real-time PCR. p154

- Discussion et Perspectives -

Figure 1: Récapitulatif des résultats obtenus au cours de cette thèse. p164

Table des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
CE	Commission Européenne
CI50	Concentration Inhibitrice médiane
CM	Complete Medium
CMC	Carboxyméthylcellulose
DNAse	Désoxyribonucléase
DON	Déoxynivalénol
<i>efl</i> α	elongation factor 1-alpha
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
ENNs	Enniatines
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
<i>esyn1</i>	enniatin synthase
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDM	Fusarium Defined Medium
FHB	Fusarium Head Blight
<i>kivr</i>	Kétoisovalérate réductase
KO	knock-out
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
qPCR	PCR quantitative
qsp	quantité suffisante pour
QTL	Quantitative Trait Loci
RGB	Red Green Blue channels
RNA-seq	RNA-sequencing
rpb1/2	DNA-directed RNA polymerase II subunit rpb1/ rpb2
rpm	rotation par minute
TCTB	Trichothécène de type B
UPLC-DAD	Ultra High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector
WT	Wild type
ZEA	Zéaralénone

Avant-propos

Avant-propos

Les céréales sont à la base de l'alimentation humaine et animale, avec une production mondiale qui dépasse les 2,9 milliards de tonnes rien que pour l'année 2018 (www.fao.org/faostat/fr/#data). Cette production est cependant soumise à fluctuations du fait de nombreuses contraintes de nature anthropique (urbanisation, dégradation des sols, réglementation sur les intrants...) ou naturelle, liées aux conditions climatiques (sécheresses, inondations...) et/ou à des agents biologiques (insectes, rongeurs, microorganismes...). Parmi ces bioagresseurs, les champignons filamenteux sont un fléau majeur pour l'ensemble de la filière céréalière. Ils se développent au champ lorsque les conditions sont favorables (chaleur, humidité, lésions engendrées par des attaques d'insectes) ou lors du stockage lorsque les installations sont défectueuses (mauvaise ventilation, défaut d'étanchéité des silos...).

De nombreuses maladies fongiques menacent les cultures céréalières, et parmi ces dernières, la fusariose. Les champignons du genre *Fusarium* s'attaquent à diverses céréales (blé, avoine, orge...) et à différents stades de la plante, pouvant provoquer une fonte des semis, une nécrose des tiges (Fusariose du collet), ou un blanchiment des épis (Fusariose de l'épi souvent désignée par FHB pour *Fusarium* Head Blight). L'infection par ces champignons phytopathogènes engendre des diminutions significatives de rendements conduisant à des pertes économiques considérables. Certains d'entre eux sont, de plus, capables de produire des mycotoxines - métabolites secondaires fongiques toxiques pour l'homme et les animaux - qui contaminent les grains de céréales. La présence des mycotoxines qui est très difficile à contrôler car dépendant principalement des conditions environnementales, pose un véritable problème de sécurité sanitaire et de santé publique. Les mycotoxines produites par les espèces fusariennes appartiennent à différentes familles, qui peuvent être regroupées en deux classes : (i) les mycotoxines dites majeures auxquelles appartiennent les trichothécènes, la zéaralénone (ZEA) et les fumonisines et (ii) les mycotoxines dites émergentes. Il n'existe pas de définition précise du terme « mycotoxine émergente ». Il a été utilisé pour la première fois en 2008 par Jestoi pour désigner le groupe de mycotoxines constitué par les enniatines, la beauvericine, la moniliformine et la fusaproliférine. Depuis, son emploi a évolué et sous le terme de « mycotoxine émergente » se retrouve l'ensemble des mycotoxines pour lesquelles une augmentation de l'occurrence a été mise en évidence mais qui ne font pas l'objet d'une réglementation et ne sont pas prises en compte dans les plans officiels de surveillance (Gruber-Dorninger et al., 2017). Les mycotoxines majeures qui possèdent une toxicité aiguë avérée et une toxicité chronique fortement suspectée font l'objet d'une réglementation européenne

(AFSSA, 2009, règlement n°1126/2007). La connaissance sur les espèces productrices, les mécanismes de biosynthèse ainsi que sur les facteurs biotiques et abiotiques modulant leur accumulation dans les céréales est très étayée. Cette connaissance est beaucoup plus limitée en ce qui concerne les mycotoxines émergentes. Ceci est particulièrement vrai pour les enniatines qui, pourtant, sont très fréquemment retrouvées dans les récoltes céréalières et parfois à des niveaux très élevés. Si la cytotoxicité des enniatines, résultant majoritairement de leurs propriétés ionophoriques (les enniatines peuvent s'insérer dans la membrane cellulaire et forment des pores sélectifs pour les cations, ce qui modifie la perméabilité aux ions dans les membranes biologiques) a été démontrée vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires, très peu d'études *in vivo* se sont intéressées aux effets toxiques de ces molécules sur l'homme et l'animal. Les connaissances actuelles ne permettent pas d'écarter l'existence d'un risque pour les consommateurs de céréales et produits dérivés contaminés par des enniatines (ANSES - Saisine n°2015-SA-0187, 2019). Pour pouvoir permettre la définition d'outils de contrôle et de stratégies de gestion des niveaux de contamination en enniatines des récoltes céréalières, il s'avère alors essentiel d'approfondir les connaissances sur l'écophysiologie des espèces fusariennes productrices d'enniatines ainsi que sur les mécanismes de biosynthèse et leur régulation. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les recherches dont les résultats sont présentés dans ce manuscrit.

Introduction

I. La fusariose du blé

I.1. Origine et cause de la maladie

La fusariose des céréales est une maladie fongique qui affecte aussi bien les céréales à petits grains (blé, orge, avoine...) que le maïs (Ferrigo et al., 2016). Les épidémies de fusariose peuvent être causées par des espèces de champignons phytopathogènes appartenant à deux genres taxonomiques: *Fusarium* et *Microdochium* (Arseniuk et al., 1999; Glynn et al., 2005). La fusariose peut affecter différentes parties de la plante et des symptômes peuvent être visibles, des racines jusqu'aux épis. Ainsi, on distingue la fusariose des racines (Seedling Blight or root rot), de la fusariose du collet (Foot Rot) et de la fusariose des épis (*Fusarium* Head Blight / FHB) pour le blé et autres céréales à petits grains ; Gibberella Ear Rot et *Fusarium* Ear Rot pour le maïs (Parry et al., 1995). Notre travail s'intéresse plus particulièrement à la fusariose de l'épi chez les céréales à petits grains ou FHB.

Cette maladie sévit à travers le monde depuis la fin du XIX^{ème} siècle et était connue initialement sous le nom de Gale du blé. Elle a été décrite pour la première fois, en 1884 en Angleterre et depuis, elle n'a cessé de progresser (Stack, 2003; Goswami and Kistler, 2004). On assiste à une réelle prise de conscience à la fin du XX^{ème} siècle. De nouveaux foyers de contamination sont identifiés (Asie, Europe, Canada...), les pertes de rendements sont importantes notamment aux Etats-Unis, si bien que de nombreux consortia composés de scientifiques et de dirigeants de l'industrie agroalimentaire s'organisent pour tenter de résoudre ce fléau agricole mondial (Stack, 1999). C'est de 1998 à 2000 que des taux record de contaminations sont enregistrés dans le Midwest des USA causant des pertes estimées à plus de 2,7 milliards de dollars (Windels, 2000). Selon le CIMMYT (The International Maize and Wheat Improvement Center), le FHB est un facteur majeur limitant la production de blé dans de nombreuses régions du monde (Stack, 1999). Dans la revue de Dean et al., 2012, l'un des agents majeurs du FHB, *Fusarium graminearum*, figure au cinquième rang des champignons phytopathogènes les plus préoccupants au niveau mondial.

La fusariose de l'épi cause l'altération de la qualité des grains puisque ces grains fusariés sont d'aspects chétifs, atrophiés, décolorés et crayeux (un duvet blanc-rosé peut les recouvrir) (Wegulo, 2012) (Figure 1). La fusariose affecte la qualité technologique des grains, ce qui se traduit par des difficultés lors des procédés de transformation des céréales (mouture, panification, malterie...) (Pirgozliev et al., 2003; Schwarz, 2017). L'analyse de la composition de grains fusariés a montré que les constituants majeurs, à savoir l'amidon et les protéines de réserves, présentaient des concentrations inférieures à celles de grains sains (Masci et al., 2015) ; les champignons responsables de la fusariose puisent dans les ressources glucidiques du grain de blé pour assurer leur développement. Un autre point critique résulte du fait que les grains infectés peuvent contenir des mycotoxines - métabolites secondaires fongiques toxiques pour l'homme et l'animal – qui sont produites par certaines espèces associées à la fusariose des épis. Les conséquences économiques et sanitaires qui résultent de cette contamination sont majeures et ont incité une large communauté scientifique à s'intéresser aux agents responsables du FHB.

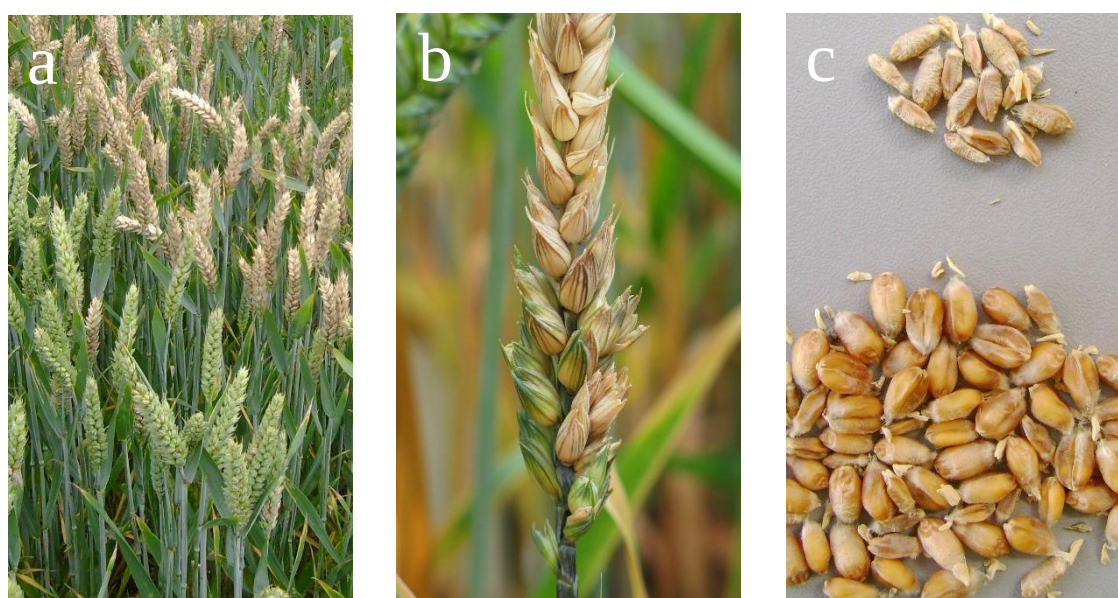


Figure 1 : Symptômes caractéristiques de la fusariose de l'épi sur blé : a) blanchissement des épillets, b) extrémité supérieure de l'épi blanchie et c) grains fusariés décolorés (en haut) par rapport aux grains sains (en bas) (INRAe).

1.2. Les principales espèces fongiques responsables du FHB

Parmi les espèces fongiques à l'origine du FHB, on retrouve des *Fusarium spp.* et des *Microdochium spp.* Seules les espèces du genre *Fusarium* ont été décrites comme productrices de mycotoxines. Dans la classification des champignons, le genre *Fusarium* se retrouve au sein du phylum des *Ascomycota* qui, lors de la reproduction sexuée, produisent des spores contenues dans une structure particulière appelée asque. Il appartient au subphylum des *Pezizomycotina* et à la classe des *Sordariomycetes* (Figure 2).

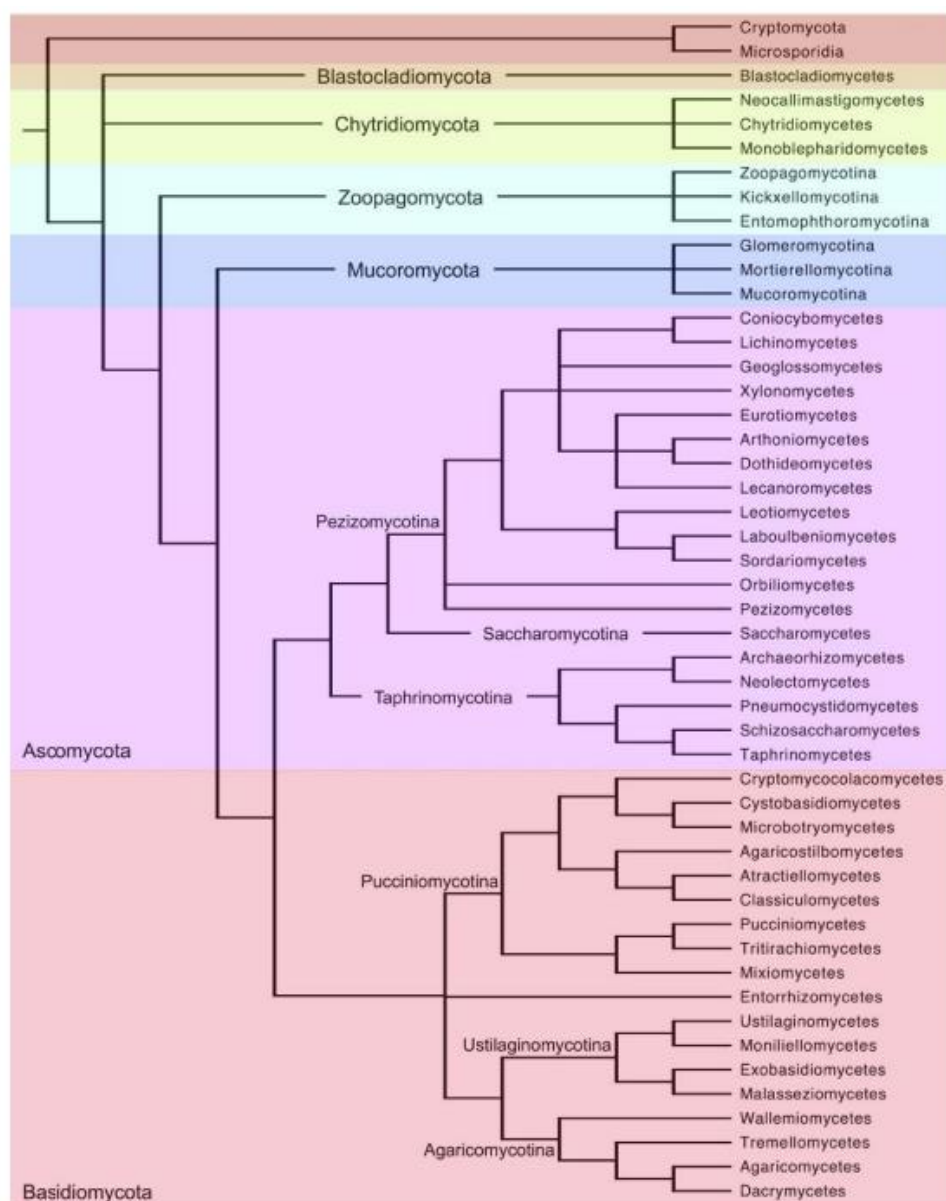


Figure 2 : Cladogramme du règne fongique (Spatafora et al., 2017).

Plus de quinze espèces différentes de *Fusarium* peuvent contaminer les cultures céréalières ; ces espèces qui possèdent des capacités différentes à produire des mycotoxines peuvent coexister dans une parcelle, un épi voire même un grain (Smith et al., 2016).

Au niveau mondial, les sept espèces de *Fusarium* les plus fréquemment retrouvées sont : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. proliferatum* (Figure 3) (Parry et al., 1995; Bottalico and Perrone, 2002; Ferrigo et al., 2016). *F. graminearum* est l'espèce décrite comme la plus répandue aussi bien sur les cultures de blé que d'orge et la principale responsable de la contamination des récoltes par le déoxynivalénol (DON) (Goswami and Kistler, 2004). En ce qui concerne le maïs, *F. graminearum* est l'agent majeur responsable du *Gibberella ear rot* alors que *F. verticillioides* et *F. proliferatum*, productrices de fumonisines, sont les principaux agents responsables du *Fusarium ear rot* (Marín et al., 2010; Mohd Zainudin et al., 2017).

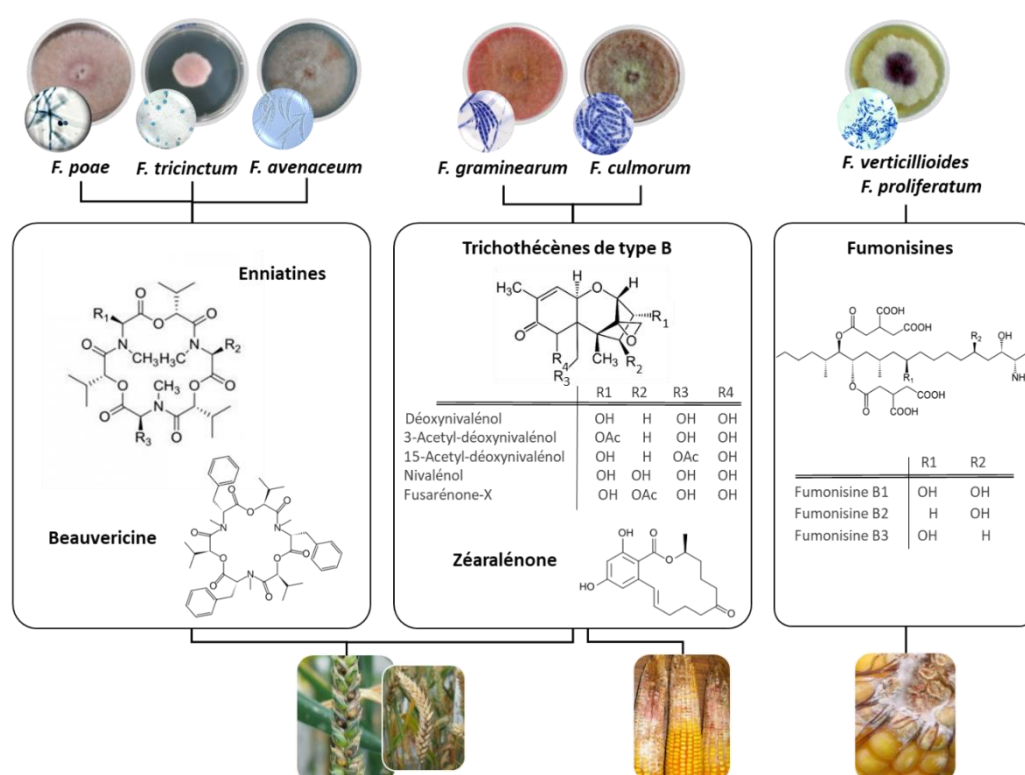


Figure 3 : Principales mycotoxines produites par les espèces fongiques du genre *Fusarium* (INRAe-MycSA).

En France, une analyse des espèces responsables de la fusariose de l'épi chez le blé a été réalisée dans le cadre du projet ANR DON&Co (ANR-10-CESA-0012). Les ADN de sept espèces du genre *Fusarium* et de deux espèces du genre *Microdochium* ont été quantifiés dans 300 échantillons de grains issus des récoltes 2008, 2009 et 2010 (étude réalisée au sein de l'UR MycSA, résultats non publiés). La Figure 4 décrit la répartition globale des ADN quantifiés dans les grains et met en évidence l'abondance de l'espèce *F. graminearum*, suivie de *M. nivale* et *M. majus*. La Figure 5 représente le pourcentage de grains infectés pour chacune des espèces étudiées.

Si cette représentation permet de confirmer la prévalence de *F. graminearum*, elle met aussi en évidence la fréquence élevée (entre 70 et 80%) de contamination des grains par *F. avenaceum* et *F. tricinctum*, deux espèces productrices de mycotoxines émergentes telles que les enniatines et la beauvéricine. Une étude similaire menée en Allemagne pour les récoltes de blé d'hiver 2013-2017 par Birr et al., 2020 et ses collaborateurs a montré que *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* et *F. poae* étaient les quatre espèces les plus répandues (> 80% de grains infectés), suivies de *F. tricinctum* et *F. langsethiae*. Dans cette étude, la présence de *F. culmorum* se révèle être plus importante par rapport à celle observée en France. Cette prévalence peut s'expliquer par la préférence de cette espèce pour les climats frais et humides alors que des climats tempérés favorisent le développement de *F. graminearum* (Doohan et al., 2003).

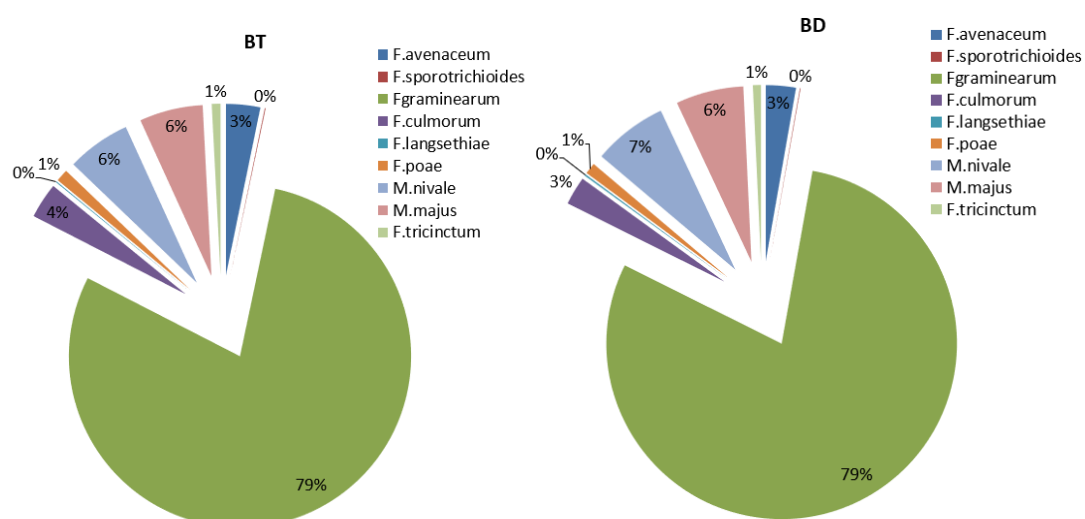


Figure 4 : Principales espèces de *Fusarium* responsables du FHB dans les grains de blé tendre (BT) et de blé dur (BD) récoltés sur trois années (2007, 2008 et 2009) en France – Les données correspondent aux rapports des quantités d'ADN de l'espèce cible sur la somme des quantités d'ADN fongique pour l'ensemble des espèces considérées (INRAe-MycSA – Projet ANR DON&Co).

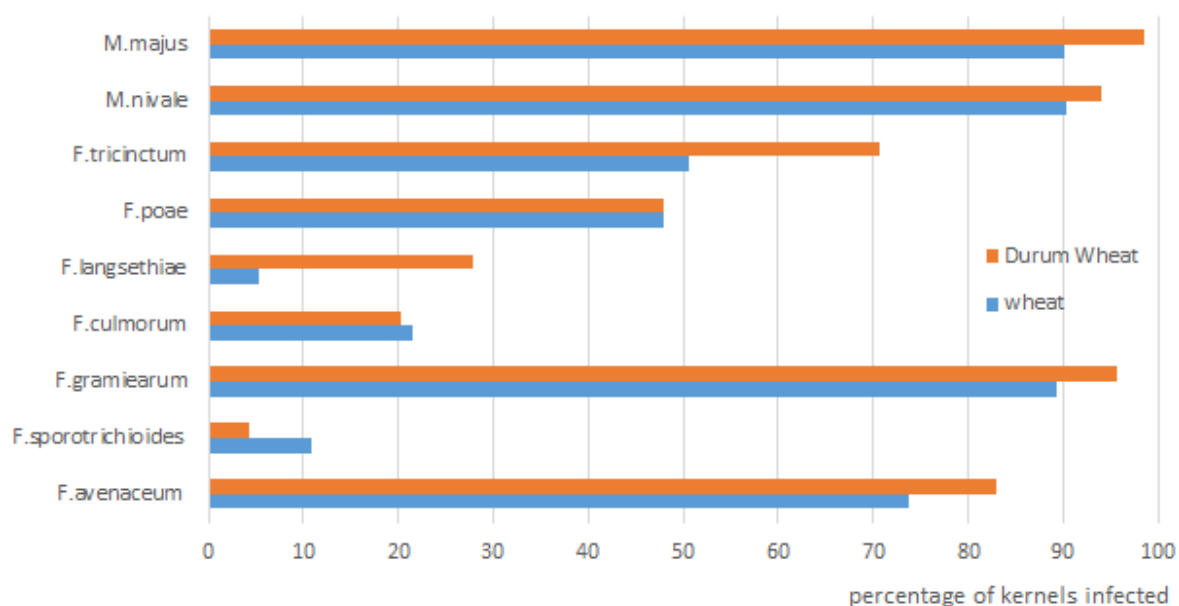


Figure 5 : Fréquence d'infection par différentes espèces fusariennes des grains de blé tendre et dur, récoltés sur trois années (2007, 2008 et 2009) en France (INRAe-MycSA– Projet ANR DON&Co).

En effet la composition du mélange d'espèces fusariennes contaminant les cultures dépend fortement des conditions agro-environnementales (facteurs pédoclimatiques mais aussi pratiques culturales). Les pratiques d'assolement et de gestion des résidus ainsi que le choix variétal sont autant de facteurs qui vont influencer les équilibres entre espèces toxigènes. Moins nombreuses sont cependant les études qui se sont intéressées à l'impact d'un système de culture sur la composition du complexe fusarien.

On peut citer les travaux de Bernhoft et al., 2010 qui suggèrent une présence moins importante de *F. tricinctum*, *F. culmorum* et *F. langsethiae* dans des grains de blés, cultivés en Norvège, issus d'agriculture biologique comparé à des grains issus de systèmes conventionnels. Plus récemment, Karlsson et al., 2017 ont utilisé une approche « amplicon sequencing » pour comparer la flore de grains de blés, cultivés en Suède, issus de cultures caractérisées par différents niveaux d'intrants. Leurs résultats indiquent que l'apport de niveaux élevés d'azote combiné à l'utilisation de pesticides favoriserait l'occurrence de *F. tricinctum* contrairement à *F. graminearum*.

I.3. Les mycotoxines de *Fusarium* : réglementation et conséquences toxicologiques

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques pour l'homme et les animaux produites par des champignons. Le nombre de mycotoxines caractérisées à ce jour oscille entre 300 et 400. Une trentaine de mycotoxines est actuellement considérée comme d'importance mondiale du fait de leur toxicité avérée ainsi que des pertes économiques considérables que leur présence engendre (diminution de rendements liée au FHB, déclassement des récoltes, diminution de la productivité animale, effet sur les échanges commerciaux, coûts des analyses, coûts indirects liés à leur effet sur la santé humaine...) (AFSSA, 2009). Parmi ces mycotoxines, on retrouve les aflatoxines, les ochratoxines, la patuline, les alcaloïdes d'ergot ainsi que certaines mycotoxines de *Fusarium* ou fusariotoxines qui sont particulièrement préoccupantes en Europe dans les filières céréalières. Les espèces de *Fusarium* produisent une large gamme de mycotoxines appartenant à différentes familles dont les trichothécènes (de type A ou B), la fumonisine, la zéaralénone, les enniatines, la beauvéricine, la moniliformine et la fusarine C (Figure 3). Ces mycotoxines se caractérisent par différentes structures chimiques. Les trichothécènes sont des sesquiterpènes tricycliques. Ce squelette tricyclique est formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à 6 chaînons oxygénés et 4 groupements méthyles. La présence d'un pont époxyde entre les carbones C12 et C13 leur confère leur toxicité. Les trichothécènes A et B sont les plus fréquemment retrouvés. La différence entre trichothécènes A et B résulte de la présence (trichothécènes B) ou non (trichothécènes A) d'une fonction cétone en C8. Les fumonisines et zéaralénone dérivent de la voie des polyacétates. La structure de base des fumonisines est une longue chaîne hydrocarbonée hydroxylée, comportant des groupes méthyle et amine. Deux groupes hydroxyles sont estérifiés par des acides tricarballoyliques. La zéaralénone, a été identifiée comme une lactone de l'acide résorcylique.

La beauvericine et les enniatines sont des hexadepsipeptides cycliques. Structurellement similaires, la beauvéricine et les enniatines diffèrent de par les résidus aminés (R1, R2 et R3) présents dans leur composition : des résidus N-méthyl-phénylalanines pour la beauvéricine, des résidus N-méthyl-valine et N-méthyl-isoleucine pour les enniatines. Les trichothécènes et les fumonisines sont des mycotoxines majeures qui ont fait/ont l'objet de nombreuses études (espèces productrices, voie de biosynthèse, mécanisme de régulation, facteurs déterminant pour leur occurrence, toxicité...) tandis que peu de données sont disponibles pour les autres toxines, désignées sous le terme de « mycotoxines émergentes » (Jestoi, 2008). D'ailleurs, ces dernières, même si elles sont activement surveillées par l'EFSA (EFSA, 2014; Maranghi et al., 2018), ne font l'objet ni d'une réglementation, ni d'une recommandation auprès de la Commission Européenne. Pour les mycotoxines majeures, des teneurs maximales dans certaines denrées alimentaires (fruits à coques, lait, café, pâtes...) (Tableau 1) ont été définies (Règlement CE 1126/2007). Les seuils réglementaires sont établis selon plusieurs critères, prenant en compte les données d'occurrence et de toxicité des molécules (AFSSA, 2009). Prenons l'exemple du pain, la teneur maximale autorisée en déoxynivalénol est fixée à 500 µg/kg (Règlement CE 1126/2007). Si on s'intéresse au maïs (brut), les limites réglementaires pour le déoxynivalénol, la zéaralénone et les fumonisines sont respectivement de 1750 µg/kg, 350 µg/kg et 4000 µg/kg, des différences qui reflètent différents niveaux de toxicité.

La consommation de produits fusariés peut être associée à une toxicité aiguë (exposition de courte durée à de fortes doses de toxines) ou chronique (exposition répétée à de faibles doses de toxines) vis-à-vis de l'homme ou des animaux. La toxicité chronique est particulièrement redoutée (Agriopoulou et al., 2020) : les mycotoxines de *Fusarium* résistent aux procédés de transformation agroalimentaire et sont présentes, souvent à des niveaux très faibles, dans la plupart des produits céréaliers (pain, pâtes, bière...) qui sont consommés très régulièrement. Les principales mycotoxines peuvent être classées selon leurs effets toxiques qui sont de nature variée (Tableau 2). Ainsi la patuline est décrite comme immunotoxique (Puel et al., 2010) et l'aflatoxine comme génotoxique (Sriwattanapong et al., 2017). Parmi les toxines fusariennes, la toxine T-2 est responsable de l'aleucie toxique alimentaire qui se manifeste par des vomissements, une inflammation du tube digestif et peut conduire à la mort du consommateur si de très fortes doses sont ingérées (Galtier et al., 2006). L'aleucie toxique alimentaire a provoqué des dommages considérables en URSS dans les années 1945 suite à une mauvaise conservation des grains sous la neige. Chez l'animal, des modifications hématologiques ainsi que des effets reprotoxiques pour les toxines T-2 et HT-2 ont été décrits, notamment chez le porc (Rafai et al., 1995; Li et al., 2011).

Tableau 1 : Teneurs maximales autorisées en mycotoxines dans les denrées destinées à l'alimentation humaine (extrait règlement 1126/2007/CE).

Produits	Mycotoxines	Valeur réglementaire (µg/kg)
Arachides, fruits à coque, fruits séchés et produits dérivés de leur transformation destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	Aflatoxine B1	2
	Aflatoxines B1 + B2 + G1 + G2	4
Toutes les céréales et produits dérivés des céréales destinés à la consommation humaine directe (adultes)	Aflatoxine B1	2
	Aflatoxines B1 + B2 + G1 + G2	4
Lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits laitiers	Aflatoxine M1	0,05
Céréales brutes	Ochratoxine A	5
Grains de café torréfié et café torréfié moulu	Ochratoxine A	5
Café soluble	Ochratoxine A	5
Tous les produits dérivés de céréales destinés à la consommation humaine directe	Ochratoxine A	2
Vins, boissons aromatisées à base de vin, jus de raisin	Ochratoxine A	2
Jus de fruits, jus de fruits concentrés reconstitués et nectars	Patuline	2
Céréales brutes autres que le blé dur, avoine et maïs	Déoxynivalénol	1250
Blé dur et avoine bruts	Déoxynivalénol	1750
Maïs brut	Déoxynivalénol	1750
Pains	Déoxynivalénol	500
Pâtes (sèches)	Déoxynivalénol	750
Céréales brutes autres que le maïs	Zéaralénone	100
Maïs brut	Zéaralénone	350
	Fumonisines B1 + B2	4000
Céréales "petit-déjeuner" à base de maïs	Fumonisines B1 + B2	800
Alimentation à base de maïs pour nourrissons	Fumonisines B1 + B2	200

Les experts FAO/OMS ont fixé une dose journalière tolérable (DJT) provisoire de 0,06 µg/kg de poids corporel et par jour pour ces toxines (Règlement CE 856/2005). En ce qui concerne le déoxynivalénol (DON), un trichothécène de type B (TCTB), c'est la mycotoxine la plus fréquemment retrouvée dans les cultures de blé en Europe. Des effets immunotoxiques induits par le DON ont été rapportés (AFSSA, 2009). Les TCTB induisent des vomissements chez le porc et le DON a souvent été désignée sous le terme de vomitoxine (Vesonder et al., 1973). La zéaralénone, qui est un analogue d'œstrogène (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007), est responsable d'effets reprotoxiques.

Tableau 2 : Effets toxiques des principales mycotoxines (extrait AFFSA, 2009).

Toxines	Effets avérés ou suspectés
Aflatoxine (B1 et M1)	Cancérogène, Génotoxique, Immunotoxique et Hépatotoxique
Ochratoxine A	Cancérogène, Génotoxique, Immunotoxique et Néphrotoxicité
Patuline	Neurotoxicité et Mutagenèse <i>in vitro</i>
Trichothécènes (groupe A et B)	Immunotoxique, Hépatotoxicité et Toxicité cutanée
Zéaralénone	Estrogénique, Fertilité et Reproduction
Fumonisine B	Cancérogène, Génotoxique, Immunotoxique, Neurotoxique et Hépatotoxique

Les données sur la toxicité des toxines émergentes restent encore beaucoup plus incomplètes, majoritairement basées sur des études *in vitro*. Même si aucun évènement de mycotoxicose liée à ces toxines n'a été rapporté jusqu'à présent, l'EFSA souligne que le risque de conséquences toxicologiques pour le consommateur ne peut être totalement écartée (EFSA, 2014). En ce qui concerne les enniatines, une hépatotoxicité significative, (peu durable dans le temps comparé à l'hépatotoxicité de l'aflatoxine B1), a été mise en évidence après 24h exposition de lignées cellulaires hépatiques à l'enniatine B (Svingen et al., 2017). Des effets sur le système immunitaire, notamment lors de la maturation des cellules de dendrites et de la différenciation des monocytes en macrophages, ont aussi été décrits par plusieurs équipes (Gammelsrud et al., 2012; Ficheux et al., 2013). Le potentiel génotoxique des enniatines a fait l'objet de plusieurs études et a conduit à des résultats parfois contradictoires. Des premiers résultats ont conclu à l'absence d'effet génotoxique (Behm et al., 2009; Gammelsrud et al., 2012) alors que, quelques années plus tard, dans le dernier rapport de l'EFSA (Maranghi et al., 2018), un effet génotoxique est décrit : chez des souris exposées à de fortes concentrations d'enniatines B (administrées à hauteur de 100 à 200 mg/kg/jour par voie orale), une altération de l'ADN a été observée au niveau des cellules de la moelle épinière et du foie. Parmi les études en conditions *in vivo* qui se sont intéressées à la toxicité des enniatines, on peut citer plusieurs travaux sur les porcs et les poulets qui n'ont montré aucun effet indésirable (CODA-CERVA, 2011; Devreese et al., 2013, 2014). La métabolisation des enniatines après ingestion a été le sujet de plusieurs publications ; si les métabolites de dégradation restent à être caractérisés, ces derniers ne semblent pas posséder de toxicité avérée (Ivanova et al., 2014; Fraeyman et al., 2016; Rodríguez-Carrasco et al., 2016). Un autre sujet d'enjeu majeur associé aux enniatines concerne leur potentielle capacité à moduler les effets toxiques d'autres mycotoxines en cas d'exposition à des mélanges de mycotoxines. En effet une denrée alimentaire n'est que très rarement contaminée par une seule mycotoxine, l'exposition des consommateurs à des mélanges est très fréquente (Smith et al., 2016).

Différentes interactions entre effets toxiques sont possibles : additif, antagoniste ou synergique ; la nature de ces interactions peut varier selon les concentrations en toxines (Prosperini et al., 2014). L'existence de telles interactions dans des mélanges associant les enniatines et des trichothécènes a été reportée dans la littérature (Kolf-Clauw et al., 2013; Fernández-Blanco et al., 2016).

Les données toxicologiques associées aux enniatines restent cependant trop incomplètes pour pouvoir statuer sur le risque potentiel associé à ces mycotoxines. A ce jour, aucune limite/teneur maximale légale n'est fixée pour les enniatines présentes dans l'alimentation humaine et animale.

Pour limiter les conséquences toxicologiques de la présence de mycotoxines dans les céréales et produits dérivés, il est essentiel de limiter l'exposition des consommateurs, humains ou animaux. Prévenir l'infection et le développement du champignon (au champ ou dans les lieux de stockage) nécessite une connaissance approfondie sur l'écophysiologie des champignons producteurs ainsi que sur les facteurs biotiques et abiotiques qui modulent la production de mycotoxines.

I.4. Cycle infectieux des espèces du complexe FHB

La lutte contre la fusariose de l'épi doit passer par une meilleure compréhension du cycle de vie des espèces responsables. Cependant à ce jour, seul le cycle de quelques-uns de ces phytopathogènes a été étudié dont *F. graminearum*, l'un des modèles sur blé (Trail, 2009) (Figure 6). Peu de données bibliographiques existent sur les espèces productrices d'enniatices, comme *F. avenaceum* qui est le modèle central de ce travail de doctorat.

Tout au long du cycle cultural et en interculture, les macroconidies, les périthèces et les chlamydospores (spores de multiplication végétative) de *F. graminearum* persistent dans le sol sur les résidus du précédent cultural. Une étude récente (Cobo-Díaz et al., 2019) a montré que *F. graminearum* (42%) et *F. avenaceum* (39%) étaient les espèces dominantes dans les résidus de maïs. Le champignon adopte ainsi un mode de vie dit saprophyte lorsque les conditions sont défavorables. Les chlamydospores, sont des structures particulières et rares qui correspondent à la forme asexuée ou anamorphe de *F. graminearum* (Arsan and Eraky Amal, 2011). *F. graminearum* serait la seule espèce homothallique parmi les *Fusarium*, qui peut produire des spores sexuées sans partenaire à partir d'un seul thalle, hyphe ou bien, d'une seule spore (Kerényi et al., 2004; O'Donnell et al., 2004).

En ce qui concerne *F. avenaceum*, même si aucune structure sexuée n'a été reportée jusqu'à présent, la présence de gènes *MAT* fonctionnels suggère l'existence d'un cycle de reproduction sexuée cryptique ; la rareté de ces potentiels structures sexuées expliquerait qu'elles n'aient pas été mises en évidence jusqu'à présent (Kerényi et al., 2004).

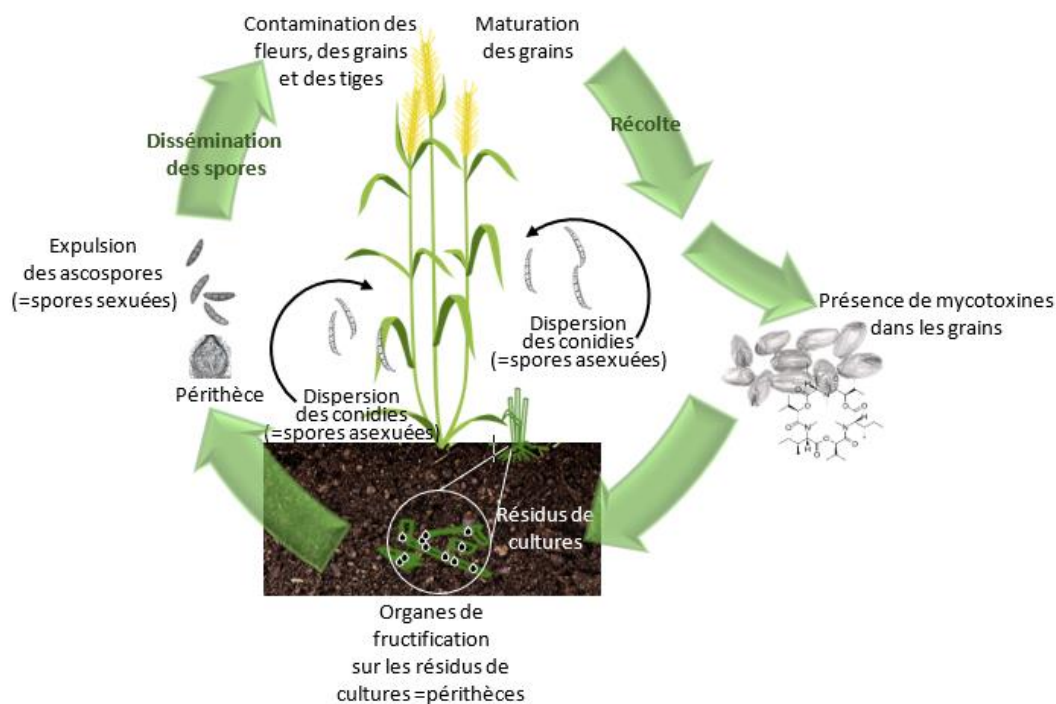


Figure 6 : Cycle de vie de *F. graminearum* lors de la fusariose du blé (INRAe-MycSA).

Au champ, les résidus de culture ou les semences infectées servent d'inoculum primaire pour l'infection des cultures qui seront semées au printemps. Les périthèces qui ont survécu à la période hivernale libèrent les ascospores et/ou conidies qui sont disséminés par l'air, l'eau (effet « splashing »), le vent ou les insectes pour ensuite, être acheminés jusqu'aux épis de blé en floraison (ou épiaison) (Caron et al., 2007). La colonisation des fleurs s'initie par la germination des ascospores en surface, sur les anthères et le pollen puis par la pénétration des filaments mycéliens (ou hyphes) dans la plante *via* les stomates ou ouvertures naturelles (lésions des anthères, base de l'épillet ou du lemme...). Le processus d'infection asymptomatique est alors enclenché, les hyphes pénètrent au niveau de la glume et se propagent jusqu'au rachis avant de se répandre dans la tige pour infecter les autres épillets adjacents (Walter et al., 2010). Une fois dans la plante, *F. graminearum* se comporte comme un hémibiotrophe (Kazan et al., 2012). Au fur et à mesure, les tissus blanchissent (xylème obstrué) et les premières nécroses apparaissent au niveau des glumes signifiant la présence du champignon ; son mode de vie est ici nécrotrophe lui permettant d'accumuler des réserves (nutriments, lipides). A la sortie de l'été, le champignon *F. graminearum* est sous sa forme sexuée ou téléomorphe (Trail, 2009).

Il est en capacité de former des périthèces (organe de fructification contenant des asques) et de produire des ascospores (spore contenue dans un asque) quand les conditions de température (15°C-30°C) et d'hygrométrie (> 80%) favorisent leur développement (Gilbert et al., 2008). Au cours de l'infection, *F. graminearum* produit ses mycotoxines dont certaines telles que le DON, sont considérées comme des facteurs d'agressivité sur blé, contribuant à la nécrose des tissus et permettant la progression du champignon dans les organes (Desjardins et al., 1996). Le rôle des enniatines en tant que facteur de virulence n'est que très peu documenté dans la littérature. Les enniatines sont également décrites comme phytotoxiques. L'application de ces depsipeptides cycliques sur des tubercules de pomme de terre (Herrmann et al., 1996) ou sur des feuilles de tomates (Gäumann et al., 1960) induisent des nécroses. Une diminution du développement racinaire des semences de blé exposées aux enniatines a aussi été reportée (Burmeister and Plattner, 1987). Les travaux récents de Eranthodi et al., 2020, basés sur l'utilisation de souches *F. avenaceum* mutantes qui ont perdu leur capacité à produire des enniatines (délétées pour le gène *esyn1*), suggèrent que ces toxines contribueraient à l'apparition de symptômes sur pomme de terre mais n'interviendraient pas dans l'apparition des symptômes sur blé dur ou pois.

I.5. Moyens de contrôle de la contamination des céréales par les mycotoxines de *Fusarium*

Maîtriser la fusariose du blé est un enjeu majeur pour les acteurs des filières céréalières, aussi bien sur le point de vue économique que sanitaire. Les stratégies mises en œuvre sont basées sur des leviers visant à limiter l'apparition et la propagation de cette maladie cryptogamique au champ. Ces stratégies ont comme principale cible *F. graminearum*. L'objectif est triple : (i) réduire l'inoculum de *Fusarium* présent dans les sols des champs de culture, (ii) prévenir l'infection des céréales et limiter la propagation du champignon et (iii) limiter la présence de mycotoxines.

Il est important de rappeler que le climat joue un rôle prépondérant dans le développement de la fusariose. Un climat tempéré (~25°C) et humide au moment de la floraison des céréales favorise l'installation puis l'infection par le pathogène fongique (Parry et al., 1995). Lorsque l'année climatique est favorable à la fusariose, les stratégies actuellement disponibles pour les agriculteurs permettent de réduire les niveaux de contamination mais ne garantissent pas le respect des seuils réglementaires fixés par l'Union Européenne.

Plusieurs leviers agronomiques tels que le précédent cultural, la densité de semis, la rotation des cultures et le travail du sol permettent de réduire la densité d'inoculum primaire à la parcelle. Ainsi, le labour associé au broyage, qui conduit à l'enfouissement des résidus et favorise la décomposition organique, est une stratégie préconisée pour limiter le risque d'infection (Pereyra and Dill-Macky, 2008; Wegulo et al., 2015). La culture de soja, de pois ou de colza, qui sont des plantes non hôtes, est conseillée comme précédent cultural, leur introduction dans les schémas d'assolement permettrait de réduire le risque de fusariose (Schirdewahn et al., 2016). En revanche, l'infestation par *F. graminearum* est accrue lorsque le précédent cultural est un précédent dit sensible, le maïs ou une autre céréale à petits grains (Schöneberg et al., 2016). Une étude publiée récemment par Vogelgsang et al., 2019 a montré un lien étroit entre les pratiques agronomiques, l'incidence de la fusariose et l'accumulation des mycotoxines dans des récoltes de maïs cultivés en Suisse. Lorsque l'on combine, le maïs comme précédent cultural avec un travail du sol réduit, les teneurs en DON et ZEA produites par *F. graminearum* étaient plus élevées à la différence des champs de maïs labourés ou avec le pois ou le soja comme précédent cultural. La date de semis des grains de céréales peut également contribuer à atténuer les symptômes. Décaler la date de semis peut en effet être un levier important pour éviter que la période de floraison des cultures (période de sensibilité maximale à l'infection) ne corresponde au pic de disponibilité de l'inoculum dans une parcelle. Il a ainsi été montré que des semis précoces d'orge (cultivar à épiaison hâtif) donnaient à la fois de meilleur rendement et des niveaux plus faibles de contamination en DON comparés à des semis tardifs (Choo et al., 2014). Le rôle de la date de semis sur le risque fusariose a cependant été contredit dans d'autres études (Gorczyca et al., 2018).

Le choix variétal et notamment le développement de variétés végétales résistantes est une approche prometteuse pour limiter la maladie et les niveaux de contamination en mycotoxines. Ce levier a fait l'objet de développements importants pour ce qui est de la résistance à *F. graminearum* et l'accumulation de DON. Arvalis – Institut du végétal met à disposition des agriculteurs une grille d'évaluation du risque d'accumulation du DON dans les récoltes de blé tendre pour les variétés inscrites au Catalogue Officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France (<https://www.arvalis-infos.fr/qualite-sanitaire-des-cereales-comment-gerer-le-risque-don-facteurs-de-risque-et-grilles-d-evaluation--@/view-18629-arvarticle.html#3>).

La résistance à *F. graminearum* chez le blé se décline autour de cinq composantes. La composante de type I correspond à la résistance à l'infection initiale, la résistance de type II à la résistance à la propagation du pathogène dans les tissus végétaux, la résistance de type III est la résistance à l'infection du grain, celle de type IV correspond à la tolérance de l'hôte à la diminution de rendement et enfin la résistance de type V regroupe les mécanismes de résistance à l'accumulation de déoxynivalénol (Ferrigo et al., 2016). Sur le plan génétique, la résistance à la fusariose est classiquement décrite comme un caractère quantitatif affecté par de nombreux gènes ayant des effets additifs. L'interaction forte entre certains de ces loci et l'environnement rend difficile la mise en place de programmes de sélection. Chez le blé tendre, les études génétiques ont mis en évidence de très nombreuses zones chromosomiques (QTL pour Quantitative Trait Locus) impliquées dans la résistance. Ainsi plus de cent QTL présents sur l'ensemble des chromosomes ont été identifiées (Dhokane et al., 2016; Steiner et al., 2017). Parmi ces QTL, certains ayant des effets forts sur la résistance ont été caractérisés : il s'agit de régions situées sur les chromosomes 5AL et 4BS pour la résistance à l'infection primaire (type I), sur les chromosomes 3BS, 6BS, et 2DL pour la résistance à la progression du champignon dans l'épi (type II). On peut citer l'exemple du QTL *Fhb1* détecté sur le chromosome 3BS qui a été montré comme impliqué dans la résistance de type II puisqu'il est lié à la conversion du DON en DON-3-O-glycoside (un composé moins phytotoxique) sous l'action d'une DON-glucosyltransférase (Lemmens et al., 2005; Buerstmayr et al., 2009). Les stratégies de sélection des plantes sont parmi les approches les plus prometteuses pour le futur. Cependant en dépit des avancées, la progression des programmes de sélection reste limitée du fait du caractère polygénique de la résistance (cumul de QTL à effet faible) et des interactions fortes avec l'environnement. C'est pourquoi une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance des plantes reste nécessaire pour apporter de nouvelles informations pertinentes pour permettre l'amélioration de ces programmes.

Plusieurs études se sont aussi intéressées également à la composante chimique de la résistance à la Fusariose. Le plus souvent basées sur une comparaison des compositions métaboliques de grains de génotypes présentant des sensibilités différentes à la fusariose, inoculés ou non par l'agent pathogène, ces études ont mis en évidence une grande diversité de familles chimiques qui pourraient contribuer aux mécanismes de résistance (pour revue, Gauthier et al., 2015).

Parmi ces familles, les phénylpropanoïdes et en particulier les flavonoïdes, les acides phénoliques et leurs dérivés sont décrits comme des acteurs majeurs de la résistance (Treutter, 2006; Bollina et al., 2011; Gauthier et al., 2015; Atanasova-Penichon et al., 2016; Bilska et al., 2018). Le rôle de ces composés s'explique par leur participation au renforcement de parois cellulaires (dépôt de lignine) (Vanholme et al., 2010), leurs propriétés antioxydantes et donc leur capacité à piéger les espèces réactives d'oxygène (Agati, 2012; Zhang et al., 2015; Bilska et al., 2018), leur activité antimicrobienne (Gunnaiah and Kushalappa, 2014), l'induction des voies de signalisation de défense (Gottwald et al., 2012). En ce qui concerne les flavonoïdes, une synthèse *de novo* de ces composés est fréquemment mise en évidence lors des réactions de défense des plantes (Al Aboody and Mickymaray, 2020). Pour exemple, chez le blé, l'infection par *F. culmorum* conduit à des quantités importantes de flavonols et de flavanones (Buško et al., 2014). Les flavonoïdes interviendraient aussi dans la résistance mécanique des grains. Ce mécanisme a été mis en évidence chez le maïs lors de l'infection par *F. verticillioides* (Pilu et al., 2011; Venturini et al., 2015).

Les acides phénoliques, présents en quantités importantes dans les grains, sont certainement les composés phénoliques les plus étudiés pour leur implication dans les mécanismes de défense des plantes (Gauthier et al., 2015). Les grains de maïs sont les plus riches en acides phénoliques, suivis du blé, de l'avoine et du riz (Călinoiu and Vodnar, 2018). Toutefois la composition et les proportions varient selon la céréale (voir entre cultivars) étudiée et le stade de maturité (Nayak et al., 2015; Călinoiu and Vodnar, 2018). L'acide férulique est le composé majoritaire chez la majorité des céréales (blé, orge et maïs) avec des quantités variables : 448 µg/g pour le blé, 568 µg/g pour l'orge de printemps ou 1748 µg/g pour le maïs (Horvat et al., 2020). En plus petites proportions, les acides phénoliques retrouvés sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque et l'acide caféique. Plusieurs études ont suggéré que la résistance des céréales au FHB pourrait être liée à la teneur des grains en acides phénoliques (Siranidou et al., 2002; Eggert et al., 2010; Gauthier et al., 2016). En plus de leur rôle en tant que composés structurels de la paroi qui constitue une barrière mécanique face au pathogène fongique (Boutigny et al., 2008; Fernandez-Orozco et al., 2010), les acides phénoliques possèdent des propriétés antifongiques et sont capables d'inhiber la production de mycotoxines par *Fusarium spp.* (Atanasova-Penichon et al., 2016).

La lutte chimique a longtemps été prônée au détriment de l'environnement et de la santé des applicateurs et consommateurs. En ce qui concerne la fusariose, les fongicides peuvent avoir une efficacité préventive, parfois limitée du fait d'une application délicate : application à floraison avant infection par les *Fusarium spp.*, choix de la matière active qui peut parfois conduire à des résultats contraires à ceux espérés.

Ainsi, une étude publiée par Covarelli et al., 2004 a montré les effets indésirables liés à l'utilisation d'azoxystrobine. En effet, cette molécule est très efficace vis-à-vis de *M. nivale* et un peu moins vis-à-vis de *F. culmorum*. Son application peut ainsi conduire à éliminer un compétiteur de *F. culmorum* avec comme conséquences un développement plus important de l'agent fongique toxigène et une accumulation supérieure de DON dans les grains de blé. De plus, il a été montré que certains fongicides tels que le prothioconazole combiné au fluoxastrobine ou le prothioconazole seul, activaient fortement la production de DON par *F. graminearum* (Audenaert et al., 2010). Enfin, l'efficacité des fongicides de synthèse est remise en cause compte tenu de l'apparition fréquente de souches résistantes (Chen and Zhou, 2009; Becher et al., 2010). Cependant, bien que controversée, une utilisation de dernier recours de fongicide (dose raisonnée et en fonction du calendrier) couplée à l'utilisation de produits biologiques reste une alternative (Terzi et al., 2014).

La lutte biologique pour limiter la fusariose des céréales est une voie de recherche très étudiée. L'efficacité de plusieurs agents biologiques a été montrée dans des études en conditions contrôlées. La validation de cette efficacité en conditions plein champ reste souvent à confirmer. C'est le cas de *Clonostachys rosea*, un champignon (Ascomycète) qui inhibe la croissance fongique de *F. graminearum* de près de 50% et supprime totalement la germination de ses spores (Xue et al., 2009). L'inhibition de la croissance fongique et de la production de DON (par *F. graminearum* et *F. culmorum*) a aussi été obtenue avec différents *Trichoderma* spp. : *T. gamsii* 6085, *T. velutinum* 4837 ou *T. viride* (Matarese et al., 2012). Plus récemment, *Bacillus velezensis* RC 18 et *Streptomyces albidoflavus* RC 87 B ont été décrits comme des agents de biocontrôle prometteurs pour réduire l'accumulation de DON et l'incidence de la fusariose sur blé (Palazzini et al., 2018). Un fongicide naturel Polyversum®, exploitant les propriétés de *Pythium oligandrum* (Oomycète), a été mis sur le marché en France en 2017. Selon le fournisseur, l'utilisation de ce fongicide, en association avec un triazole, permettrait de réduire les symptômes de fusariose (Synthèse nationale Arvalis 2017-2018). Parmi les traitements alternatifs aux fongicides de synthèse se trouve aussi l'utilisation de molécules naturelles. Plusieurs extraits/molécules d'origine naturelle ont été caractérisés pour leurs propriétés antifongiques et inhibitrices de la production de mycotoxines (Hadizadeh et al., 2009; Kamel et al., 2019). Récemment, l'huile essentielle de clou de girofle a été montrée comme un agent antifongique puissant (inhibition complète de la croissance mycélienne et de la germination des spores) pour lutter contre *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Observés en microscopie, les hyphes et les spores étaient fortement affectées en présence de cette huile essentielle (Sharma et al., 2017).

Un mélange d'huiles essentielles (cannelle, palmarosa, orange et menthe verte) appliqué sur des grains de maïs inoculés par *F. graminearum* et/ou *F. culmorum* a été récemment reporté comme très efficace, induisant une diminution supérieure à 90% de l'accumulation de DON et de plus de 99% pour la ZEA (Perczak et al., 2019).

Comme présenté ci-dessus, plusieurs leviers peuvent être mis en œuvre pour prévenir et réduire les dommages causés par la fusariose aux cultures céréalières. Il est cependant clairement admis qu'une stratégie agronomique efficace ne peut reposer sur un seul de ces leviers. Schéma de rotation, gestion de résidus, date de semis, choix variétal et application de traitements fongicides (de synthèse ou solutions de biocontrôle) nécessitent d'être associés pour pouvoir espérer minimiser au maximum les conséquences de cette maladie fongique (Compant et al., 2005; Blandino et al., 2012).

II. Régulation de la production de mycotoxines sous l'effet de facteurs abiotiques : variation du pH et potentiel redox

Les champignons font face à des changements fréquents de leur environnement (variation de lumière, température, pH, potentiel redox et/ou modifications des sources carbonées et azotées...) et possèdent une grande capacité d'adaptation. Plusieurs études ont suggéré que la production de mycotoxines pouvait être un élément de la réponse adaptative des champignons (Ponts, 2015; Macheleidt et al., 2016). L'effet de stress abiotiques sur la production de mycotoxines de *Fusarium* a fait l'objet de nombreuses études *in vitro*, avec comme cible principale la biosynthèse des trichothécènes chez le modèle *F. graminearum*. La Figure 7 synthétise les facteurs abiotiques étudiés et leurs cibles impliquées dans la production/régulation de DON. Contrairement au DON, très peu d'études ont été consacrées à la modulation de la production d'enniatines chez *F. avenaceum*. Dans les chapitres suivants, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'effet de variations de pH ainsi que de l'exposition à des antioxydants naturels ; deux facteurs abiotiques qui seront spécifiquement étudiés dans la partie expérimentale de ce projet de doctorat.

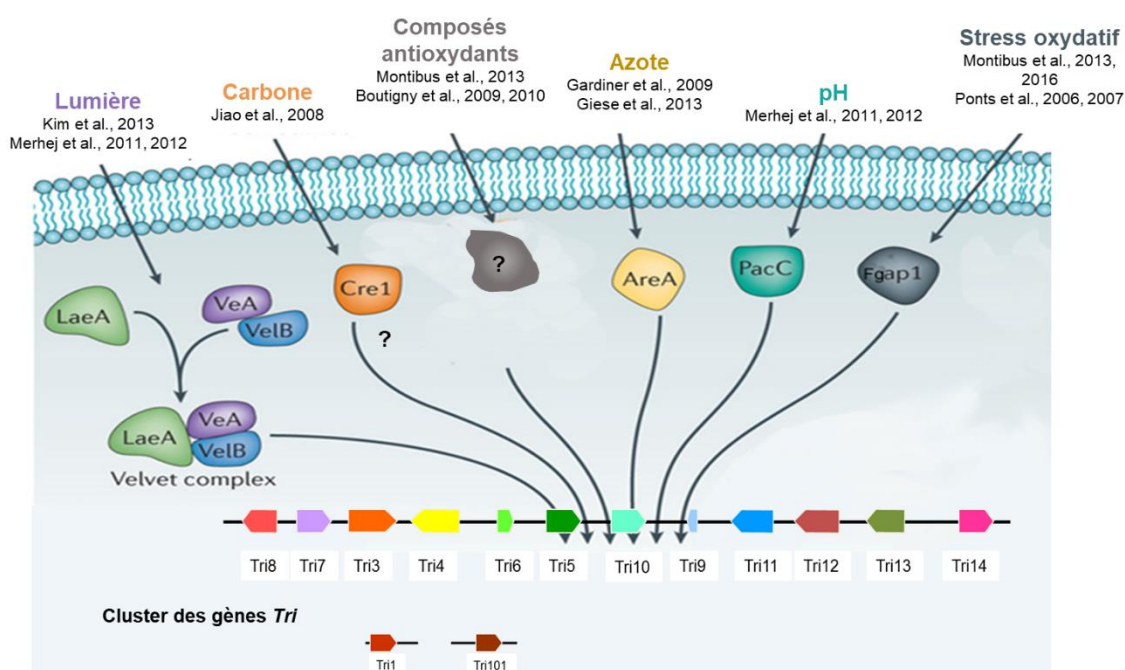


Figure 7 : Facteurs de modulation et facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biosynthèse de déoxynivalénol (Source interne à MycSA).

II.1. Homéostasie du pH, facteur de transcription PacC et production de mycotoxines

Les champignons filamenteux perçoivent le pH de leur environnement et se développent quelles que soient les conditions de pH (changeantes ou extrêmes) pour assurer leur développement (Rossi and Arst, 1990; Peñalva and Arst, 2002; Sánchez-Rangel et al., 2018). Cette adaptation est possible grâce à un système de régulation sophistiqué, leur permettant de détecter les variations de pH externe et de mettre en jeu les réponses nécessaires au contrôle de l'équilibre acido-basique intracellulaire (Peñalva et al., 2008; Merhej et al., 2010). Ce mécanisme et les composantes de ce système ont été décrits pour la première fois chez le modèle *A. nidulans* dans les années 1960 (Dorn, 1965). Au centre de ce mécanisme se trouve la voie de transduction du signal PacC/Pal (Figure 8). Le gène *pacC* code un facteur de transcription à doigts de zinc et les gènes *Pal* (*palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* et *palI*) des protéines capables de détecter les variations de pH extracellulaire et d'assurer la transduction du signal, de se lier à PacC et de l'activer ou d'en réguler la transcription (Caddick et al., 1986).

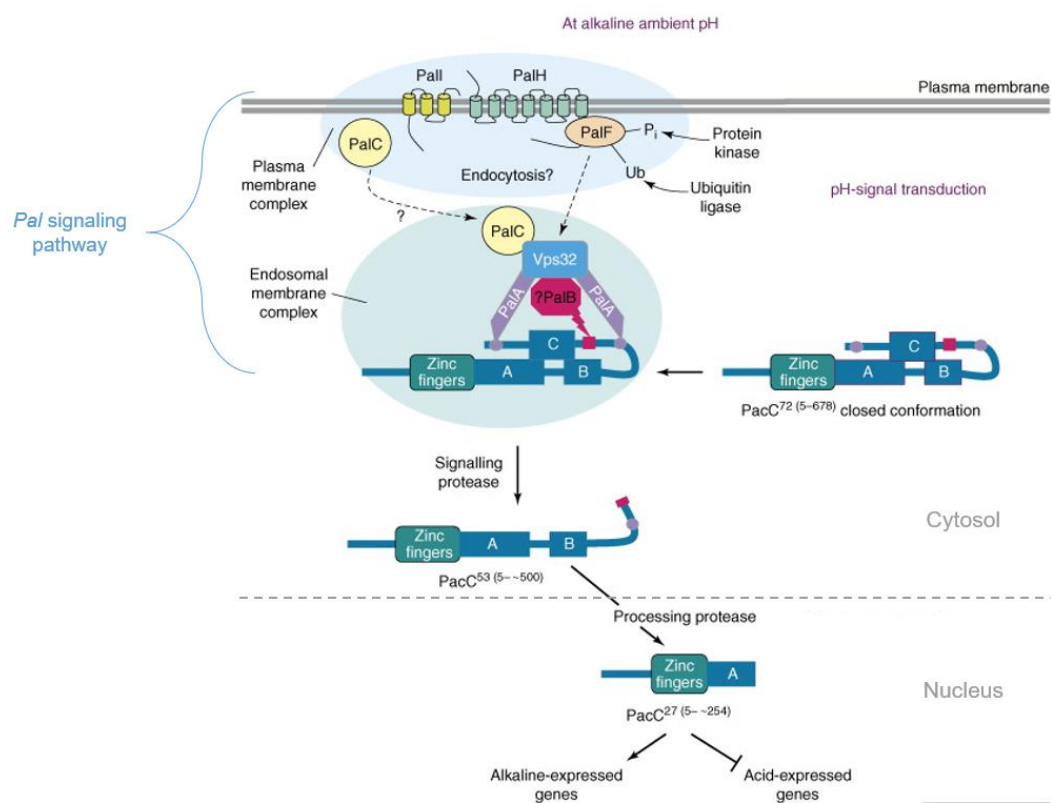


Figure 8 : Mécanismes de régulation de la voie de signalisation du pH en milieu alcalin chez *A. nidulans*. La voie des Pal ainsi que les différentes étapes de la maturation du facteur PacC sont représentées de façon simplifiée (d'après Peñalva et al., 2008).

PacC d'*A. nidulans* est une protéine cytoplasmique de 674 acides aminés et 72 kDa (notée PacC⁷²), correspondant à la forme complète mais inactive de PacC. Deux étapes protéolytiques sont nécessaires pour que PacC soit activé et remplisse sa fonction de facteur de transcription (Diez et al., 2002) (Figure 8). Dans des conditions de pH neutre à alcalin (pH ≥ 7), le complexe constitué des protéines transmembranaires PalH et PalI, et de la protéine cytoplasmique PalF agissent comme des capteurs de pH et initient la transduction du signal médiée par l'ubiquitylation de PalF (Peñalva et al., 2014). Après recrutement de facteurs du système de transport vésiculaire ESCRT-I pour « Endosomal Sorting Complexes Required for Transport », ESCRT-II et ESCRT-III, PalA et PalB sont mobilisés à la surface de cette structure *via* PalC, qui jouerait le rôle de pont (Galindo et al., 2007). PalA peut alors lier deux boîtes de fixation sur l'extrémité C-terminale de PacC⁷² permettant ainsi à PalB de cliver PacC⁷² en une forme intermédiaire de 53 kDa (PacC⁵³ ; voir Figure 9) (Peñas et al., 2007). Ensuite, PacC⁵³ subit un second clivage dans le protéasome de manière indépendante du pH (Peñalva et al., 2008). PacC est alors sous sa forme mature et active de 250 acides aminés et 27 kDa, nommée PacC²⁷ (Mingot et al., 2001; Diez et al., 2002). *In fine*, les deux traitements protéolytiques subis par PacC entraînent l'exposition de son signal de localisation nucléaire (NLS ; voir Figure 9) avec la conséquence d'une re-localisation de PacC²⁷ au noyau dans lequel il pourra alors se fixer spécifiquement à la séquence consensus 5'-GCCARG présente dans le promoteur des gènes qu'il régule pour activer les « gènes alcalins¹ » et réprimer les « gènes acides² » (Tilburn et al., 1995).

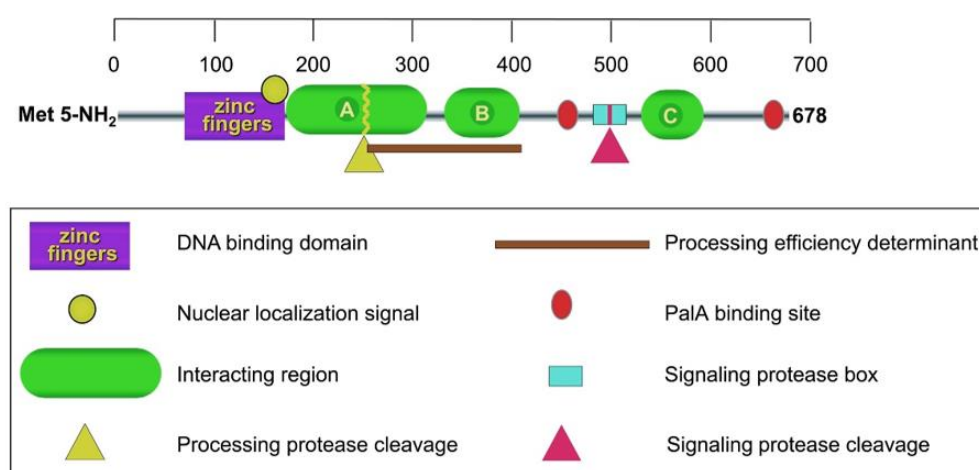


Figure 9 : Représentation des domaines protéiques de PacC chez *A. nidulans* (Peñalva and Arst 2004). PacC⁷² comprend trois domaines en doigts de zinc (Tilburn et al., 1995) ainsi que trois domaines d'interaction (A, B et C). Ces derniers lui confèrent une forme tridimensionnelle fermée inaccessible à la protéolyse. Dans son extrémité C-terminale, le domaine C est encadré par deux séquences consensus (motif protéique YPXL/I) reconnues par PalA encadrant le site de clivage par PalB.

¹ Des « gènes alcalins » sont des gènes dont l'expression est activée en milieu au pH neutre à alcalin.

² Des « gènes acides » sont des gènes dont l'expression est activée en milieu au pH acide.

PacC est lui-même considéré comme un gène alcalin et un facteur de transcription qui autorégule son expression (Tilburn et al., 1995). Chez *A. nidulans*, les gènes régulés par PacC peuvent être regroupés en trois catégories fonctionnelles : les protéines sécrétées, les perméases et les enzymes qui assurent la synthèse de métabolites destinés à l'export (Peñalva and Arst, 2004). Ils sont impliqués dans la réponse au stress oxydant, la pathogénicité des agents fongiques, ou encore la production de métabolites secondaires (Tilburn et al., 1995). Des gènes orthologues de PacC chez *A. nidulans* ont été trouvés chez plusieurs espèces de champignons filamenteux et de levures telles que *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, ou *Candida albicans* (Suárez and Peñalva, 1996; Peñalva and Arst, 2002; Caracuel et al., 2003; Flaherty et al., 2003; Merhej et al., 2011; Du and Huang, 2016; Virgilio and Bertolini, 2018).

L'impact des conditions de pH sur la production de mycotoxines a fait l'objet de nombreuses études, *e.g.*, production de stérigmatocystine et d'aflatoxines par *A. nidulans* et *Aspergillus parasiticus* (Keller et al., 1997), de patuline par *Penicillium expansum* (Zong et al., 2015), d'alternariol par *Alternaria alternata* (Brzonkalik et al., 2012), de fumonisines par *F. verticillioides* (Flaherty et al., 2003) et *F. oxysporum* (Caracuel et al., 2003), ou encore de déoxynivalénol par *F. graminearum* (Merhej et al., 2011). Les mycotoxines sont, en général, synthétisées dans des conditions de pH acide (proche de 4-4,5) (Gebremeskel et al., 2019). Prenons l'exemple de *F. verticillioides*, espèce pour laquelle la production de fumonisines est plus importante à pH 5 qu'à des pH plus élevés et dont les niveaux d'expression des gènes *Fum1* et *Fum21* (impliqués dans la biosynthèse des fumonisines) sont également plus importants à pH acide plutôt qu'à des pH plus élevés (Fanelli et al., 2013). En revanche, lorsque l'orthologue de *PacC*, *FvPac1* est interrompu la production de fumonisines et l'expression de *Fum1* sont rétablies en pH alcalin (pH 8,4) à des niveaux proches ou supérieurs de ceux mesurés en condition acide (pH 4,5) (Flaherty et al., 2003). Ces données suggèrent que *FvPac1* agit comme répresseur de la biosynthèse des fumonisines en conditions alcalines. Chez *F. graminearum*, les travaux de Merhej et al., 2010 ont montré un effet déterminant de l'acidification du milieu de culture (pH initial = 6,5 vs. pH final = 3) pour initier la production de trichothécènes et l'expression des gènes *Tri*. Ces auteurs ont identifié le gène *FgPac1* comme orthologue de *PacC* et étudié son implication dans ces mécanismes en utilisant une souche de *F. graminearum* génétiquement modifiée pour exprimer constitutivement une version tronquée active de *FgPac1* (l'équivalent de *PacC*²⁷) notée *FgPac1^c* (Merhej et al., 2011).

Au contraire de la souche sauvage, la souche mutante exprimant l'allèle *FgPac1^c* se caractérise par une production très faible de toxines ainsi qu'une expression réduite des gènes *Tri* en milieu acide. Ces résultats indiquent un rôle répresseur de *FgPac1* sur l'expression des gènes *Tri*. En ce qui concerne la biosynthèse d'enniatines, une étude a rapporté des niveaux de production par *Fusarium sambucinum* plus élevés en conditions de pH alcalin qu'à des pH acides à neutre (Audhya and Russell, 1974). Ces résultats, à l'inverse des situations observées en ce qui concerne les productions de TCTB et de fumonisines par *F. graminearum* et *F. verticillioides*, respectivement, soulèvent la question de modalités de régulation de la biosynthèse d'enniatines par le pH, différentes chez les espèces productrices. Chez *F. avenaceum*, aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent sur l'effet des variations de pH sur la production d'enniatines et le rôle potentiel d'un homologue du facteur de transcription PacC. C'est pourquoi, nous nous servirons des connaissances acquises chez d'autres champignons filamenteux mycotoxinogènes pour étudier la régulation de la production d'enniatines par *F. avenaceum* sous l'effet de variations de pH et l'implication potentielle d'un orthologue du gène *PacC*.

II.2. Effet d'antioxydants naturels, les acides phénoliques, sur la croissance fongique et production de mycotoxines

Un large panel de métabolites présents dans les plantes dont les céréales a été caractérisé pour leur capacité à inhiber la croissance fongique et la production de mycotoxines. Dérivés du métabolisme primaire et secondaire des plantes, ils appartiennent à différents groupes chimiques : acides gras, amines et polyamines, phénylpropanoïdes, terpénoïdes, acides aminés... Les plus étudiés dans la littérature sont les phénylpropanoïdes (Gauthier et al., 2015). Parmi ces phénylpropanoïdes, on distingue les acides phénoliques décrits comme des antioxydants majeurs des céréales. Ce sont des composés aromatiques qui contiennent au moins un groupement carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont dérivés des acides cinnamique (C₆-C₃) et benzoïque (C₆-C₁) (Figure 10). Ces deux substances ont des structures similaires, mais une chaîne éthylénique rattachée au cycle aromatique différencie les acides cinnamiques. Les principaux acides cinnamiques présents dans les plantes sont l'acide férulique, sinapique, caféique et *p*-coumarique (Atanasova-Penichon et al., 2016). Pour les acides benzoïques, on peut citer les acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique, gallique et syringique.

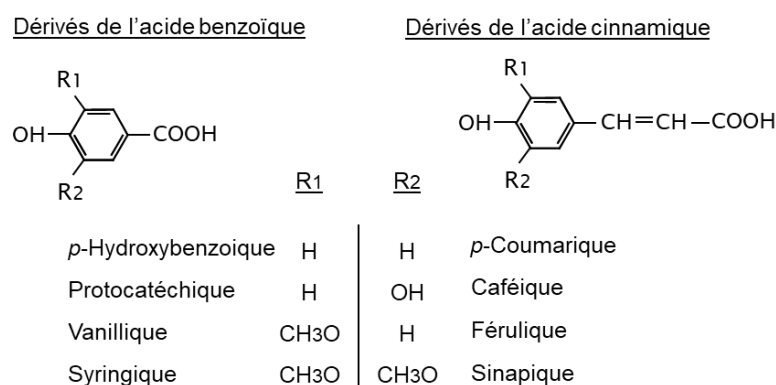


Figure 10 : Structure des acides phénoliques, dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique (Source interne à MycSA).

Il a été montré *in vitro* que les dérivés d'acides cinnamiques (acide férulique, sinapique, caféique, *p*-coumarique) affectaient la croissance et la synthèse des TCTB chez *F. graminearum* et *F. culmorum* (Boutigny et al., 2009; Ponts et al., 2011). Les auteurs précédents ont aussi indiqué que les effets observés étaient souche dépendante et que les acides benzoïques étaient nettement moins actifs que les cinnamiques. Ces propriétés d'inhibition de la toxinogénèse ont également été mises en évidence vis-à-vis d'autres mycotoxines dont les fumonisines (Samapundo et al., 2007; Atanasova-Penichon et al., 2014), la zéaralénone (Schöneberg et al., 2018), les toxines T-2/HT-2 (Ferruz et al., 2016), l'ochratoxine (Palumbo et al., 2007) et les aflatoxines (Hua et al., 1999). Les mécanismes à l'origine des propriétés antifongiques et anti-mycotoxines des acides phénoliques ne sont pas totalement élucidés à ce jour. En ce qui concerne l'inhibition de la croissance fongique, l'origine de cette toxicité serait due au caractère lipophile des acides phénoliques. Ces derniers peuvent en effet pénétrer dans les membranes fongiques et en perturber l'intégrité (Thompson, 1992; Passone et al., 2005). La formation de pores dans les membranes induirait entre autres, la fuite d'ions et la modification de son potentiel électrique (Sung and Lee, 2010). Ce mécanisme est étayé par les corrélations qui ont été établies entre lipophilicité et CI_{50} des acides phénoliques vis-à-vis de différents champignons, dont *F. graminearum* (Ponts et al., 2011). En ce qui concerne l'activité anti-mycotoxine, les propriétés antioxydantes des acides phénoliques seraient un paramètre clef de leur efficacité (Atanasova-Penichon et al., 2016). Il a en effet été démontré que le statut redox d'un milieu était un facteur majeur de modulation de la production de mycotoxines (Montibus et al., 2015). Pour plusieurs espèces fongiques dont *F. graminearum*, *A. flavus* et *A. ochraceus*, l'exposition à des espèces oxydantes (espèces réactives d'oxygène, ménadione...) entraînent une augmentation de la production de toxines (Ponts et al., 2007; Reverberi et al., 2012; Guan et al., 2019).

Chez les espèces précédentes, le lien entre réponse à un stress oxydant et modulation de la toxino-génèse serait orchestré par un facteur de transcription homologue de *Yap1* chez *S. cerevisiae* : *FgAP1* chez *F. graminearum* (Montibus et al., 2013), *Aoyap1* chez *A. ochraceus* (Reverberi et al., 2012), *Afap1* chez *A. flavus* (Guan et al., 2019). En piégeant les radicaux libres et/ou inhibant certaines activités enzymatiques oxydantes telles les lipoxygénases (Paul et al., 2003), les acides phénoliques diminueraient l'intensité des signaux de stress oxydants et en conséquence les niveaux de production de mycotoxines. Un autre mécanisme souvent proposé pour expliquer la capacité des acides phénoliques à inhiber la production de mycotoxines réside dans leur capacité à moduler l'expression des gènes de biosynthèse et gène de régulation. Boutigny et al., 2009 ont ainsi démontré une diminution de l'expression des gènes *Tri* induite par l'exposition de *F. culmorum* à l'acide férulique.

Comme présenté dans les paragraphes précédents, il apparaît clairement que si l'effet de facteurs abiotiques a été largement étudié vis-à-vis de la production de mycotoxines dites majeures, très peu de données existent en ce qui concerne les mycotoxines émergentes. Pour ce qui est de la production d'enniatines chez *F. avenaceum*, les études se sont limitées à l'effet de l'activité de l'eau combinée à la température (Kokkonen et al., 2010) ainsi qu'à l'influence de différentes sources de carbone et/ou azote ont été testées (Sørensen and Giese, 2013; Sørensen and Sondergaard, 2014). Ces études détaillées dans la revue bibliographique (Gautier et al., 2020) qui figure en fin de cette partie d'introduction bibliographique témoignent d'un effet souche dépendant et suggèrent que la biosynthèse d'enniatines peut se produire dans une large gamme de conditions environnementales.

III. *F. avenaceum* : un agent majeur de la fusariose des blés et de la contamination des récoltes par les enniatines

La revue de littérature intitulée “***Fusarium* Mycotoxins Enniatins: an updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests**” (Gautier C., Pinson-Gadais L., Richard-Forget F.) rassemble les informations les plus récentes sur l'occurrence des enniatines (depuis le début des années 2000), sur les espèces productrices d'enniaines, sur la voie de biosynthèse des enniatines, sur les déterminants abiotiques pouvant influencer la régulation de leur production.

III.1. Revue: “*Fusarium* Mycotoxins Enniatins: an updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests”, Gautier et al., 2020.

Fusarium Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests

Charlotte Gautier, Laetitia Pinson-Gadais, and Florence Richard-Forget*



Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 4788–4798



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Cereal grains and their processed food products are frequently contaminated with mycotoxins produced by the *Fusarium* genus. Enniatins (ENNs), which belong to the so-called “emerging mycotoxins” family, are among the most frequently found in small grain cereals. Health hazards induced by a chronic exposure to ENNs or an association of ENNs with other major mycotoxins is a risk that cannot be excluded given the current toxicological data. Thus, efforts must be pursued to define efficient control strategies to mitigate their presence in cereal grains. A key condition for achieving this aim is to gain deep and comprehensive knowledge of the factors promoting the appearance of ENNs in crop harvests. After an update of ENN occurrence data, this review surveys the scientific literature on the *Fusarium* species responsible for ENN contamination and covers the recent advances concerning the abiotic determinants and the genetic regulation of ENN biosynthesis.

KEYWORDS: enniatins, mycotoxins, *Fusarium* spp., biosynthesis, regulation

■ INTRODUCTION

Fusarium head blight (FHB) and *Gibberella* ear rot (GER) are among the most widespread worldwide and devastating fungal diseases that result in yield and quality losses of wheat and other small grain cereals and maize.¹ Besides causing reductions in grain yield and quality, some GER and FHB fungi are also responsible for the contamination of grains with a variety of mycotoxins. Over 20 *Fusarium* species have been associated with GER and FHB, with *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium tricinctum*, and *Fusarium poae* reported as the most common species, with the distribution being significantly influenced by the host crop, agronomic factors, and geo-climatic criteria.^{2,3} Among the whole set of mycotoxins associated with *Fusarium* species causing GER and FHB, zearalenone (ZEA) and type B trichothecenes, including deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and their acetylated derivatives, mainly produced by *F. graminearum* and *F. culmorum*, have been the subject of intensive research as a result of their frequent occurrence and toxicological impact on animal and human health.^{4,5} ZEA and DON are regulated mycotoxins subjected to the European Union (EU) legislation (EC No. 1881/2006) that sets maximum levels in a variety of different foodstuffs.⁶ For detailed and comprehensive information on the mechanisms determining the presence of type B trichothecenes in cereal harvests, we strongly encourage the readers to consult the high-quality reviews that have been published recently.^{1,7} In addition to ZEA and DON, results of mycotoxin surveys published during the past decade have provided increasing evidence of the frequent occurrence of the so-called “emerging mycotoxins”.^{8,9} Initially, the term “emerging mycotoxins” gathered the *Fusarium* mycotoxins enniatins (ENNs), beauvericin, moniliformin, and fusaproliferin.¹⁰ Since

then, use of the term “emerging” has gone ahead to include mycotoxins that are neither routinely monitored nor subjected to a regulation.¹¹ The most prevalent mycotoxins among the emerging mycotoxins are ENNs. The review of Santini et al. gathering prevalence data on the concentration of emerging mycotoxins in cereal-based food indicated that humans might be exposed continuously to low levels of ENNs through food. The previous review also underlined that Mediterranean populations might be exposed to exceptionally high doses of ENNs, with levels of contamination reaching ten or even hundreds of milligrams per kilogram in some food products.¹²

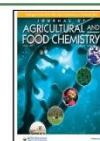
ENNs are N-methylated cyclic hexadepsipeptides, consisting of three residues of D-2-hydroxyisovaleric acids alternating with three N-methyl-L-amino acids, generally valine, leucine, and isoleucine. Peptide bonds and intramolecular ester (lactone) bonds link the subunits to form an 18-membered ring. To date, 29 ENNs have been characterized, with this number being likely to increase given the wide range of substitution possibilities in the side chains of the 18-membered cyclic backbone.^{13,14} Among these 29 analogues, ENNs A, A1, B, and B1 are the most commonly detected in cereal grains. Their structures are reported in Figure 1. A multifunctional enzyme termed enniatin synthetase (Esyn) that belongs to the class of non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) is the key enzyme catalyzing the

Received: January 17, 2020

Revised: March 27, 2020

Accepted: April 2, 2020

Published: April 3, 2020



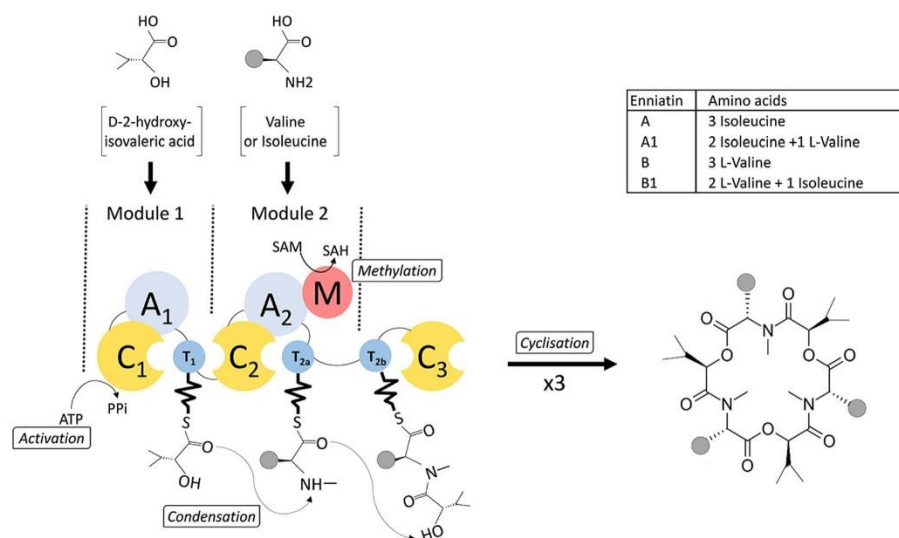


Figure 1. Chemical structures and schematic model of the biosynthesis of ENNs A, A1, B, and B1; A1 and A2, adenylation domains; C1, C2, and C3, condensation domains; T1, T2a, and T2b, thiolation domains; and M, *N*-methyltransferase domain.

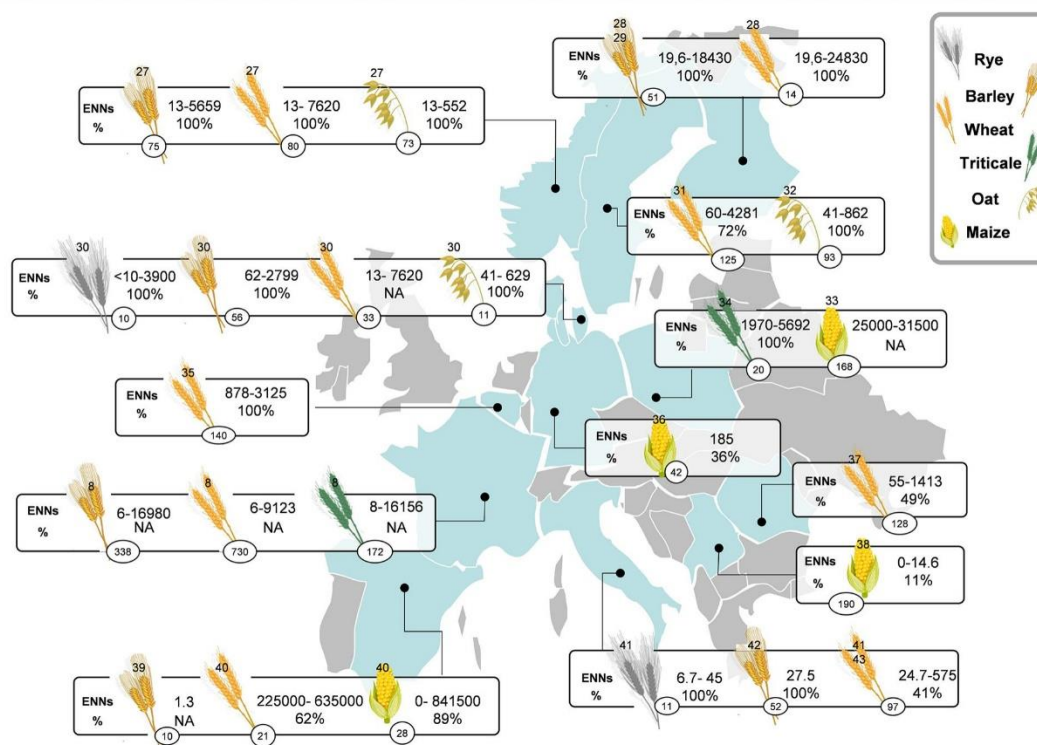


Figure 2. European map of ENN occurrence. Squares gather the type of crop, the percentage of analyzed samples that were contaminated by ENNs, the lowest and highest quantified ENN values (sum of ENNs A, A1, B, and B1), or the average value expressed in micrograms per kilogram. Circles indicate the number of analyzed samples for each type of crop. The numbers at the top of squares indicate the corresponding bibliographic sources. NA means that the information was not available.

biosynthesis of ENNs in *Fusarium* spp.¹⁵ First characterized in *Fusarium scirpi* and *Fusarium oxysporum*, Esyn consists of one polypeptide chain with a molecular mass of 347 kDa.^{16,17}

ENNs display a wide range of biological activities, including antibacterial, antifungal, herbicidal, and insecticidal potency.^{18,19} Most of these activities are related to the ionophoric properties of ENNs. Indeed, ENNs can be incorporated into cell

Table 1. Data Reporting the Occurrence of ENNs in Cereal Crops Published in the Last 15 Years^a

cereal	country	ENNs ($\mu\text{g/kg}$) [number of positive samples]					Σ ENNs	number of samples	analytical method	reference
		A	A1	B	B1	B				
barley	Italy	1.6 [31]	5 [42]	10.4 [52]	10.5 [49]	<10.8–5720 [22]		52	LC–MS/MS	42
	Finland	1–950 [21]	<4–2000 [22]	<3.8–9760 [22]	<10.8–5720 [22]	<10.8–5720 [22]		22	LC–MS	28
		1–7 [12]	<4–81 [25]	<3.8–614 [29]	<10.8–338 [29]	<10.8–338 [29]		29	LC–MS	29
	Spain	ND	ND	ND	1.3 [NA]	1.3 [NA]		10	LC–MS/MS	39
	France						6–17980 [NA]	338	LC–MS/MS	8
maize	Denmark	<10–39 [12]	<10–140 [44]	32–2100 [56]	<10–520 [54]	<10–520 [54]		56	UPLC–MS/MS	30
	Norway	<3–59 [23]	<4–500 [67]	<3–3200 [75]	<3–1900 [75]	<3–1900 [75]		75	LC–MS	27
	Spain	ND	mean, 168000; max, 831000 [25]	mean, 4500; max, 6000 [25]	mean, 4500; max, 4500 [25]	mean, 4500; max, 4500 [25]		28	LC/DAD and LC–MS/MS	40
	Serbia	3.2 [21]	2.7 [21]	4.2 [21]	4.5 [21]	4.5 [21]		73	LC–MS/MS	38
		ND [0]	ND [0]	ND [0]	ND [0]	ND [0]		72		
		ND [0]	ND [0]	ND [0]	ND [0]	ND [0]		45		
	Poland		mean, 21750; max, 14893 [NA]	mean, 2360; max, 11530 [NA]	mean, 930; max, 64710 [NA]	mean, 930; max, 64710 [NA]		78	HPLC	33
		mean, 2810; max, 6300 [NA]	mean, 6350; max, 58600 [NA]	mean, 9420; max, 194000 [NA]	[NA]	[NA]		90		
	Germany	NA	NA	185 [15]	NA	NA		42	LC–MS	36
	Burkina-Faso	NA	0.1 [2]	NA	0.2 [1]	0.2 [1]		69	LC–MS/MS	49
oat	Mozambique	NA	0 [0]	0.01 [25]	0.1 [1]	0.1 [1]		53	LC–MS/MS	49
	Cameroon	0.03 [14]	0 [0]	ND	0.1 [33]	0.1 [33]		37	LC–ESI–MS/MS	48
	China	mean, 0.13; range, 0.09–0.17 [2]	mean, 0.14; range, 0.09–0.16 [3]	ND	mean, 0.21; range, 0.10–0.32 [3]	mean, 0.21; range, 0.10–0.32 [3]		71	HPLC–MS/MS	50
	Egypt	mean, 0.003; max, 0.09 [25]	mean, 0.04; max, 0.09 [28]	mean, 0.01; max, 0.05 [35]	mean, 0.03; max, 0.09 [22]	mean, 0.03; max, 0.09 [22]		79	LC–MS/MS	47
	Denmark	<10 [0]	<10–39 [7]	11–470 [11]	<10–120 [10]	<10–120 [10]	mean 131, max 838 [50]	11	UPLC–MS/MS	30
	Sweden						mean 41, max 862 [43]	50	HPLC/ESI–MS/MS	32
								43		
	Norway	<3–17 [12]	<4–75 [24]	<3–190 [73]	<3–270 [61]	<3–270 [61]		73	LC–MS	27
	Italy	mean, 7.1; range, 7.8–9.8 [4]	ND [0]	mean, 5.8; range, 6.7–45 [6]	ND [0]	ND [0]		11	LC–MS/MS	41
rice	Denmark	<10–100 [9]	<10–100 [6]	1100–3900 [10]	83–860 [10]	83–860 [10]		10	UPLC–MS/MS	30
	Morocco	215–11950 [16]	140–44870 [4]	145–26200 [21]	165–23700 [17]	165–23700 [17]		70	LC–DAD	53
	Iran		mean, 0.06; max, 0.08 [5]					65	LC/ESI–MS/MS	54
triticale	Poland	mean, 23; max, 135 [14]	mean, 274; max, 882 [20]	mean, 1258; max, 3328 [20]	mean, 415; max, 1347 [20]	mean, 415; max, 1347 [20]	8–16156 [NA]	20	UHPLC–HRMS	34
	France							172	LC–MS/MS	8
wheat	Italy	mean, 1.6; range, 8.4–29.8 [6]	mean, 0.7; range, 5.3–55 [6]	mean, 20.2; range, 5.5–97 [6]	mean, 0.4; range, 5.5–33.1 [6]	mean, 0.4; range, 5.5–33.1 [6]		57	LC–MS/MS	41
		mean, 41.05; max, 335.2 [38]	mean, 12.47; max, 90.5 [16]	mean, 19.95; max, 92.5 [35]	mean, 3.3; max, 56.7 [22]	mean, 3.3; max, 56.7 [22]		40	LC–MS/MS	43
	Romania	mean, 9; range, 17–140 [6]	mean, 36; range, 14–356 [10]	mean, 78; range, 21–407 [19]	mean, 76; range, 3–510 [14]	mean, 76; range, 3–510 [14]		31	LC–MS/MS	37
		max, 96.6 [25]	max, 150.4 [25]	max, 814.6 [25]	max, 250.6 [25]	max, 250.6 [25]		68		
		max, 139.8 [19]	max, 356 [19]	max, 407.2 [19]	max, 510 [19]	max, 510 [19]		29		

Table 1. continued

cereal	country	ENN's ($\mu\text{g/kg}$) [number of positive samples]					Σ ENNs	number of samples	analytical method	reference
		A	A1	B	B1					
Belgium		mean, 3.2; max, 5.6 [49]	mean, 28.2; max, 165 [140]	mean, 735.3; max, 2168 [140]	mean, 110.9; max, 776.7 [140]			140	UPLC-MS/MS	35
Finland		1–490 [7]	<4–940 [12]	<3.8–18300 [14]	<10.8–5100 [14]			14	LC-MS	28
Spain		ND	mean, 225000; max, 635000 [13]	ND	ND			21	LC/DAD and LC-MS/MS	40
Norway		<3–30 [23]	<4–190 [23]	<3–5800 [23]	<3–1600 [23]		mean 220, max 4281 [27]	80	LC-MS	27
Sweden							mean 60, max 2499 [63]	61	LC-MS/MS	31
France								64	LC-MS/MS	
Denmark		<3–30 [NA]	<4–190 [NA]	<3–5800 [NA]	<3–1600 [NA]		6–9213 [NA]	730	LC-MS/MS	8
Morocco		mean, 34000; max, 34000 [NA]	mean, 105000; max, 209000 [NA]	mean, 5000; max, 11000 [NA]	mean, 19000; max, 19000 [NA]			33	UPLC-MS/MS	30
China		mean, 0.87; range, 0.19–3.3 [9]	mean, 5.33; range, 0.25–20.91 [9]	mean, 12.55; range, 0.38–56.31 [12]	mean, 15.61; range, 0.5–61.77 [10]			25	LC/DAD and LC-MS/MS	44
Tunisia		mean, 75100 [13]	mean, 0.6; max, 11 [1]	mean, 18060 [13]	mean, 0.5; max, 6 [1]			75	HPLC-MS/MS	50
Canada		<2–17 [NA]	<5–149 [NA]	<16–3220 [NA]	mean, 8500 [13]			20	LC-MS/MS	46
Canada							12–34200 [54]	13	LC-DAD	45
								54	HPLC-MS/MS	52
								89	HPLC-MS/MS	51

*Data reporting the occurrence of enniatins in cereal crops published in the last 15 years (NA = not available; ND = not detected; [] = number of samples containing enniatin A, A1, B or B1, DAD: Diode Array Detector). References 8, 27, and 43 were used to build the European ENN map (Figure 2). The other references are associated with cereals harvested in non-European countries.

Hosts	Complexes	Species
Wheat	Tricinctum	<i>F. acuminatum</i> , <i>F. arthrosporioides</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. torulosum</i>
	Sambucinum	<i>F. kyushuense</i> , <i>F. poae</i>
	Sporotrichioides	<i>F. sporotrichioides</i>
Barley	Tricinctum	<i>F. arthrosporioides</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. torulosum</i>
	Sporotrichioides	<i>F. sporotrichioides</i>
Oat	Tricinctum	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. torulosum</i>
	Sambucinum	<i>F. poae</i> , <i>F. venenatum</i>
Maize	Tricinctum	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. torulosum</i>
	Sambucinum	<i>F. compactum</i> , <i>F. poae</i>
	Fujikuroi	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. temperatum</i> , <i>F. ramigenum</i>
Non-cereal plant	Tricinctum	<i>F. acuminatum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. tricinctum</i>
	Sambucinum	<i>F. poae</i> , <i>F. sambucinum</i>
	Incarnatum-equiseti	<i>F. equiseti</i>
	Sporotrichioides	<i>F. sporotrichioides</i>
	Oxysporum	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. pisi</i> , <i>lupini</i> , <i>batata</i> , <i>melonis</i>
	Fujikuroi	<i>F. acutatum</i> , <i>F. ananatum</i> , <i>F. anthophilum</i> , <i>F. fujikuroi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. temperatum</i> , <i>F. ramigenum</i> , <i>F. andiyazi</i> , <i>F. thapsinum</i> , <i>F. concentricum</i> , <i>F. lactis</i> , <i>F. nygamai</i>
	Lateritium	<i>F. lateritium</i>
	Solani	<i>F. solani</i>
Medicago, Pea, Cajanus cajan, Pineapple, Plantago, Panceolata, Cabbage, Potato, Garlic, Melon, Asparagus, Tomato, Banana, Hemp, Pepper, Sugar Beet		

Figure 3. *Fusarium* species reported as producers of ENNs on cereals or other non-cereal host plants.

membranes, creating passive cation channels that facilitate the transport of mono- and divalent cations across the membranes, giving rise to abnormal physiological concentrations of these cations.¹⁰ As a result of their ionophoric properties and ability to create pores in cell membranes as well as their capacity to inhibit drug efflux pumps, the potential of ENNs to synergistically interact with other mycotoxins is also of high concern and should be investigated. The ecological significance of ENN production for toxigenic *Fusarium* remains to be clarified. In addition to their antimicrobial potency that can participate to the defensive strategies of fungi against resident microbes, ENNs have been suggested to contribute to the virulence of *F. avenaceum* when infecting potato tubers.²⁰ To the best of our knowledge, their role in the pathogenesis on cereals has not been elucidated. With regard to the toxicity of ENNs to mammals, while their cytotoxicity on different cell lines and their capacity to impair cell cycle distribution, to cause mitochondrial dysfunction, and to induce apoptosis have been evidenced through *in vitro* investigations (for review, see refs 9 and 18), *in vivo* studies have been more limited.^{9,18,21–23} It is important to note that, despite the likelihood of human exposition to high levels of ENNs through food, no acute ENN mycotoxicoses have been reported. Actually, the scientific opinion released by the European Food Safety Authority (EFSA) in 2014 indicated that acute exposure to ENNs was not a concern to human health but that hazards related to a chronic exposure should not be excluded, with their assessment remaining however highly challenging given the restricted amount of available *in vivo* toxicity data.²⁴

According to the increasing evidence of the worldwide and frequent occurrence of crop contamination with ENNs, together with the potential risk of health hazards associated with chronic exposure and the likelihood of interacting toxic effects when ENNs co-occur with other EU-regulated mycotoxins, ENNs might pose a major threat to human and animal health.^{25,26}

Efforts should be pursued to improve control strategies to mitigate their presence in cereal harvests, which requires more detailed knowledge of the factors promoting their appearance. In the present review, a particular emphasis will be placed on the mechanisms underlying the production of ENNs. After an update of ENN occurrence data, the most recent information on ENN-producing species, abiotic determinants, and genetic regulation of ENN biosynthesis will be discussed.

WORLDWIDE OCCURRENCE DATA IN CROPS OVER THE PAST 15 YEARS

During the last 15 years, no less than 200 reports dealing with the occurrence of ENNs in food and feed products have been identified through a Web of Science (WoS), PubMed, and Web of Knowledge survey using “enniatin” and “occurrence” as keywords. When the survey coverage was limited to cereal grains, the number of identified reports went to 90 (research articles and reviews), with a vast percentage of them (80%) dealing with European crops. The most relevant information, selected mainly on the basis of the number of analyzed samples, contained in this set of reports has been gathered to draw the ENN European map reported on Figure 2 (data used to build this map are related to the refs 8 and 27–43 listed in Table 1). It was decided to keep only studies including at least 10 samples of the same cereal crop. However, this map must be analyzed with caution. Indeed, only available published results are reported, which means that no data for a European country (Portugal for instance) does not indicate that cereals cultivated in this country cannot be contaminated with ENNs. Besides, as shown in Table 1, the reported ENN contamination values have been obtained with different analytical procedures, characterized by different sensitivity and accuracy, which makes it hard to compare them. Be that as it may, the ENN European map reported in Figure 2 clearly highlights that European cereal crops are frequently contaminated by ENNs (most of the percentages of positive

samples are higher than 50%) with concentrations that can reach significant values, whatever the geographical latitude and the associated climatic conditions of their cultivation area. The highest contamination values reported were associated with wheat (635 mg/kg) and maize cultivated in Spain (841.5 mg/kg).⁴⁰ In our study, we focused on European cereal grains, but many other parts of the world are concerned by the issue of ENN contamination (refs 44–54 in Table 1). Indeed, ENNs have been found in high levels in wheat grains harvested in Morocco and Tunisia.^{44–46} Maize cultivated in Egypt, Mozambique, Burkina Fasso, and Cameroon have also been reported to contain ENNs, with the concentrations (in the microgram per kilogram range) being, however, largely lower than that frequently found in Europe.^{47–49} The occurrence of ENNs has also been reported in maize, wheat, and wheat-based samples collected in the Shandong province of China.⁵⁰ The quality of wheat in Canadian harvests is also affected by ENNs, and the reported data suggest an increase in the ENN contamination incidence over the last 20 years.^{51,52} The ENN map and the previously discussed reports show that a wide variety of cereal crops can be contaminated, including wheat, barley, maize, oat, rye, and triticale. Most of the available data target wheat and barley, and as observed on Figure 2, high percentages of the analyzed samples (100% for samples collected in northern European countries) were contaminated by ENNs.^{27–30,35} Similarly, 100% of the oat samples considered in Scandinavian survey studies were shown to contain some ENNs.^{27,30,32} Although less information is available with regard to triticale and rye, the analytical results indicate 100% of positive samples.^{30,41} With regard to rice, ENNs were found in samples collected in Morocco and Iran, at frequency and concentration levels that were, however, largely lower than those associated with the other cereal crops.^{53,54} We can also mention one survey from Italy that has shown the presence of ENNs in spelt grains.⁴¹ Moreover, it is not only cereal crops that can be contaminated by ENNs. Other food commodities include sorghum, for which significant levels of ENNs were quantified by Oueslati et al., but also potato, apple, sugar beet, and coffee.^{20,45,46,55–57} Altogether, the ENN occurrence data indicate that these mycotoxins can be produced on a wide variety of host plants cultivated in a wide range of pedo-climatic context, suggesting that the *Fusarium* species able to produce ENNs have a wide range of ecological niches and/or that the ecophysiological conditions conducive to ENN biosynthesis are broad.

■ FUSARIUM SPECIES RESPONSIBLE FOR THE CONTAMINATION OF CROPS WITH ENNS

ENN-producing fungal genera include *Fusarium* but also *Halosarpheia* and *Verticillium*.^{58,59} With regard to *Fusarium*, the first species described as an ENN producer was *Fusarium orthoceras* var. *enniatinum*, characterized by Gaumann and collaborators.⁶⁰ Since this first report, nearly 30 *Fusarium* species have been reported to be able to produce ENNs. These species that belong to eight different *Fusarium* species complexes are gathered in Figure 3, together with the host plant from which they have been isolated.^{1,10,17,20,29,56,62–85} With regard to small grain cereals, strains from three common FHB complexes are associated with ENN production, the *Fusarium tricinatum*, *Fusarium sambucinum*, and *Fusarium sporotrichioides* complexes.⁸⁵ In maize and rice, in addition to ENN-producing strains of the three former complexes, strains from the Fujikuroi complex (*F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. temperatum*, and *F. ramigenum*) contribute to the contamination

of grains.⁶⁴ If one now considers the other host plants that include a wide variety of plant species, contaminating ENN-producing species belong to four supplementary *Fusarium* complexes (*Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium lateritium*, and *Fusarium solani*) in addition to the four previously mentioned. As it clearly appears on Figure 3, some species, such as *F. avenaceum* and *F. tricinatum*, are characterized by a broad spectrum of hosts, including cereals, cabbage, and pea. Strains from these two species have also been designated as the most efficient ENN producers by Stepień and Waskiewicz, who have compared the amounts of ENNs produced by a set of 58 strains belonging to 20 species cultured on a rice medium, corroborating the earlier studies of Yli-Mattila et al. and Jestoi et al. that evidenced the high potential of ENN production of *F. avenaceum* and *F. tricinatum* isolates.^{64,82,86} According to the previous reports and that of Covarelli et al., *F. avenaceum* and *F. tricinatum* isolates showed high variability in their toxigenic potential; this intraspecific variability is not associated with differences in the *esn* gene sequence.^{43,64,82,86} In addition to *F. graminearum*, *F. avenaceum* and *F. tricinatum* are among the most common *Fusarium* species isolated from small grain cereals, as corroborated by several survey studies from different countries, including Switzerland, Norway, Finland, Ireland, Italy, the United Kingdom, and Hungary.^{28,78,87,88} For example, *F. avenaceum* strains were shown to represent 61% of the isolates collected from durum wheat grains cultivated in Italy.⁴² More recently, the DNA amounts of three ENN-producing species, *F. avenaceum*, *F. tricinatum*, and *F. poae*, have been quantified in more than 1000 samples of small grain cereals (soft and durum wheat, winter and spring barley, and triticale) harvested in France and compared to the levels of ENNs.⁸ According to the reported data, *F. avenaceum* and *F. tricinatum* were highlighted as the major contributors of grain contamination with ENNs, with however some differences according to the considered crop. Indeed, while *F. avenaceum* was found as the leading ENN producer on triticale, the contamination of durum wheat and spring barley was primarily associated with *F. tricinatum*.⁸ Similarly, levels of ENNs quantified in oat samples collected in Sweden and Norway have been shown as mostly related to infection with *F. tricinatum* and *F. avenaceum*.^{27,32} A significant positive correlation between *F. avenaceum* DNA and ENN levels in spring wheat, barley, and oat cultivated in Finland was also reported by Yli-Mattila et al.⁸⁹

■ ENN BIOSYNTHETIC PATHWAY

The chemical pathway of the biosynthesis of ENNs is well-documented.^{10,15,61} For a clear and accurate description on the mechanisms by which the NRPS *esn* proceeds to release the wide spectrum of ENN derivatives using three D-2-hydroxyisovaleric acids and three L-amino acids as precursors and adenosine triphosphate (ATP) and S-adenosylmethionine as cofactors, we strongly encourage the reader to consider the publication of Süssmuth and collaborators.⁹⁰ A schematic model for the biosynthesis of the four main ENNs encountered in European cereal harvests, i.e., ENNs A, A1, B, and B1, is reported in Figure 1. The different steps of this biosynthetic pathway can be summarized as follows. The first step involves the activation of substrates as acyl adenylates in an ATP-dependent manner by the *esn* adenylation domains (A1 and A2). This step is followed by N-methylation of the amino acids at the N-methyl transferase domain (M) contained in module 2. Activated substrates are then transferred to thiolation domains (T1 and T2), where they are covalently bound as thioesters. They are subsequently

presented to the C1 and C2 condensation domains to form dipeptidol intermediates. Once formed, the dipeptidol units are stored at the so-called “waiting position” (domain T3) to ultimately condense with two other dipeptidols (C3 domain) in an iterative manner to release a linear hexadepsipeptide and, after cyclization, the active ENNs. The broad substrate specificity of *esn* that can accept different amino acids explains the wide spectrum of ENNs; up to 29 derivatives have been identified up to now. Besides, *esn* from different *Fusarium* species were shown to have different specificities for amino acids, leading to different profiles of produced ENNs as demonstrated for *Fusarium sambucinum* and *Fusarium lateritium* species by Pieper and collaborators.⁹¹ These different affinities for amino acid substrates could be linked to differences in the sequence of the *esn* gene between ENN-producing *Fusarium* species.⁶⁴ In addition to *esn*, only one other enzyme has been proven so far to be required for the biosynthesis of ENNs. This enzyme, first purified in 1992 in *F. sambucinum*, is the ketoisovalerate reductase, called 2-Kiv reductase, that catalyzes the reversible reduction of 2-ketoisovalerate to D-hydroxyvalerate in the presence of NADPH.⁹² Since the first characterization in 1992, the 2-Kiv reductase in ENN-producing *Fusarium* species has been the subject of very few biochemical or genetic studies. The most recent and in-depth available data concern a 2-Kiv reductase identified from a beauvericin-producing *F. proliferatum* strain of marine origin.⁹³

With regard to the genetic basis of the biosynthesis of ENNs, with the exception of an extensive analysis of the NRPS *esn* gene, very little has been published.^{64,69,94} Surprisingly, while the genomes of several major ENN-producing *Fusarium* species have been sequenced, including those of *F. avenaceum* and *F. tricinctum*, no gene cluster associated with ENNs has been characterized thus far.^{95,96} In fungi, genes involved in pathways that synthesize secondary metabolites are typically located next to each other in the genome and organized in contiguous gene clusters. This organization is thought to confer a selective advantage to the producing fungal species; being linked together, secondary metabolite genes segregate as a unit, enabling acquisition, duplication, or loss of entire metabolic pathways.⁹⁷ Biosynthetic gene clusters have been associated with the vast majority of mycotoxins, including NRPS mycotoxins.⁹⁴ Typical configuration of a mycotoxin gene cluster includes a backbone gene responsible for the synthesis of the mycotoxin precursor, one or more genes responsible for the chemical modifications of the mycotoxin precursor, one or more genes coding for transporter protein(s), and one or more genes coding for transcription factors involved in the cluster regulation. Among the most recently identified gene clusters related to *Fusarium* NRPS mycotoxins, we can mention the biosynthetic cluster of gramine and fusaric acid.^{98,99} A gene cluster associated with the biosynthesis of beauvericin, a cyclohexadepsipeptide analogue of ENN, has also been identified in a marine strain of *F. proliferatum*.¹⁰⁰ The previous authors have described a ± 43 kb contig that, in addition to the genes encoding a putative beauvericin synthetase and a 2-Kiv reductase, includes 13 open reading frames (ORFs), among which one encodes a polypeptide with a high degree of similarity with a transporter of the ABC-multidrug exporter family and one ORF that encodes a putative transcriptional regulator of the family of zinc cluster proteins. Hypothetical thioesterase, triacyl-glycerol lipase, chitinase, zinc-dependent metalloprotease, and muramidase were the enzymes potentially encoded by the additional identified ORFs.¹⁰⁰ With the increased availability of genomic

and transcriptomic data with regard to ENN-producing fungal strains, it is quite likely that the description of the gene cluster required for the biosynthesis of ENNs will be published in the very near future.

■ ABIOTIC DETERMINANTS AND GENETIC REGULATION OF THE ENN BIOSYNTHESIS

Phytopathogenic *Fusarium* species, as the vast majority of filamentous fungi, have a great capacity to adapt to environmental variations. An increasing number of studies published in the past decade revealed important interconnections between toxin production and stress response pathways, suggesting that the production of mycotoxins plays a key role in the fungal adaptive response to stresses.^{101–105} External parameters, including temperature, pH, light, water activity, substrate composition, carbon and nitrogen source, and oxidative and salt stress, can have a strong influence on the biosynthesis of mycotoxins.^{106–111} Relevant information with regard to the ecophysiological influence of abiotic stresses on mycotoxin production is essential for prioritizing and improving intervention strategies and assisting the building of decision support systems. This knowledge is also crucial as input for the development of toxin occurrence predictive tools to be ran under various climate change scenarios and, therefore, to help anticipate the evolution of the mycotoxin-associated risks as a result of climate change. However, studies addressing the impact of abiotic factors have been mainly concentrated on legislated mycotoxins, intensely on aflatoxin, ochratoxin, DON, and fumonisin, and only limited data are available with regard to environmental factors underpinning the production of ENNs. Most of the published reports have investigated the influence of nutritional factors, mainly carbon and nitrogen sources, with the aim to optimize the yield of these cyclic hexadepsipeptides.^{109,112–115} Indeed, the *in vitro* cytotoxicity properties and, particularly, anticancer activities make ENNs a potential drug for human health diseases.^{116,117} The previous studies consistently show that ENNs can be produced on a broad spectrum of carbon sources and that NaNO_3 was the best inorganic nitrogen source, although variation between isolates was highlighted. Thus, for *F. oxysporum* and *F. avenaceum* isolates, sucrose was reported as one of the optimal sources of carbon for ENN production and lactose was the less permissive source, whereas the highest ENN yield was obtained with lactose for *F. sambucinum*.^{113–115,118} The effect of the temperature and combinations of water activity (a_w) and temperature on ENN production have also been investigated.^{113,119} In both of the above-mentioned reports, high levels of ENNs were quantified whatever the applied culture conditions. A temperature of 30 °C was proven to be the most favorable for toxin yield by *F. oxysporum*, while *F. avenaceum* was shown to produce high and equal amounts of ENNs under different a_w /temperature combinations (a_w of 0.994/15 °C, a_w of 0.994/25 °C, and a_w of 0.960/25 °C).^{113,119} Even though the impact of abiotic factors on ENN production has been the subject of a small number of studies, all published data involving *F. avenaceum* isolates indicate a limited influence of culture conditions on the ENN yield, which certainly explains the wide range of plant hosts cultivated under various climatic conditions that can be contaminated by these emerging mycotoxins (Figures 2 and 3). The mechanistic clues that can explain the regulation of ENN production by environmental factors has not been deciphered. As demonstrated for other fungal secondary metabolites (for a review, see ref 102), the regulation of ENNs is likely to operate on different regulatory levels associating

pathway-specific and global regulators, signal transduction pathways, and epigenetic control.^{100,102} First indications can be derived from the analysis of *F. avenaceum* genomic data that have highlighted an overrepresentation of genes involved in stress-related responses and signal transduction pathways, suggesting that this fungal species has a high potential to sense and transduce signals from its environment.⁹⁵

CONCLUSION

This review clearly illustrated that, while we are rapidly gaining an understanding on regulated mycotoxins produced by *Fusarium* species in cereals, there is still a great gap in the knowledge related to emerging mycotoxins, including ENNs. However, these mycotoxins are frequently observed in cereal harvests with contamination levels that could exceed 100 mg/kg in some situations. Moreover, the producing species, mainly *F. avenaceum* and *F. tricinctum* in European areas, are characterized by a very broad specificity of plant hosts that certainly results from a high potential to adapt to diverse environments. An extended number of studies published in the past decade have evidenced that mechanisms involved in the adaptation of fungi to their environment also govern the biosynthesis of mycotoxins. However, with regard to the regulation of ENNs in *Fusarium*, there is still much to do to confirm the existence of these regulatory pathways evidenced for other toxigenic species and to highlight their interconnection with the regulation of mycotoxin biosynthesis. Thus, research efforts should be pursued to fill these knowledge gaps and provide tools to improve strategies aiming at controlling the levels of this class of mycotoxins in food and feed products.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Florence Richard-Forget – INRAE, UR 1264, Unité MycSA, 33883 Villenave d'Ornon, France; Phone: +33-5-57-12-24-83; Email: florence.forget@inrae.fr

Authors

Charlotte Gautier – INRAE, UR 1264, Unité MycSA, 33883 Villenave d'Ornon, France; orcid.org/0000-0001-7440-2967

Laetitia Pinson-Gadais – INRAE, UR 1264, Unité MycSA, 33883 Villenave d'Ornon, France

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.0c00411>

Funding

The authors are grateful to INRAE (MICA Department) and the Nouvelle Aquitaine Region (BIOAXOM Project 2017 1R20203) for their financial support as part of a Ph.D. grant.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ABBREVIATIONS USED

DON, deoxynivalenol; EFSA, European Food Safety Authority; ENN, enniatin; Esyn, enniatin synthetase; FHB, *Fusarium* head blight; GER, *Gibberella* ear rot; NIV, nivalenol; NRPS, non-ribosomal peptide synthetase; ZEA, zearalenone

REFERENCES

- (1) Ferrigo, D.; Raiola, A.; Causin, R. *Fusarium* toxins in cereals: Occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules* **2016**, *21* (5), 627.
- (2) Beres, B. L.; Brülé-Babel, A. L.; Ye, Z.; Graf, R. J.; Turkington, T. K.; Harding, M. W.; Kutcher, H. R.; Hooker, D. C. Exploring Genotype × Environment × Management Synergies to Manage *Fusarium* Head Blight in Wheat. *Can. J. Plant Pathol.* **2018**, *40* (2), 179–188.
- (3) Bernhoft, A.; Torp, M.; Clasen, P.-E.; Loes, A.-K.; Kristoffersen, A. B. Influence of Agronomic and Climatic Factors on *Fusarium* Infestation and Mycotoxin Contamination of Cereals in Norway. *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, *29* (7), 1129–1140.
- (4) Smith, M.-C.; Madec, S.; Coton, E.; Hymery, N. Natural Co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their *in vitro* combined toxicological effects. *Toxins* **2016**, *8* (4), 94.
- (5) Yazar, S.; Omurtag, G. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9* (11), 2062–2090.
- (6) European Commission (EC). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **2006**, L364, 5–24.
- (7) Chen, Y.; Kistler, H. C.; Ma, Z. *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: Biosynthesis, regulation, and management. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2019**, *57* (1), 15–39.
- (8) Orlando, B.; Grignon, G.; Vitry, C.; Kashefifard, K.; Valade, R. *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Res.* **2019**, *35* (4), 369–380.
- (9) Fraeyman, S.; Croubels, S.; Devreese, M.; Antonissen, G. Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: Occurrence, toxicity and toxicokinetics. *Toxins* **2017**, *9* (7), 228.
- (10) Jestoi, M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48* (1), 21–49.
- (11) Gruber-Dorninger, C.; Novak, B.; Nagl, V.; Berthiller, F. Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7052–7070.
- (12) Santini, A.; Meca, G.; Uhlig, S.; Ritieni, A. Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: Occurrence in food—A review. *World Mycotoxin J.* **2012**, *5* (1), 71–81.
- (13) Sy-Cordero, A. A.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Revisiting the Enniatins: A review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. *J. Antibiot.* **2012**, *65* (11), 541–549.
- (14) Richter, L.; Wanka, F.; Boecker, S.; Storm, D.; Kurt, T.; Vural, Ö.; Süßmuth, R.; Meyer, V. Engineering of *Aspergillus niger* for the production of secondary metabolites. *Fungal Biol. Biotechnol.* **2014**, *1* (1), 4.
- (15) Hornbogen, T.; Glinski, M.; Zocher, R. Biosynthesis of Depsipeptide Mycotoxins in *Fusarium*. In *Mycotoxins in Plant Disease*; Logrieco, A., Bailey, J. A., Corazza, L., Cooke, B. M., Eds.; Springer: Dordrecht, Netherlands, 2002; pp 713–718, DOI: [10.1007/978-94-010-0001-7_15](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0001-7_15).
- (16) Zocher, R.; Keller, U.; Kleinkauf, H. Enniatin synthetase, a novel type of multifunctional enzyme catalyzing depsipeptide synthesis in *Fusarium oxysporum*. *Biochemistry* **1982**, *21* (1), 43–48.
- (17) Haese, A.; Schubert, M.; Herrmann, M.; Zocher, R. Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalyzing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol. Microbiol.* **1993**, *7* (6), 905–914.
- (18) Prosperini, A.; Berrada, H.; Ruiz, M. J.; Caloni, F.; Coccini, T.; Spicer, L. J.; Perego, M. C.; Lafranconi, A. A review of the mycotoxin enniatin B. *Front. Public Health* **2017**, *5*, 304.
- (19) Firáková, S.; Proksa, B.; Sturdíková, M. Biosynthesis and biological activity of enniatins. *Pharmazie* **2007**, No. 8, 563–568.
- (20) Herrmann, M.; Zocher, R.; Haese, A. Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62* (2), 393–398.
- (21) Rodríguez-Carrasco, Y.; Heilos, D.; Richter, L.; Süßmuth, R. D.; Heffeter, P.; Sulyok, M.; Kenner, L.; Berger, W.; Dornetshuber-Fleiss,

R. Mouse tissue distribution and persistence of the food-born fusariotoxins enniatin B and beauvericin. *Toxicol. Lett.* **2016**, *247*, 35–44.

(22) Fraeyman, S.; Devreese, M.; Antonissen, G.; De Baere, S.; Rychlik, M.; Croubels, S. Comparative oral bioavailability, toxicokinetics, and biotransformation of enniatin B1 and enniatin B in broiler chickens. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (38), 7259–7264.

(23) Maranghi, F.; Tassinari, R.; Narciso, L.; Tait, S.; Rocca, C. L.; Felice, G. D.; Butteroni, C.; Corinti, S.; Barletta, B.; Cordelli, E.; Pacchierotti, F.; Eleuteri, P.; Villani, P.; Hegarat, L. L.; Fessard, V.; Reale, O. *In vivo* toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study *in vivo* toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENN B). *EFS3* **2018**, *15* (5), 1406E.

(24) European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the Risks to Human and Animal Health Related to the Presence of Beauvericin and Enniatins in Food and Feed. *EFSA J.* **2014**, *12* (8), 3802.

(25) Kolf-Clauw, M.; Sassahara, M.; Lucio, J.; Rubira-Gerez, J.; Alassane-Kpembé, I.; Lyazghi, F.; Borin, C.; Oswald, I. P. The emerging mycotoxin, enniatin B1, down-modulates the gastrointestinal toxicity of T-2 toxin *in vitro* on intestinal epithelial cells and *Ex vivo* on intestinal explants. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87* (12), 2233–2241.

(26) Fernández-Blanco, C.; Font, G.; Ruiz, M.-J. Interaction effects of enniatin B, deoxynivalenol and alternariol in Caco-2 Cells. *Toxicol. Lett.* **2016**, *241*, 38–48.

(27) Uhlig, S.; Torp, M.; Heier, B. T. Beauvericin and enniatins A, A1, B and B1 in Norwegian grain: A Survey. *Food Chem.* **2006**, *94* (2), 193–201.

(28) Jestoi, M.; Rokka, M.; Yli-Mattila, T.; Parikka, P.; Rizzo, A.; Peltonen, K. Presence and concentrations of the *Fusarium*-related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in Finnish grain samples. *Food Addit. Contam.* **2004**, *21* (8), 794–802.

(29) Yli-Mattila, T.; Paavanen-Huhtala, S.; Jestoi, M.; Parikka, P.; Hietaniemi, V.; Gagkaeva, T.; Sarlin, T.; Haikara, A.; Laaksonen, S.; Rizzo, A. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* in cereal grains in Finland and Russia. *Arch. Phytopathol. PFL.* **2008**, *41* (4), 243–260.

(30) Svingen, T.; Lund Hansen, N.; Taxvig, C.; Vinggaard, A. M.; Jensen, U.; Have Rasmussen, P. Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high hepatotoxicity on a high-content imaging platform. *Environ. Toxicol.* **2017**, *32* (5), 1658–1664.

(31) Lindblad, M.; Gidlund, A.; Sulyok, M.; Börjesson, T.; Krska, R.; Olsen, M.; Fredlund, E. Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish wheat — Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167* (2), 284–291.

(32) Fredlund, E.; Gidlund, A.; Sulyok, M.; Börjesson, T.; Krska, R.; Olsen, M.; Lindblad, M. deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish Oats — Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167* (2), 276–283.

(33) Gromadzka, K.; Górna, K.; Chelkowski, J.; Waśkiewicz, A. Mycotoxins and related *Fusarium* species in preharvest maize ear rot in Poland. *Plant, Soil Environ.* **2016**, *62* (8), 348–354.

(34) Bryła, M.; Waśkiewicz, A.; Podolska, G.; Szymczyk, K.; Jędrzejczak, R.; Damaziak, K.; Sulek, A. Occurrence of 26 mycotoxins in the grain of cereals cultivated in Poland. *Toxins* **2016**, *8* (6), 160.

(35) Decler, M.; Landschoot, S.; De Saeger, S.; Rajkovic, A.; Audenaert, K. Impact of fungicides and weather on cyclodepsipeptide-producing *Fusarium* Spp. and beauvericin and enniatin levels in wheat grains. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99* (1), 253–262.

(36) Goertz, A.; Zuehlke, S.; Spittler, M.; Steiner, U.; Dehne, H. W.; Waalwijk, C.; de Vries, I.; Oerke, E. C. *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* **2010**, *128* (1), 101–111.

(37) Stanciu, O.; Juan, C.; Miere, D.; Loghin, F.; Mañes, J. Presence of enniatins and beauvericin in Romanian wheat samples: From raw material to products for direct human consumption. *Toxins* **2017**, *9* (6), 189.

(38) Jajić, I.; Dudaš, T.; Krstović, S.; Krska, R.; Sulyok, M.; Bagi, F.; Savić, Z.; Guljaš, D.; Stankov, A. Emerging *Fusarium* mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin in Serbian maize. *Toxins* **2019**, *11* (6), 357.

(39) Tolosa, J.; Rodríguez-Carrasco, Y.; Ferrer, E.; Mañes, J. Identification and quantification of enniatins and beauvericin in animal feeds and their ingredients by LC-QTRAP/MS/MS. *Metabolites* **2019**, *9* (2), 33.

(40) Meca, G.; Zinedine, A.; Blesa, J.; Font, G.; Mañes, J. Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on the Spanish markets. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48* (5), 1412–1416.

(41) Juan, C.; Ritieni, A.; Mañes, J. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food Chem.* **2013**, *141* (3), 1747–1755.

(42) Beccari, G.; Colasante, V.; Tini, F.; Senatore, M. T.; Prodi, A.; Sulyok, M.; Covarelli, L. Causal Agents of *Fusarium* Head Blight of durum wheat (*Triticum Durum* Desf.) in central Italy and their *in vitro* biosynthesis of secondary metabolites. *Food Microbiol.* **2018**, *70*, 17–27.

(43) Covarelli, L.; Beccari, G.; Prodi, A.; Generotti, S.; Etruschi, F.; Meca, G.; Juan, C.; Mañes, J. Biosynthesis of beauvericin and enniatins *in vitro* by wheat *Fusarium* species and natural grain contamination in an area of central Italy. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 618–626.

(44) Zinedine, A.; Meca, G.; Mañes, J.; Font, G. Further data on the occurrence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), fusaproliferin and beauvericin in raw cereals commercialized in morocco. *Food Control* **2011**, *22* (1), 1–5.

(45) Oueslati, S.; Meca, G.; Mliki, A.; Ghorbel, A.; Mañes, J. Determination of *Fusarium* mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia. *Food Control* **2011**, *22* (8), 1373–1377.

(46) Oueslati, S.; Berrada, H.; Mañes, J.; Juan, C. Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. *Food Control* **2018**, *84*, 362–369.

(47) Abdallah, M. F.; Girgin, G.; Baydar, T.; Krska, R.; Sulyok, M. Occurrence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in animal feed and maize samples from Egypt using LC-MS/MS: Toxic fungal and bacterial metabolites in feed and maize from Egypt. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97* (13), 4419–4428.

(48) Abia, W. A.; Warth, B.; Sulyok, M.; Krska, R.; Tchana, A. N.; Njoh, P. B.; Dutton, M. F.; Moundipa, P. F. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control* **2013**, *31* (2), 438–453.

(49) Warth, B.; Parich, A.; Atehnkeng, J.; Bandyopadhyay, R.; Schuhmacher, R.; Sulyok, M.; Krska, R. Quantitation of mycotoxins in food and feed from Burkina Faso and Mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (36), 9352–9363.

(50) Han, X.; Xu, W.; Zhang, J.; Xu, J.; Li, F. Natural occurrence of beauvericin and enniatins in corn- and wheat-based samples harvested in 2017 collected from Shandong province, China. *Toxins* **2018**, *11* (1), 9.

(51) Tittlemier, S. A.; Blagden, R.; Chan, J.; Gaba, D.; McKendry, T.; Pleskach, K.; Roscoe, M. *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins present in Canadian wheat and durum harvest samples. *Can. J. Plant Pathol.* **2019**, *41* (3), 403–414.

(52) Tittlemier, S. A.; Roscoe, M.; Trelka, R.; Gaba, D.; Chan, J. M.; Patrick, S. K.; Sulyok, M.; Krska, R.; McKendry, T.; Gräfenhan, T. *Fusarium* damage in small cereal grains from Western Canada. 2. Occurrence of *Fusarium* toxins and their source organisms in durum wheat harvested in 2010. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (23), 5438–5448.

(53) Sifou, A.; Meca, G.; Serrano, A. B.; Mahnine, N.; El Abidi, A.; Mañes, J.; El Azzouzi, M.; Zinedine, A. First report on the presence of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), beauvericin and fusaproliferin in rice on the Moroccan retail markets. *Food Control* **2011**, *22* (12), 1826–1830.

- (54) Nazari, F.; Sulyok, M.; Kobarfard, F.; Yazdanpanah, H.; Krska, R. Evaluation of emerging *Fusarium* mycotoxins beauvericin, enniatins, fusaproliferin and moniliformin in domestic rice in Iran. *Iranian J. Pharm. Res.* **2015**, *14* (2), 505–512.
- (55) Sørensen, J. L.; Phipps, R. K.; Nielsen, K. F.; Schroers, H.-J.; Frank, J.; Thrane, U. Analysis of *Fusarium avenaceum* metabolites produced during wet apple core rot. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (4), 1632–1639.
- (56) Christ, D. S.; Gödecke, R.; von Tiedemann, A.; Varrelmann, M. Pathogenicity, symptom development, and mycotoxin formation in wheat by *Fusarium* species frequently isolated from sugar beet. *Phytopathology* **2011**, *101* (11), 1338–1345.
- (57) García-Moraleja, A.; Font, G.; Mañes, J.; Ferrer, E. Simultaneous Determination of Mycotoxin in Commercial Coffee. *Food Control* **2015**, *57*, 282–292.
- (58) Lin, Y.; Wang, J.; Wu, X.; Zhou, S.; Vrijmoed, L. L. P.; Jones, E. B. G. A Novel compound enniatin G from the mangrove fungus *Halosarpheia* Sp. (Strain 732) from the South China Sea. *Aust. J. Chem.* **2002**, *55* (3), 225.
- (59) Supothina, S.; Isaka, M.; Kirtikara, K.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. Enniatin production by the entomopathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. *J. Antibiot.* **2004**, *57* (11), 732–738.
- (60) Gäumann, E.; Roth, S.; Ettlinger, L.; Plattner, P. A.; Nager, U. Enniatin, ein neues, gegen Mykobakterien wirksames Antibiotikum. *Experientia* **1947**, *3* (5), 202–203.
- (61) Glinski, M.; Urbanke, C.; Hornbogen, T.; Zocher, R. Enniatin synthetase is a monomer with extended structure: Evidence for an intramolecular reaction mechanism. *Arch. Microbiol.* **2002**, *178* (4), 267–273.
- (62) Visconti, A.; Minervini, F.; Solfrizzo, M.; Bottalico, C.; Lucivero, G. Toxicity of some *Fusarium* section Sporotrichiella strains in relation to mycotoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58* (2), 769–772.
- (63) Logrieco, A.; Altomare, C.; Moretti, A.; Bottalico, A. Cultural and toxigenic variability in *Fusarium acuminatum*. *Mycol. Res.* **1992**, *96* (6), 518–523.
- (64) Stepień, L.; Waśkiewicz, A. Sequence divergence of the enniatin synthase gene in relation to production of beauvericin and enniatins in *Fusarium* species. *Toxins* **2013**, *5* (3), 537–555.
- (65) Moretti, A.; Mulé, G.; Ritieni, A.; Logrieco, A. Further data on the production of beauvericin, enniatins and fusaproliferin and toxicity to *Artemia salina* by *Fusarium* species of *Gibberella fujikuroi* Species Complex. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *118* (2), 158–163.
- (66) Logrieco, A.; Mulé, G.; Moretti, A.; Bottalico, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. In *Mycotoxins in Plant Disease*; Logrieco, A., Bailey, J. A., Corazza, L., Cooke, B. M., Eds.; Springer: Dordrecht, Netherlands, 2002; pp 597–609, DOI: 10.1007/978-94-010-0001-7_1.
- (67) Langseth, W.; Bernhoft, A.; Rundberget, T.; Kosiak, B.; Gareis, M. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* **1998**, *144* (2), 103–113.
- (68) Adejumo, T. O.; Hettwer, U.; Karlovsky, P. Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *116* (3), 350–357.
- (69) Liuzzi, V.; Mirabelli, V.; Cimmarusti, M.; Haidukowski, M.; Leslie, J.; Logrieco, A.; Caliendo, R.; Fanelli, F.; Mulé, G. Enniatin and beauvericin biosynthesis in *Fusarium* species: Production profiles and structural determinant prediction. *Toxins* **2017**, *9* (2), 45.
- (70) Song, H.-H.; Lee, H.-S.; Lee, C. A New cytotoxic cyclic pentadepsipeptide, neo-*N*-methylsalsalvamide produced by *Fusarium solani* KCCM90040, isolated from potato. *Food Chem.* **2011**, *126* (2), 472–478.
- (71) Tsantrizos, Y. S.; Xu, X.-J.; Sauriol, F.; Hynes, R. C. Novel Quinazolinones and Enniatins from *Fusarium lateritium* Nees. *Can. J. Chem.* **1993**, *71* (9), 1362–1367.
- (72) Moretti, A.; Belisario, A.; Tafuri, A.; Ritieni, A.; Corazza, L.; Logrieco, A. Production of beauvericin by different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, the *Fusarium* wilt agent of muskmelon. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108* (7), 661–666.
- (73) Stepień, L.; Gromadzka, K.; Chelkowski, J.; Basińska-Barczak, A.; Lalak-Kańczugowska, J. Diversity and mycotoxin production by *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* as causal agents of pre-harvest *Fusarium* maize ear rot in Poland. *J. Appl. Genet.* **2019**, *60* (1), 113–121.
- (74) Burmeister, H. R. Enniatin production by *Fusarium tricinctum* and its effect on germinating wheat seeds. *Phytopathology* **1987**, *77* (10), 1483.
- (75) Altomare, C.; Logrieco, A.; Bottalico, A.; Mulé, G.; Moretti, A.; Evidente, A. Production of type A trichothecenes and enniatin B by *Fusarium sambucinum* fückel sensu lato. *Mycopathologia* **1995**, *129* (3), 177–181.
- (76) Miller, J. D.; MacKenzie, S. Secondary metabolites of *Fusarium venenatum* strains with deletions in the *TriS* gene encoding trichodiene synthetase. *Mycologia* **2000**, *92* (4), 764–771.
- (77) Song, H.-H.; Lee, H.-S.; Jeong, J.-H.; Park, H.-S.; Lee, C. Diversity in beauvericin and enniatins H, I, and MK1688 by *Fusarium oxysporum* isolated from potato. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *122* (3), 296–301.
- (78) Vogelsgang, S.; Sulyok, M.; Hecker, A.; Jenny, E.; Krska, R.; Schuhmacher, R.; Forrer, H.-R. Toxigenicity and pathogenicity of *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum* on wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* **2008**, *122* (2), 265–276.
- (79) Stakheev, A. A.; Khairulina, D. R.; Zavriev, S. K. Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *225*, 27–37.
- (80) Marin, S.; Ramos, A. J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 218–237.
- (81) Minnaar-Ontong, A.; Herselman, L.; Kriel, W.-M.; Leslie, J. F. Morphological characterization and trichothecene genotype analysis of a *Fusarium* Head Blight population in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *148* (2), 261–269.
- (82) Jestoi, M. N.; Paavanan-Huhtala, S.; Parikka, P.; Yli-Mattila, T. *In vitro* and *in vivo* mycotoxin production of *Fusarium* species isolated from Finnish grains. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **2008**, *41* (8), 545–558.
- (83) Thrane, U.; Adler, A.; Clasen, P.-E.; Galvano, F.; Langseth, W.; Lew, H.; Logrieco, A.; Nielsen, K. F.; Ritieni, A. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95* (3), 257–266.
- (84) Scauflaire, J.; Gourgue, M.; Callebaut, A.; Munaut, F. *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. *Eur. J. Plant Pathol.* **2012**, *133* (4), 911–922.
- (85) Villani, A.; Proctor, R. H.; Kim, H.-S.; Brown, D. W.; Logrieco, A. F.; Amatulli, M. T.; Moretti, A.; Susca, A. Variation in secondary metabolite production potential in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex revealed by comparative analysis of 13 genomes. *BMC Genomics* **2019**, *20* (1), 314.
- (86) Yli-Mattila, T.; Paavanan-Huhtala, S.; Parikka, P.; Jestoi, M.; Klemsdal, S. S.; Rizzo, A. Genetic variation, real-time PCR, metabolites and mycotoxins of *Fusarium avenaceum* and related species. *Mycotoxin Res.* **2006**, *22* (2), 79–86.
- (87) Logrieco, A.; Rizzo, A.; Ferracane, R.; Ritieni, A. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* Head Blight. *Appl. Environ. Microb.* **2002**, *68* (1), 82–85.
- (88) Xu, X.-M.; Parry, D. W.; Nicholson, P.; Thomsett, M. A.; Simpson, D.; Edwards, S. G.; Cooke, B. M.; Doohan, F. M.; Brennan, J. M.; Moretti, A.; Tocco, G.; Mule, G.; Hornok, L.; Giczey, G.; Tatnell, J. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *Eur. J. Plant Pathol.* **2005**, *112* (2), 143–154.
- (89) Yli-Mattila, T.; Parikka, P.; Lahtinen, T.; Ramo, S.; Kokkonen, M.; Rizzo, A.; Jestoi, M.; Hietaniemi, V. *Fusarium* DNA levels in Finnish cereal grains. In *Current Advances in Molecular Mycology*; Gherbawy, Y.,

Mach, L.; Rai, M., Eds.; Nova Science Publishers: New York, 2009; pp 107–138.

(90) Süßmuth, R.; Müller, J.; von Döhren, H.; Molnár, I. Fungal cyclooligomerdepsipeptides: From classical biochemistry to combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28* (1), 99–124.

(91) Pieper, R.; Kleinkauf, H.; Zocher, R. Enniatin synthetases from different fusaria exhibiting distinct amino acid specificities. *J. Antibiot.* **1992**, *45* (8), 1273–1277.

(92) Lee, C.; Gorisch, H.; Kleinkauf, H.; Zocher, R. A highly specific D-hydroxyisovalerate dehydrogenase from the enniatin producer *Fusarium sambucinum*. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (17), 11741–11744.

(93) Zhang, T.; Jia, X.; Zhuo, Y.; Liu, M.; Gao, H.; Liu, J.; Zhang, L. Cloning and characterization of a novel 2-ketoisovalerate reductase from the beauvericin producer *Fusarium proliferatum* LF061. *BMC Biotechnol.* **2012**, *12* (1), 55.

(94) Desjardins, A. E.; Proctor, R. H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119* (1–2), 47–50.

(95) Lysøe, E.; Harris, L. J.; Walkowiak, S.; Subramaniam, R.; Divon, H. H.; Riiser, E. S.; Llorens, C.; Gabaldón, T.; Kistler, H. C.; Jonkers, W.; Kolseth, A.-K.; Nielsen, K. F.; Thrane, U.; Frandsen, R. J. N. The genome of the generalist plant pathogen *Fusarium avenaceum* is enriched with genes involved in redox, signaling and secondary metabolism. *PLoS One* **2014**, *9* (11), No. e112703.

(96) Ponts, N.; Richard-Forget, F.; Zhang, H.; Barroso, G.; Zhao, C. Genome sequence of the emerging mycotoxin-producing filamentous fungus *Fusarium tricinctum* strain INRA104. *Genome Announc.* **2018**, *6* (25), No. e00509-18.

(97) Rokas, A.; Wisecaver, J. H.; Lind, A. L. The birth, evolution and death of metabolic gene clusters in fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16* (12), 731–744.

(98) Bahadoor, A.; Brauer, E. K.; Bosnich, W.; Schneiderman, D.; Johnston, A.; Aubin, Y.; Blackwell, B.; Melanson, J. E.; Harris, L. J. Gramillin A and B: Cyclic lipopeptides identified as the nonribosomal biosynthetic products of *Fusarium graminearum*. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (48), 16783–16791.

(99) Westphal, K. R.; Nielsen, K. A. H.; Wollenberg, R. D.; Møllehøj, M. B.; Bachleitner, S.; Studt, L.; Lysøe, E.; Giese, H.; Wimmer, R.; Sørensen, J. L.; Sondergaard, T. E. Fusaoctaxin A, an example of a two-step mechanism for non-ribosomal peptide assembly and maturation in fungi. *Toxins* **2019**, *11* (5), 277.

(100) Zhang, T.; Zhuo, Y.; Jia, X.; Liu, J.; Gao, H.; Song, F.; Liu, M.; Zhang, L. Cloning and characterization of the gene cluster required for beauvericin biosynthesis in *Fusarium proliferatum*. *Sci. China: Life Sci.* **2013**, *56* (7), 628–637.

(101) Keller, N. P. Fungal secondary metabolism: Regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17* (3), 167–180.

(102) Macheleidt, J.; Mattern, D. J.; Fischer, J.; Netzker, T.; Weber, J.; Schroeckh, V.; Valiante, V.; Brakhage, A. A. Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annu. Rev. Genet.* **2016**, *50* (1), 371–392.

(103) Ponts, N. Mycotoxins are a component of *Fusarium graminearum* stress-response system. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1234.

(104) Montibus, M.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F.; Barreau, C.; Ponts, N. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **2015**, *41* (3), 295–308.

(105) Merhej, J.; Richard-Forget, F.; Barreau, C. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: Recent advances and new insights. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91* (3), 519–528.

(106) Tannous, J.; Atoui, A.; El Khoury, A.; Francis, Z.; Oswald, I. P.; Puel, O.; Lteif, R. A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: Effect of temperature, PH, and water activity. *Food Sci. Nutr.* **2016**, *4* (4), 611–622.

(107) Fontaine, K.; Hymery, N.; Lacroix, M. Z.; Puel, S.; Puel, O.; Rigalma, K.; Gaydou, V.; Coton, E.; Mounier, J. Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *215*, 187–193.

(108) Picot, A.; Barreau, C.; Pinson-Gadais, L.; Piroux, F.; Caron, D.; Lannou, C.; Richard-Forget, F. The dent stage of maize kernels is the most conducive for fumonisin biosynthesis under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (23), 8382–8390.

(109) Schmidt-Heydt, M.; Magan, N.; Geisen, R. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *284* (2), 142–149.

(110) Merhej, J.; Boutigny, A.-L.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F.; Barreau, C. Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecenes B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Addit. Contam., Part A* **2010**, *27* (5), 710–717.

(111) Cendoya, E.; Pinson-Gadais, L.; Farnochi, M. C.; Ramirez, M. L.; Chéreau, S.; Marcheguy, G.; Ducos, C.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Abiotic conditions leading to FUM gene expression and fumonisin accumulation by *Fusarium proliferatum* strains grown on a wheat-based substrate. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *253*, 12–19.

(112) Sørensen, J. L.; Sondergaard, T. E. The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *170*, 55–60.

(113) Lee, H.-S.; Kang, J.-W.; Kim, B. H.; Park, S.-G.; Lee, C. Statistical optimization of culture conditions for the production of enniatins H, I, and MK1688 by *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *111* (3), 279–285.

(114) Madry, N.; Zocher, R.; Kleinkauf, H. Enniatin production by *Fusarium oxysporum* in chemically defined media. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1983**, *17* (2), 75–79.

(115) Audhya, T. K.; Russell, d. W. Production of enniatins by *Fusarium sambucinum*: Selection of high-yield conditions from liquid surface cultures. *J. Gen. Microbiol.* **1974**, *82* (1), 181–190.

(116) Tedjotsop Feudjio, F.; Dornetshuber, R.; Lemmens, M.; Hoffmann, O.; Lemmens-Gruber, R.; Berger, W. Beauvericin and enniatin: Emerging toxins and/or remedies? *World Mycotoxin J.* **2010**, *3* (4), 415–430.

(117) Wang, G.; Dong, W.; Lu, H.; Lu, W.; Feng, J.; Wang, X.; Chen, H.; Liu, M.; Tan, C. Enniatin A1, A natural compound with bactericidal activity against mycobacterium tuberculosis *in vitro*. *Molecules* **2019**, *25* (1), 38.

(118) Sørensen, J.; Giese, H. Influence of carbohydrates on secondary metabolism in *Fusarium avenaceum*. *Toxins* **2013**, *5* (9), 1655–1663.

(119) Kokkonen, M.; Ojala, L.; Parikka, P.; Jestoi, M. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *143* (1–2), 17–25.

III.2. Données de caractérisation de l'espèce *F. avenaceum*

F. avenaceum appartient à la famille des *Nectriaceae*, section *Roseum*. C'est un champignon cosmopolite de par sa distribution géographique, capable de produire un large panel de métabolites secondaires (Logrieco et al., 2002; Gautier et al., 2020).

Les colonies de *F. avenaceum* se caractérisent par un mycélium dense et aérien pelucheux voire cotonneux (Yli-Mattila et al., 2018). On y retrouve des conidiophores peu ramifiés à l'extrémité desquels des macroconidies fines sont présentes avec 3-7 cloisons, de forme allongée ($\sim 50 \mu\text{m} \times 4,5 \mu\text{m}$) et légèrement courbée au niveau des pieds. Les microconidies sont généralement rares, fusoides ($\sim 13,5\text{-}24,5 \mu\text{m} \times 2,5\text{-}5,0 \mu\text{m}$) et ont entre 1 et 2 septums (Leslie and Summerell, 2006; Ma et al., 2019) (Figure 11). En revanche, aucune chlamydospore n'est observée.



Figure 11 : Caractéristiques morphologiques de *F. avenaceum* en milieu solide PDA (à gauche, photo personnelle) et des macroconidies cultivées en milieu CMC (à droite, Yli-Mattila et al., 2018). Echelle de 20 μm (à droite).

Bien que *F. avenaceum* peut infecter une large gamme d'hôtes (Gautier et al., 2020), il ne semble pas exister de spécificité d'hôte. En effet une étude de génétique des populations (Nalim et al., 2009) basée sur 65 isolats de *Fusarium* récoltés sur 25 hôtes différents utilisant des marqueurs moléculaires de type *tef* (translation elongation factor 1-alpha), *benA* (beta-tubulin), IGS (intergenic spacer) a montré qu'il existait une variabilité génétique entre les isolats, et que cette variabilité était indépendante de l'hôte. Les analyses phylogénétiques disponibles à ce jour révèlent un degré élevé de diversité dans les populations de *F. avenaceum* qui tend à les diviser en deux sous-groupes selon certains auteurs (Yli-Mattila et al., 2002; Holtz et al., 2011; Afshari, 2019).

Contrairement à de nombreux agents pathogènes du FHB, tels que *F. graminearum*, *F. culmorum* ou *F. poae*, qui sont étroitement apparentés (complexe *Sambucinum*), *F. avenaceum* fait partie d'un groupe taxonomique plus éloigné (Waalwijk et al., 2018). Avec *F. tricinctum*, ce sont deux entités taxonomiques étroitement liées appartenant au même complexe d'espèces *Tricinctum* (*Fusarium tricinctum* species complex) (O'Donnell et al., 2013; Ponts et al., 2020) (Figure 12).

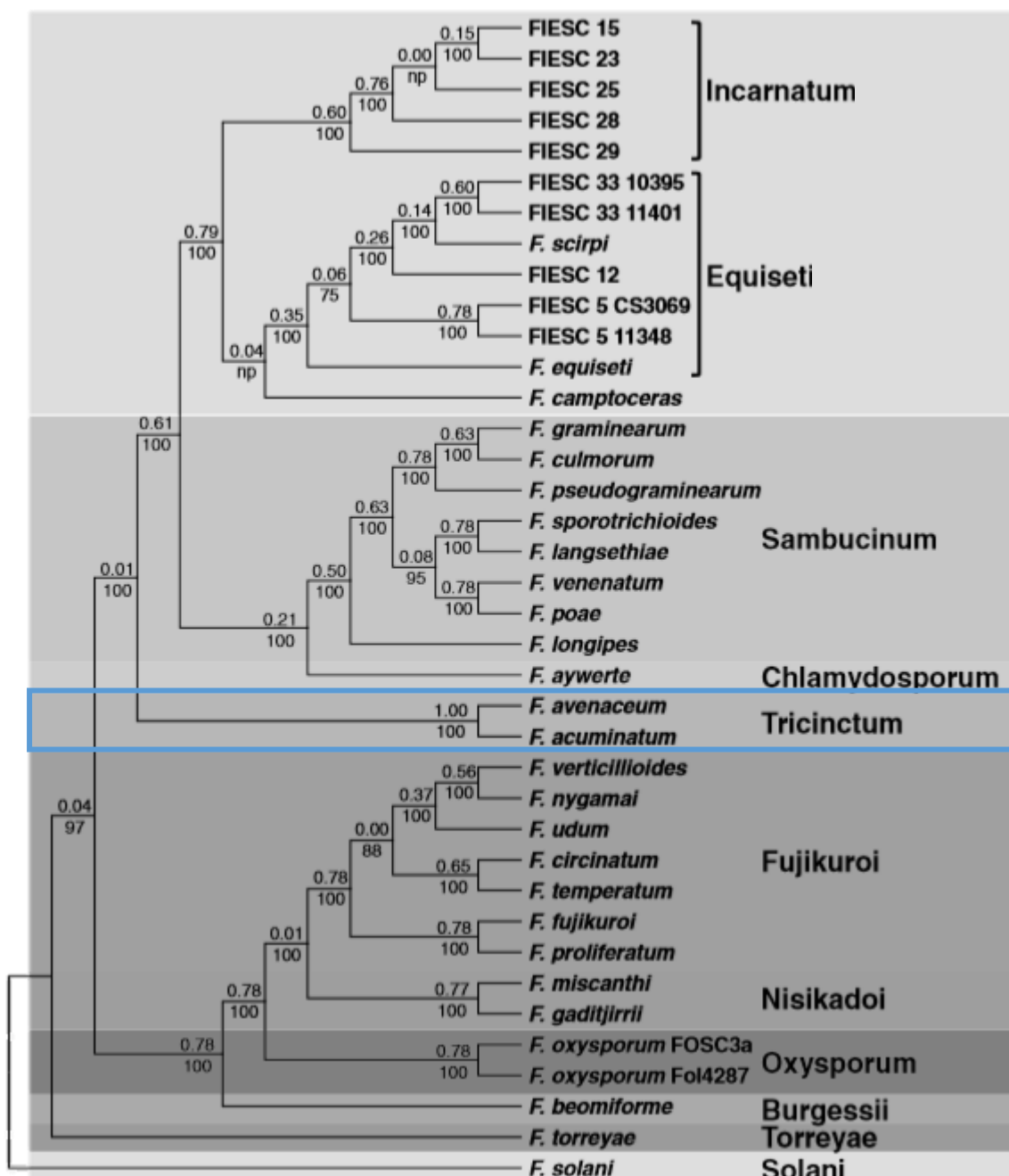


Figure 12 : Arbre phylogénétique des espèces de *Fusarium* (avec le nom des complexes associés sur la droite de l'arbre) établi à partir des séquences de 30 gènes de ménage (Villani et al., 2019).

A ce jour, trois génomes provenant d'isolats différents ; deux provenant de blé Canadien (FaLH03 et FaLH27) et un provenant d'orge cultivé en Finlande (Fa05001) sont disponibles (Lysøe et al., 2014). L'assemblage *de novo* a permis d'obtenir une taille similaire entre les génomes, comprise entre 41,6 Mb à 43,2 Mb selon la souche. Une étude de la synténie entre les trois génomes a permis de ré-ordonner les scaffolds de chaque assemblage en onze supercontigs (0,8-6,5 Mb), correspondant potentiellement à des bras chromosomiques ou à des chromosomes entiers (8-10 chromosomes attendus). Une comparaison des génomes a révélé de grandes régions synténiques (91-96%), en particulier entre les deux isolats canadiens. En plus des éventuelles différences structurelles entre les génomes, environ 1,4% à 3,2% des nucléotides alignés présentaient du polymorphisme nucléotidique (SNP), des insertions ou délétions (InDels) surtout entre la souche finlandaise et les souches canadiennes. Entre 13217 et 13445 gènes codants pour des protéines ont été identifiés dont 95% sont communs entre ces génomes. Les différences sont principalement observées dans les gènes codants pour des protéines impliquées dans la production de métabolites secondaires, les voies d'homéostasie de la balance redox et voies de signalisation (Lysøe et al., 2014).

IV. Projet de thèse

Comme présenté précédemment, la qualité sanitaire des céréales est significativement impactée par la contamination des grains par des mycotoxines produites par les espèces toxigènes dont *Fusarium spp.*. Les enniatines sont de plus en plus retrouvées dans les cultures et notamment en co-occurrence avec d'autres mycotoxines. Etant donné le peu de connaissances sur ces toxines et leurs agents producteurs (toxicité, occurrence, mécanismes d'accumulation...), la définition de stratégie de contrôle des contaminations reste limitée à ce jour. De plus, en réponse aux changements climatiques, l'évolution du risque mycotoxique liée à ces toxines est incertain et préoccupant (Medina et al., 2017; Janhager, 2018). Un effort de recherche est indispensable pour mieux comprendre la biologie de *F. avenaceum* ainsi que celles d'autres espèces productrices d'enniatiens.

Une des voies de recherche primordiale pour espérer limiter la production d'enniatiens est tout d'abord, de mieux comprendre les mécanismes et facteurs qui régulent leur biosynthèse chez *F. avenaceum*. Plusieurs facteurs, dont les facteurs environnementaux, sont connus pour affecter la croissance fongique et la production de métabolites secondaires (Popovski and Celar, 2013; Sørensen and Giese, 2013). Les mécanismes moléculaires qui exécutent cette modulation sont loin d'être élucidés chez *F. avenaceum* mais de nombreux modèles fongiques sont très bien décrits sur ce sujet dans la littérature. Ensuite, une meilleure caractérisation de la variabilité existante au sein de l'espèce (et des souches productrices d'enniatiens) est essentielle pour mieux les maîtriser au champ. Puis, dans le contexte écologique actuel, la gestion du risque sur les céréales se tourne vers la recherche de molécules naturelles capables de limiter l'utilisation des fongicides de synthèse. C'est dans ce cadre que s'inscrivent mes travaux de thèse centrés sur le champignon *F. avenaceum* producteur d'enniatiens. Les principales questions (Figure 13) sont :

- (1) Existe-t-il une diversité intraspécifique chez *F. avenaceum* ?
- (2) Le pH est-il un élément majeur de la régulation de la biosynthèse des enniatiens chez *F. avenaceum* ? Et si oui, quels sont les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués ?
- (3) Quels sont les effets des acides phénoliques sur le champignon *F. avenaceum* ? Sont-ils des inhibiteurs efficaces de la croissance et production d'enniatiens ?

Ainsi après un « préambule » décrivant les caractéristiques de croissance et toxinogénèse de *F. avenaceum* dans les conditions de culture utilisées tout au long du travail expérimental, le manuscrit comportera trois chapitres, chacun de ces chapitres répondant à une des questions précédemment soulevées ; Chapitre 1 : Caractérisation de la diversité phénotypique intraspécifique chez *F. avenaceum*, Chapitre 2 : Rôle du facteur de régulation Pac1 dans la modulation de la production d'enniatines par le pH ambiant chez *F. avenaceum*, Chapitre 3 : Modulation de la biosynthèse d'enniatines par les acides phénoliques. Le manuscrit se terminera par une discussion générale reprenant et intégrant les principaux résultats obtenus ainsi que leur projection en termes de perspectives de maîtrise des niveaux de contamination des céréales par des enniatines.

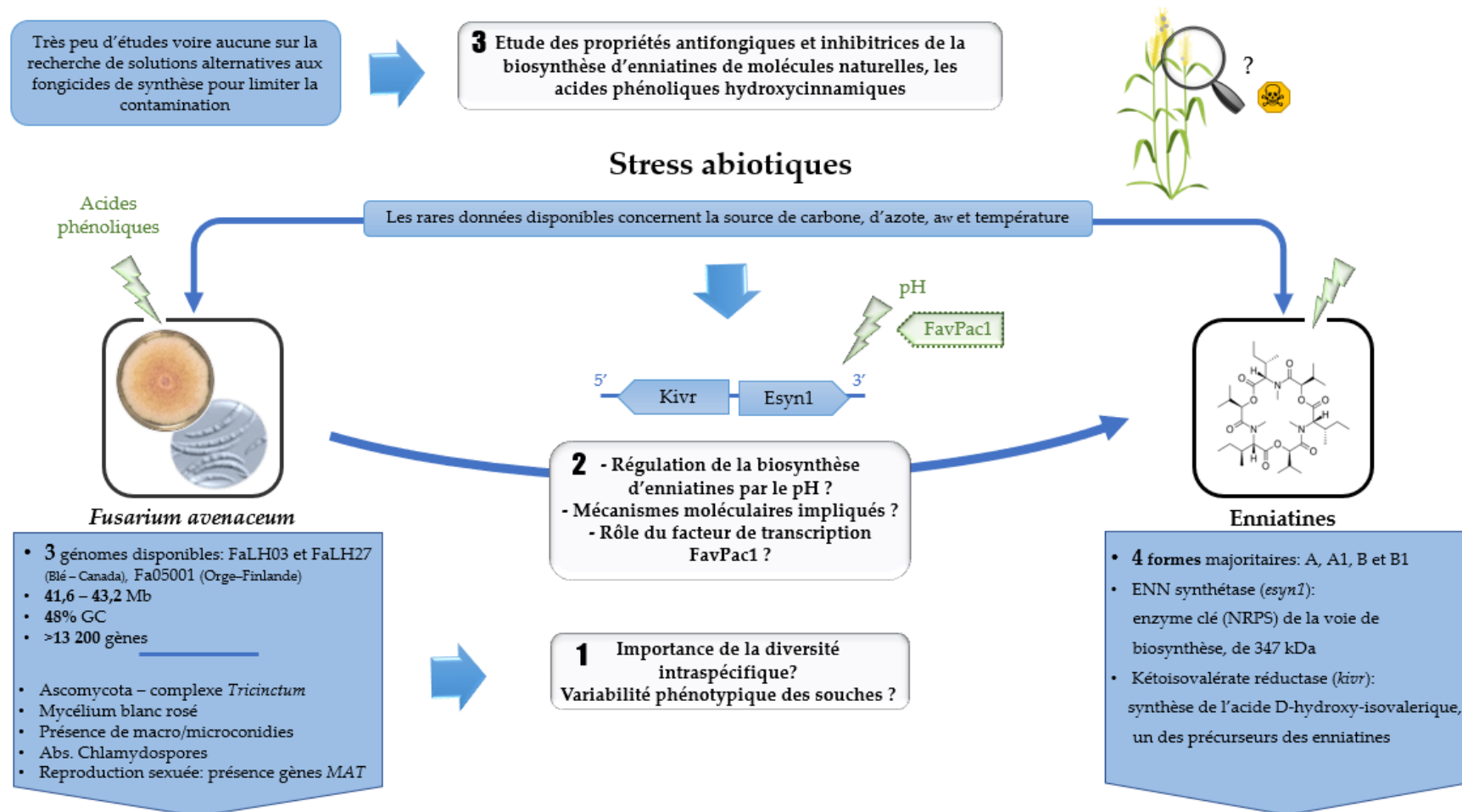


Figure 13: Quelques connaissances du pathosystème et questions de recherche.

V. Bibliographie

- Afshari, N. (2019). Characterization of *Fusarium avenaceum* from faba bean (*Vicia faba*) in Iran, genetic diversity, aggressiveness, and cultivar evaluation. *Journal of Plant Pathology* 1–8.
- AFSSA (2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaines et animales.
- Agati, G., Azarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 10, 67-76.
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., and Varzakas, T. (2020). Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods* 9, 137.
- Al Aboody, M.S., and Mickymaray, S. (2020). Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics* 9, 45.
- ANSES - Saisine n°2015-SA-0187 (2019). Optimisation de la surveillance de la contamination chimique des aliments.
- Arsan, M.R., and Eraky Amal, M.I. (2011). Aggressiveness of Certain *Fusarium graminearum* Isolates on Wheat Seedlings and Relation with their Trichothecene Production. *Plant Pathology Journal* 10, 36–41.
- Arseniuk, E., Foremska, E., Goral, T., and 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., Bernillon, S., Marchegay, G., Lornac, A., Ponts, N., Zehraoui, E., Barreau, C., and Richard-Forget, F. (2014). Bioguided Isolation, Characterization, and Biotransformation by *Fusarium verticillioides* of Maize Kernel Compounds That Inhibit Fumonisin Production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 1148–1158.
- Atanasova-Penichon, V., Barreau, C., and Richard-Forget, F. (2016). Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to *Fusarium* and Mycotoxin Accumulation. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16.
- Audenaert, K., Callewaert, E., Höfte, M., De Saeger, S., and Haesaert, G. (2010). Hydrogen peroxide induced by the fungicide prothioconazole triggers deoxynivalenol (DON) production by *Fusarium graminearum*. *BMC Microbiology* 10, 112.
- Audhya, T.K., and Russell, D.W. (1974). Production of Enniatins by *Fusarium sambucinum*: Selection of High-yield Conditions from Liquid Surface Cultures. *Journal of General Microbiology* 82, 181–190.
- Becher, R., Hettwer, U., Karlovsky, P., Deising, H.B., and Wirsal, S.G.R. (2010). Adaptation of *Fusarium graminearum* to Tebuconazole Yielded Descendants Diverging for Levels of Fitness, Fungicide Resistance, Virulence, and Mycotoxin Production. *Phytopathology* 100, 444–453.

- Behm, C., Degen, G.H., and Föllmann, W. (2009). The *Fusarium* toxin enniatin B exerts no genotoxic activity, but pronounced cytotoxicity *in vitro*. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 423–430.
- Bernhoft, A., Clasen, P.-E., Kristoffersen, A.B., and Torp, M. (2010). Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Additives and Contaminants* 27, 842–852.
- Bilska, K., Stuper-Szablewska, K., Kulik, T., Buśko, M., Załuski, D., Jureczak, S., and Perkowski, J. (2018). Changes in Phenylpropanoid and Trichothecene Production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* Sensu Stricto via Exposure to Flavonoids. *Toxins* 10, 1–12.
- Birr, T., Hasler, M., Verreet, J.-A., and Klink, H. (2020). Composition and Predominance of *Fusarium* Species Causing *Fusarium* Head Blight in Winter Wheat Grain Depending on Cultivar Susceptibility and Meteorological Factors. *Microorganisms* 8, 617.
- Blandino, M., Haidukowski, M., Pascale, M., Plizzari, L., Scudellari, D., and Reyneri, A. (2012). Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crops Research* 133, 139–149.
- Bollina, V., Kushalappa, A.C., Choo, T.M., Dion, Y., and Rioux, S. (2011). Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against *Fusarium graminearum*, based on mass spectrometry. *Plant Molecular Biology* 77, 355–370.
- Bottalico, A., and 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.
- Boutigny, A.-L., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2008). Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *European Journal of Plant Pathology* 121, 411–423.
- Boutigny, A.-L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M.-N., Pinson-Gadais, L., and Richard-Forget, F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research* 113, 746–753.
- Brzonkalik, K., Hümmer, D., Sylatk, C., and Neumann, A. (2012). Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation. *AMB Express* 2, 8.
- Buerstmayr, H., Ban, T., and Anderson, J.A. (2009). QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 128, 1–26.
- Burmeister, H.R., and Plattner, R.D. (1987). Enniatin Production by *Fusarium tricinctum* and its Effect on Germinating Wheat Seeds. *Phytopathology* 77, 1483.
- Buśko, M., Góral, T., Ostrowska, A., Matysiak, A., Walentyn-Góral, D., and Perkowski, J. (2014). The Effect of *Fusarium* Inoculation and Fungicide Application on Concentrations of Flavonoids (Apigenin, Kaempferol, Luteolin, Naringenin, Quercetin, Rutin, Vitexin) in Winter Wheat Cultivars. *American Journal of Plant Sciences* 5, 3727–3736.
- Caddick, M.X., Brownlee, A.G., and Arst, H.N. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics* 203, 346–353.

- Călinoiu, L.F., and Vodnar, D.C. (2018). Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability. *Nutrients* 10, 1–31.
- Cappellini, R.A., and Peterson, J.L. (1965). Macroconidium Formation in Submerged Cultures by a Non-Sporulating Strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57, 962–966.
- Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Espeso, E.A., González-Verdejo, C.I., García-Maceira, F.I., and Di Pietro, A. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology* 48, 765–779.
- Caron, D., Malavergne, D., and Dupon De Dinechin, L. (2007). Impact des facteurs agro-environnementaux sur le niveau d'inoculum et la cinétique de dissémination des ascospores de *Gibberella zeae*. Colloque Fusariotoxines des Céréales Arcachon 13.
- Chen, Y., and Zhou, M.-G. (2009). Sexual recombination of carbendazim resistance in *Fusarium graminearum* under field conditions. *Pest Management Science* 65, 398–403.
- Choo, T.M., Martin, R.A., Savard, M.E., and Blackwell, B. (2014). Effects of planting date and earliness on deoxynivalenol contamination in barley under natural epidemic conditions. *Canadian Journal of Plant Science* 94, 1363–1371.
- Cobo-Díaz, J.F., Baroncelli, R., Le Floch, G., and Picot, A. (2019). A novel metabarcoding approach to investigate *Fusarium* species composition in soil and plant samples. *FEMS Microbiology Ecology* 95, 1-13.
- CODA-CERVA (2011). Carry-over of mycotoxins to animal products: a case study poultry. CODA-CERVA (Centrum Voor Onderzoek in Diergeneeskunde En Agrochemie—Centre d'Étude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques) - Scientific Report.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., and Barka, E.A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4951–4959.
- Covarelli, L., Turner, A.S., and Nicholson, P. (2004). Repression of deoxynivalenol accumulation and expression of *Tri* genes in *Fusarium culmorum* by fungicides *in vitro*. *Plant Pathology* 53, 22–28.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414–430.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G., and Hohn, T.M. (1996). Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 775–781.
- Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P., and Croubels, S. (2013). Quantitative determination of the *Fusarium* mycotoxins beauvericin, enniatin A, A1, B and B1 in pig plasma using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 106, 212–219.
- Devreese, M., Broekaert, N., De Mil, T., Fraeyman, S., De Backer, P., and Croubels, S. (2014). Pilot toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of the *Fusarium* mycotoxin enniatin B1 in pigs. *Food and Chemical Toxicology* 63, 161–165.

- Dhokane, D., Karre, S., Kushalappa, A.C., and McCartney, C. (2016). Integrated Metabolo-Transcriptomics Reveals Fusarium Head Blight Candidate Resistance Genes in Wheat QTL-Fhb2. *PLOS ONE* 11, 1–27.
- Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst, H.N., and Peñalva, M.A. (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *The EMBO Journal* 21, 1350–1359.
- Doohan, F.M., Brennan, J., and Cooke, B.M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109, 755–768.
- Dorn, G. (1965). Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* 6, 13–26.
- Du, H., and Huang, G. (2016). Environmental pH adaption and morphological transitions in *Candida albicans*. *Current Genetics* 62, 283–286.
- EFSA (2014). Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal* 12, 174.
- Eggert, K., Hollmann, J., Hiller, B., Kruse, H.-P., Rawel, H.M., and Pawelzik, E. (2010). Effects of *Fusarium* Infection on the Phenolics in Emmer and Naked Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3043–3049.
- Eranthodi, A., Schneiderman, D., Harris, L.J., Witte, T.E., Sproule, A., Hermans, A., Overy, D.P., Chatterton, S., Liu, J., Li, T., et al. (2020). Enniatin Production Influences *Fusarium avenaceum* Virulence on Potato Tubers, but not on Durum Wheat or Peas. *Pathogens* 9, 1–20.
- Fanelli, F., Iversen, A., Logrieco, A.F., and Mulè, G. (2013). Relationship between fumonisin production and *FUM* gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *Food Additives & Contaminants* 30, 365–371.
- Fernández-Blanco, C., Font, G., and Ruiz, M.-J. (2016). Interaction effects of enniatin B, deoxinivalenol and alternariol in Caco-2 cells. *Toxicology Letters* 241, 38–48.
- Fernandez-Orozco, R., Li, L., Harflett, C., Shewry, P.R., and Ward, J.L. (2010). Effects of Environment and Genotype on Phenolic Acids in Wheat in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 9341–9352.
- Ferrigo, D., Raiola, A., and Causin, R. (2016). *Fusarium* Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules* 21, 1–35.
- Ferruz, E., Atanasova-Pénichon, V., Bonnin-Verdal, M., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., Lorán, S., Ariño, A., Barreau, C., and Richard-Forget, F. (2016). Effects of Phenolic Acids on the Growth and Production of T-2 and HT-2 Toxins by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides*. *Molecules* 21, 1–11.
- Ficheux, A.S., Sibiril, Y., and Parent-Massin, D. (2013). Effects of beauvericin, enniatin b and moniliformin on human dendritic cells and macrophages: An *in vitro* study. *Toxicon* 71, 1–10.
- Fink-Gremmels, J., and Malekinejad, H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology* 137, 326–341.

- Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., and Woloshuk, C.P. (2003). *PAC1*, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5222–5227.
- Fraeyman, S., Devreese, M., Antonissen, G., De Baere, S., Rychlik, M., and Croubels, S. (2016). Comparative Oral Bioavailability, Toxicokinetics, and Biotransformation of Enniatin B1 and Enniatin B in Broiler Chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 7259–7264.
- Galindo, A., Hervás-Aguilar, A., Rodríguez-Galán, O., Vincent, O., Arst, H.N., Tilburn, J., and Peñalva, M.A. (2007). PalC, One of Two Bro1 Domain Proteins in the Fungal pH Signalling Pathway, Localizes to Cortical Structures and Binds Vps32. *Traffic* 8, 1346–1364.
- Galtier, P., Loiseau, N., Oswald, I.P., and Puel, O. (2006). Toxicologie des mycotoxines : dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 5–13.
- Gammelsrud, A., Solhaug, A., Dendelé, B., Sandberg, W.J., Ivanova, L., Kocbach Bølling, A., Lagadic-Gossman, D., Refsnes, M., Becher, R., Eriksen, G., et al. (2012). Enniatin B-induced cell death and inflammatory responses in RAW 267.4 murine macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology* 261, 74–87.
- Gäumann, E., Naef-Roth, St., and Kern, H. (1960). Zur phytotoxischen Wirksamkeit der Enniatine. *Journal of Phytopathology* 40, 45–51.
- Gauthier, L., Atanasova-Penichon, V., Chéreau, S., and Richard-Forget, F. (2015). Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol Accumulation. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 24839–24872.
- Gauthier, L., Bonnin-Verdal, M.-N., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., Richard-Forget, F., and Atanasova-Penichon, V. (2016). Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: New insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *International Journal of Food Microbiology* 221, 61–68.
- Gautier, C., Pinson-Gadais, L., and Richard-Forget, F. (2020). *Fusarium* Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 4788–4798.
- Gebremeskel, A.F., Ngoda, P.N., Kamau-Mbuthia, E.W., and Mahungu, S.M. (2019). Prevalence and controlling mechanisms of mycotoxin. *Food & Agriculture* 5, 1–14.
- Gilbert, J., Woods, S.M., and Kromer, U. (2008). Germination of Ascospores of *Gibberella zeae* After Exposure to Various Levels of Relative Humidity and Temperature. *Phytopathology* 98, 504–508.
- Glynn, N.C., Hare, M.C., Parry, D.W., and Edwards, S.G. (2005). Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties *majus* and *nivale* to species status. *Mycological Research* 109, 872–880.

Gorczyca, A., Oleksy, A., Gala-Czekaj, D., Urbaniak, M., Laskowska, M., Waśkiewicz, A., and Stępień, Ł. (2018). *Fusarium* head blight incidence and mycotoxin accumulation in three durum wheat cultivars in relation to sowing date and density. *The Science of Nature* 105, 1–11.

Goswami, R.S., and Kistler, H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, 515–525.

Gottwald, S., Samans, B., Lück, S., and Friedt, W. (2012). Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: two essential mechanisms of *Fusarium* head blight resistance in wheat? *BMC Genomics* 13, 369.

Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., and Berthiller, F. (2017). Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 7052–7070.

Guan, X., Zhao, Y., Liu, X., Shang, B., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Zhang, C., Bhatnagar, D., and Liu, Y. (2019). The bZIP transcription factor Afap1 mediates the oxidative stress response and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Revista Argentina de Microbiología* 51, 292–301.

Gunnaiah, R., and Kushalappa, A.C. (2014). Metabolomics deciphers the host resistance mechanisms in wheat cultivar Sumai-3, against trichothecene producing and non-producing isolates of *Fusarium graminearum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 83, 40–50.

Hadizadeh, I., Peivastegan, B., and Kolahi, M. (2009). Antifungal activity of Nettle (*Urtica dioica* L.), Colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), Oleander (*Nerium oleander* L.) and Konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pakistan Journal Biological Sciences* 12, 58–63.

Herrmann, M., Zocher, R., and Haese, A. (1996). Enniatin Production by *Fusarium* Strains and Its Effect on Potato Tuber Tissue. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 393–398.

Holtz, M.D., Chang, K.F., Hwang, S.F., Gossen, B.D., and Strelkov, S.E. (2011). Characterization of *Fusarium avenaceum* from lupin in central Alberta: genetic diversity, mating type and aggressiveness. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33, 61–76.

Horvat, D., Šimić, G., Drezner, G., Lalić, A., Ledenčan, T., Tucak, M., Plavšić, H., Andrić, L., and Zdunić, Z. (2020). Phenolic Acid Profiles and Antioxidant Activity of Major Cereal Crops. *Antioxidants* 9, 527.

Hua, S.-S.T., Grosjean, O.-K., and Baker, J.L. (1999). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology* 29, 289–291.

Ivanova, L., Fæste, C.K., Van Pamel, E., Daeseleire, E., Callebaut, A., and Uhlig, S. (2014). Presence of enniatin B and its hepatic metabolites in plasma and liver samples from broilers and eggs from laying hens. *World Mycotoxin Journal* 7, 167–175.

Janhager, J. (2018). Mycotoxins – an increasing problem? – The effect of climate changes on *Fusarium* mould populations and the occurrence of fusarotoxins in Swedish cereals. Independent Project in Food Science; Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala, Sweden.

Jestoi, M. (2008). Emerging *Fusarium*-Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 21–49.

- Kossonou Yao, K., Kouakou-Kouame, A.C., Koffi Affoué, C., Koffi Yao, M., Tra Bi Fézan, H., and Tano, K. (2019). Activité Antifongique *In Vitro* des Extraits de Cinq Plantes Locales sur *Colletotrichum Higginsianum*, *Fusarium Oxysporum* et *Rhizopus Stolonifer*, Agents Pathogènes de la Papaye (*Carica Papaya* L.) et de la Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.). *European Scientific Journal* 15, 304-321.
- Karlsson, I., Friberg, H., Kolseth, A.-K., Steinberg, C., and Persson, P. (2017). Agricultural factors affecting *Fusarium* communities in wheat kernels. *International Journal of Food Microbiology* 252, 53–60.
- Kazan, K., Gardiner, D.M., and Manners, J.M. (2012). On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular Plant Pathology* 13, 399–413.
- Keller, N.P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T.D., and Burow, G.B. (1997). pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87, 643–648.
- Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B., and Hornok, L. (2004). Mating Type Sequences in Asexually Reproducing *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4419–4423.
- Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., and Jestoi, M. (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 143, 17–25.
- Kolf-Clauw, M., Sassahara, M., Luciola, J., Rubira-Gerez, J., Alassane-Kpembi, I., Lyazhri, F., Borin, C., and Oswald, I.P. (2013). The emerging mycotoxin, enniatin B1, down-modulates the gastrointestinal toxicity of T-2 toxin *in vitro* on intestinal epithelial cells and *ex vivo* on intestinal explants. *Archives of Toxicology* 87, 2233–2241.
- Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterházy, Á., Krska, R., et al. (2005). The Ability to Detoxify the Mycotoxin Deoxynivalenol Colocalizes With a Major Quantitative Trait Locus for *Fusarium* Head Blight Resistance in Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 1318–1324.
- Leslie, J.F., and Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing.
- Li, Y., Wang, Z., Beier, R.C., Shen, J., Smet, D.D., De Saeger, S., and Zhang, S. (2011). T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3441–3453.
- Logrieco, A., Rizzo, A., Ferracane, R., and Ritieni, A. (2002). Occurrence of Beauvericin and Enniatins in Wheat Affected by *Fusarium avenaceum* Head Blight. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 82–85.
- Lysøe, E., Harris, L.J., Walkowiak, S., Subramaniam, R., Divon, H.H., Riiser, E.S., Llorens, C., Gabaldón, T., Kistler, H.C., Jonkers, W., et al. (2014). The Genome of the Generalist Plant Pathogen *Fusarium avenaceum* Is Enriched with Genes Involved in Redox, Signaling and Secondary Metabolism. *Plos One* 9, 1–17.

- Ma, N., Abdul Haseeb, H., Xing, F., Su, Z., Shan, L., and Guo, W. (2019). *Fusarium avenaceum*: A Toxigenic Pathogen Causing Ear Rot on Maize in Yunnan Province, China. *Plant Disease* 103, 1–4.
- Macheleidt, J., Mattern, D.J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., and Brakhage, A.A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics* 50, 371–392.
- Maranghi, F., Tassinari, R., Narciso, L., Tait, S., Rocca, C.L., Felice, G.D., Butteroni, C., Corinti, S., Barletta, B., Cordelli, E., et al. (2018). *In vivo* toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study *in vivo* toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB). *EFSA Supporting Publications* 15, 183.
- Marín, P., Magan, N., Vázquez, C., and González-Jaén, M.T. (2010). Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene *FUM1* in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 303–311.
- Masci, S., Laino, P., Janni, M., Botticella, E., Di Carli, M., Benvenuto, E., Danieli, P.P., Lilley, K.S., Lafiandra, D., and D'Ovidio, R. (2015). Analysis of Quality-Related Parameters in Mature Kernels of Polygalacturonase Inhibiting Protein (PGIP) Transgenic Bread Wheat Infected with *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 3962–3969.
- Matarese, F., Sarrocco, S., Gruber, S., Seidl-Seiboth, V., and Vannacci, G. (2012). Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology* 158, 98–106.
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., and Magan, N. (2017). Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biology Reviews* 31, 143–154.
- Merhej, J., Boutigny, A.-L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2010). An Acidic pH is a determinant factor for TRI genes expression and trichothecenes B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives and Contaminants* 27, 710–717.
- Merhej, J., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2011). The pH regulatory factor Pac1 regulates *Tri* gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 48, 275–284.
- Mingot, J.M., Espeso, E.A., Díez, E., and Peñalva, MiguelÁ. (2001). Ambient pH Signaling Regulates Nuclear Localization of the *Aspergillus nidulans* PacC Transcription Factor. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1688–1699.
- Mohd Zainudin, N.A.I., Hamzah, F.A., Kusai, N.A., Zambri, N.S., and Salleh, S. (2017). Characterization and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*, causal agents of Fusarium ear rot of corn. *Turkish Journal of Biology* 41, 220–230.
- Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M.-N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2013). The bZIP Transcription Factor Fgap1 Mediates Oxidative Stress Response and Trichothecene Biosynthesis But Not Virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 8, 1-12.

- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., and Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 41, 295–308.
- Nalim, F.A., Elmer, W.H., McGovern, R.J., and Geiser, D.M. (2009). Multilocus Phylogenetic Diversity of *Fusarium avenaceum* Pathogenic on *Lisianthus*. *Phytopathology* 99, 462–468.
- Nayak, B., Liu, R.H., and Tang, J. (2015). Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55, 887–918.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Corby Kistler, H., and Aoki, T. (2004). Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology* 41, 600–623.
- O'Donnell, K., Rooney, A.P., Proctor, R.H., Brown, D.W., McCormick, S.P., Ward, T.J., Frandsen, R.J.N., Lysøe, E., Rehner, S.A., Aoki, T., et al. (2013). Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important Fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52, 20–31.
- Palazzini, J., Roncallo, P., Cantoro, R., Chiotta, M., Yerkovich, N., Palacios, S., Echenique, V., Torres, A., Ramirez, M., Karlovsky, P., et al. (2018). Biocontrol of *Fusarium graminearum sensu stricto*, Reduction of Deoxynivalenol Accumulation and Phytohormone Induction by Two Selected Antagonists. *Toxins* 10, 1-12.
- Palumbo, J.D., O'Keeffe, T.L., and Mahoney, N.E. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia* 164, 241–248.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., and McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathology* 44, 207–238.
- Passone, M.A., Resnik, S.L., and Etcheverry, M.G. (2005). *In vitro effect* of phenolic antioxidants on germination, growth and aflatoxin B1 accumulation by peanut *Aspergillus* section Flavi. *Journal of Applied Microbiology* 99, 682–691.
- Paul, S.S., Kamra, D.N., Sastry, V.R.B., Sahu, N.P., and Kumar, A. (2003). Effect of phenolic monomers on biomass and hydrolytic enzyme activities of an anaerobic fungus isolated from wild nil gai (*Baselophus tragocamelus*). *Letters in Applied Microbiology* 36, 377–381.
- Peñalva, M.A., and Arst, H.N. (2002). Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 426–446.
- Peñalva, M.A., and Arst, Jr.H.N. (2004). Recent Advances in the Characterization of Ambient pH Regulation of Gene Expression in Filamentous Fungi and Yeasts. *Annual Review of Microbiology* 58, 425–451.
- Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst, H.N. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology* 16, 291–300.
- Peñalva, M.A., Lucena-Agell, D., and Arst, Jr.H.N. (2014). *Liaison alcaline*: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling. *Current Opinion in Microbiology* 22, 49–59.

- Peñas, M.M., Hervás-Aguilar, A., Múnera-Huertas, T., Reoyo, E., Peñalva, M.Á., Arst, H.N., and Tilburn, J. (2007). Further Characterization of the Signaling Proteolysis Step in the *Aspergillus nidulans* pH Signal Transduction Pathway. *Eukaryotic Cell* 6, 960–970.
- Perczak, A., Gwiazdowska, D., Gwiazdowski, R., Juś, K., Marchwińska, K., and Waśkiewicz, A. (2019). The Inhibitory Potential of Selected Essential Oils on *Fusarium* spp. Growth and Mycotoxins Biosynthesis in Maize Seeds. *Pathogens* 9, 1–16.
- Pereyra, S.A., and Dill-Macky, R. (2008). Colonization of the Residues of Diverse Plant Species by *Gibberella zeae* and Their Contribution to *Fusarium* Head Blight Inoculum. *Plant Disease* 92, 800–807.
- Pilu, R., Cassani, E., Sirizzotti, A., Petroni, K., and Tonelli, C. (2011). Effect of flavonoid pigments on the accumulation of fumonisin B1 in the maize kernel. *Journal of Applied Genetics* 52, 145–152.
- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C., and Jenkinson, P. (2003). Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109, 731–742.
- Ponts, N. (2015). Mycotoxins are a component of *Fusarium graminearum* stress-response system. *Frontiers in Microbiology* 6, 1–6.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., and 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., Boutigny, A.-L., Barreau, C., and Richard-Forget, F. (2011). Cinnamic-Derived Acids Significantly Affect *Fusarium graminearum* Growth and In Vitro Synthesis of Type B Trichothecenes. *The American Phytopathological Society* 101, 6.
- Ponts, N., Gautier, C., Gouzy, J., Pinson-Gadais, L., Foulongne-Oriol, M., Ducos, C., Richard-Forget, F., Savoie, J.-M., Zhao, C., and Barroso, G. (2020). Evolution of *Fusarium tricinctum* and *Fusarium avenaceum* mitochondrial genomes is driven by mobility of introns and of a new type of palindromic microsatellite repeats. *BMC Genomics* 21, 358.
- Popovski, S., and Celar, F.A. (2013). The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production – a review. *Acta Agriculturae Slovenica* 101, 105–116.
- Prosperini, A., Font, G., and Ruiz, M.J. (2014). Interaction effects of *Fusarium* enniatins (A, A1, B and B1) combinations on *in vitro* cytotoxicity of Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro* 28, 88–94.
- Puel, O., Galtier, P., and Oswald, I. (2010). Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* 2, 613–631.
- Rafai, P., Tuboly, S., Bata, A., Tilly, P., Ványi, A., Papp, Z., Jakab, L., and Túry, E. (1995). Effect of various levels of T-2 toxin in the immune system of growing pigs. *136*, 511–514.
- Règlement CE 856/2005 European Commission - Règlement (EC) No 856/2005 de la commission du 06 Juin 2005 modifiant le règlement (CE) No 466/2001 en ce qui concerne les toxines du *Fusarium*, L143/3. *Journal Officiel de l'Union Européenne* 1–6.

Règlement CE 1126/2007 Règlement (CE) No 1126/2007 de la commission du 28 septembre 2007 modifiant le règlement (CE) no 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* dans le maïs et les produits à base de maïs. Journal Officiel de l'Union Européenne 4.

Reverberi, M., Gazzetti, K., Punelli, F., Scarpari, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Fabbri, A.A., and Fanelli, C. (2012). *Aoyap1* regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. Applied Microbiology and Biotechnology 95, 1293–1304.

Rodríguez-Carrasco, Y., Heilos, D., Richter, L., Süssmuth, R.D., Heffeter, P., Sulyok, M., Kenner, L., Berger, W., and Dornetshuber-Fleiss, R. (2016). Mouse tissue distribution and persistence of the food-born fusariotoxins Enniatin B and Beauvericin. Toxicology Letters 247, 35–44.

Rossi, A., and Arst, H.N. (1990). Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. FEMS Microbiology Letters 66, 51–53.

Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., and Devlieghere, F. (2007). Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? Food Microbiology 24, 465–473.

Sánchez-Rangel, D., Hernández-Domínguez, E.-E., Pérez-Torres, C.-A., Ortiz-Castro, R., Villafán, E., Rodríguez-Haas, B., Alonso-Sánchez, A., López-Buenfil, A., Carrillo-Ortiz, N., Hernández-Ramos, L., et al. (2018). Environmental pH modulates transcriptomic responses in the fungus *Fusarium* sp. associated with KSHB *Euwallacea* sp. near *forficatus*. BMC Genomics 19, 1-21.

Schirdewahn, T., Mascher, F., Bucheli, T.D., Bertossa, M., Musa, T., Wettstein, F.E., Keller, B., and Vogelgsang, S. (2016). Facteurs culturels affectant les *Fusarium* spp. et les mycotoxines dans l'orge suisse. Recherche Agronomique Suisse 7, 272–377.

Schöneberg, T., Martin, C., Wettstein, F.E., Bucheli, T.D., Mascher, F., Bertossa, M., Musa, T., Keller, B., and Vogelgsang, S. (2016). *Fusarium* and mycotoxin spectra in Swiss barley are affected by various cropping techniques. Food Additives & Contaminants 33, 1608–1619.

Schöneberg, T., Kibler, K., Sulyok, M., Musa, T., Bucheli, D., Mascher, F., Bertossa, M., and Voegelé, R.T. (2018). Can plant phenolic compounds reduce *Fusarium* growth and mycotoxin production in cereals? Food Additives & Contaminants 35, 2455–2470.

Schwarz, P.B. (2017). *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in malting and brewing: successes and future challenges. Tropical Plant Pathology 42, 153–164.

Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., and Kundu, B. (2017). Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. Journal of Bioscience and Bioengineering 123, 308–313.

Siranidou, E., Kang, Z., and 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, M.-C., Madec, S., Coton, E., and Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their *in vitro* Combined Toxicological Effects. *Toxins* 8, 1-36.
- Sørensen, J., and Giese, H. (2013). Influence of Carbohydrates on Secondary Metabolism in *Fusarium avenaceum*. *Toxins* 5, 1655–1663.
- Sørensen, J.L., and Sondergaard, T.E. (2014). The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 170, 55–60.
- Spatafora, J.W., Aime, M.C, Grigoriev, I.V., Martin, F., Stajich, J.E., and Blackwell, M. (2017). The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. *Microbiology Spectrum* 5, 1-32.
- Sriwattanapong, K., Slocum, S.L., Chawanthayatham, S., Fedeles, B.I., Egner, P.A., Groopman, J.D., Satayavivad, J., Croy, R.G., and Essigmann, J.M. (2017). Pregnancy Alters Aflatoxin B1 Metabolism and Increases DNA Damage in Mouse Liver. *Toxicological Sciences* 160, 173–179.
- Stack, R.W. (1999). Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Stack, R.W. (2003). History of *Fusarium* head blight with emphasis on North America. *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* (Leonard, K. J. and Bushnell, W. R., eds) APS Press, 1-34.
- Steiner, B., Buerstmayr, M., Michel, S., Schweiger, W., Lemmens, M., and Buerstmayr, H. (2017). Breeding strategies and advances in line selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Tropical Plant Pathology* 42, 165–174.
- Suárez, T., and Peñalva, M.A. (1996). Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB*–*pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Molecular Microbiology* 20, 529–540.
- Sung, W.S., and Lee, D.G. (2010). Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and Applied Chemistry* 82, 219–226.
- Svingen, T., Lund Hansen, N., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Jensen, U., and Have Rasmussen, P. (2017). Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high hepatotoxicity on a high-content imaging platform. *Environmental Toxicology* 32, 1658–1664.
- Synthèse nationale Arvalis 2017-2018 Actualités règlementaires et phytosanitaires. Inventaires de Printemps - synthèse nationale.
- Terzi, V., Tumino, G., Stanca, A.M., and Morcia, C. (2014). Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science* 59, 284–293.
- Thompson, D.P. (1992). Inhibition of Mycelial Growth of Mycotoxigenic Fungi by Phenolic Antioxidants. *Mycologia* 84, 791–793.

- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., and Arst, H.N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal* 14, 779–790.
- Trail, F. (2009). For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Postgenomics Era. *Plant Physiology* 149, 103–110.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4, 147–157.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* 153, 895–905.
- Venturini, G., Toffolatti, S.L., Assante, G., Babazadeh, L., Campia, P., Fasoli, E., Salomoni, D., and Vercesi, A. (2015). The influence of flavonoids in maize pericarp on *fusarium* ear rot symptoms and fumonisin accumulation under field conditions. *Plant Pathology* 64, 671–679.
- Vesonder, R.F., Ciegler, A., and Jensen, A.H. (1973). Isolation of the Emetic Principle from *Fusarium*-Infected Corn. *Applied Microbiology* 26, 1008–1010.
- Villani, A., Proctor, R.H., Kim, H-S., Brown, D.W., Logrieco, A.F., Amatulli, M.T., Moretti, A., and Susca. (2019) Variation in secondary metabolite production potential in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex revealed by comparative analysis of 13 genomes. *BMC Genomics* 20, 1-22
- Virgilio, S., and Bertolini, M.C. (2018). Functional diversity in the pH signaling pathway: an overview of the pathway regulation in *Neurospora crassa*. *Current Genetics* 64, 529–534.
- Vogelgsang, S., Beyer, M., Pasquali, M., Jenny, E., Musa, T., Bucheli, T.D., Wettstein, F.E., and Forrer, H.-R. (2019). An eight-year survey of wheat shows distinctive effects of cropping factors on different *Fusarium* species and associated mycotoxins. *European Journal of Agronomy* 105, 62–77.
- Waalwijk, C., Taga, M., Zheng, S.-L., Proctor, R.H., Vaughan, M.M., and O'Donnell, K. (2018). Karyotype evolution in *Fusarium*. *IMA Fungus* 9, 13–26.
- Walter, S., Nicholson, P., and Doohan, F.M. (2010). Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* 185, 54–66.
- Wegulo, S. (2012). Factors Influencing Deoxynivalenol Accumulation in Small Grain Cereals. *Toxins* 4, 1157–1180.
- Wegulo, S.N., Baenziger, P.S., Hernandez Nopsa, J., Bockus, W.W., and Hallen-Adams, H. (2015). Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Protection* 73, 100–107.
- Windels, C.E. (2000). Economic and Social Impacts of *Fusarium* Head Blight: Changing Farms and Rural Communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology* 90, 17–21.
- Xue, A.G., Voldeng, H.D., Savard, M.E., Fedak, G., Tian, X., and Hsiang, T. (2009). Biological control of *fusarium* head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM94. *Canadian Journal of Plant Pathology* 31, 169-179.

Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Bulat, S.A., Alekhina, I.A., and Nirenberg, H.I. (2002). Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex – a polyphasic approach. *Mycological Research* 106, 655–669.

Yli-Mattila, T., Hussien, T., Gavrilova, O., and Gagkaeva, T. (2018). Morphological and Molecular Variation Between *Fusarium avenaceum*, *Fusarium arthrosporioides* and *Fusarium anguioides* Strains. *Pathogens* 7, 1–15.

Zhang, H., Shao, Y., Bao, J., and Beta, T. (2015). Phenolic compounds and antioxidant properties of breeding lines between the white and black rice. *Food Chemistry* 172, 630–639.

Zong, Y., Li, B., and Tian, S. (2015). Effects of carbon, nitrogen and ambient pH on patulin production and related gene expression in *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 206, 102–108.

Préambule

« Préambule » : caractéristiques de croissance et toxinogénèse de *F. avenaceum* dans les conditions de culture utilisées

I. Résultats

La première étape de ce travail de doctorat a consisté à définir les conditions de culture les plus appropriées pour étudier la production d'enniatines par *F. avenaceum*, puis à caractériser sa cinétique de croissance et sa toxinogénèse dans les conditions choisies. Elles seront à la base d'une majeure partie des expérimentations réalisées tout au long de ce travail. L'analyse des données bibliographiques ainsi que des expérimentations préliminaires nous a conduits à utiliser le milieu FDM (*Fusarium* Defined Medium) préconisé par (Fanelli et al., 2014) en culture statique et à l'obscurité. Une concentration de 10^4 spores/mL a été utilisée pour inoculer les milieux pour l'ensemble des isolats. Douze isolats ont été considérés, leur origine et hôte d'isolement sont renseignés dans le Tableau 1. L'appartenance de ces isolats à l'espèce *F. avenaceum* a été validée par qPCR à l'aide des amorces *rpb1* & *rpb2* (DNA-directed RNA polymerase II subunit *rpb1*/*rpb2*), *ef1 α* (elongation factor 1-alpha) et *JIA* (Turner et al., 1998; Elbelt et al., 2018; Ponts et al., 2020). Les caractéristiques phénotypiques de ces isolats ont été étudiées dans le Chapitre 1 de ce manuscrit. Les cinétiques décrites ci-dessous sont celles obtenues avec la souche I612 qui est une des souches « modèles » utilisées pour les approches mécanistiques développées dans notre étude (Rôle du facteur de transcription impliqué dans l'homéostasie du pH – FavPac1 – dans la modulation de la production d'enniatines/Chapitre 2 et Modulation de la biosynthèse d'enniatines par les acides phénoliques /Chapitre 3).

Les données de croissance, production d'enniatines et évolution du pH du milieu, au cours de la culture de la souche *F. avenaceum* I612 en milieu FDM sont reportées sur la Figure 1. La croissance s'initie très rapidement (dès 24 heures de culture) après inoculation et est dans sa phase exponentielle après 48 heures et atteint un palier entre 5 et 7 jours de culture (~ 35 mg de mycélium).

Dans les conditions de culture utilisées, l'augmentation de la biomasse fongique s'accompagne d'une augmentation du pH. Proche de 4,5 avant inoculation, le pH du milieu atteint une valeur proche de 8,5 après 15 jours de culture avec *F. avenaceum* I612. Cette évolution est à l'inverse de celle observée pour une autre espèce responsable de la fusariose, *F. graminearum*, dont le développement dans un milieu synthétique de composition très proche au FDM, conduit à une acidification du milieu (Merhej et al., 2010).

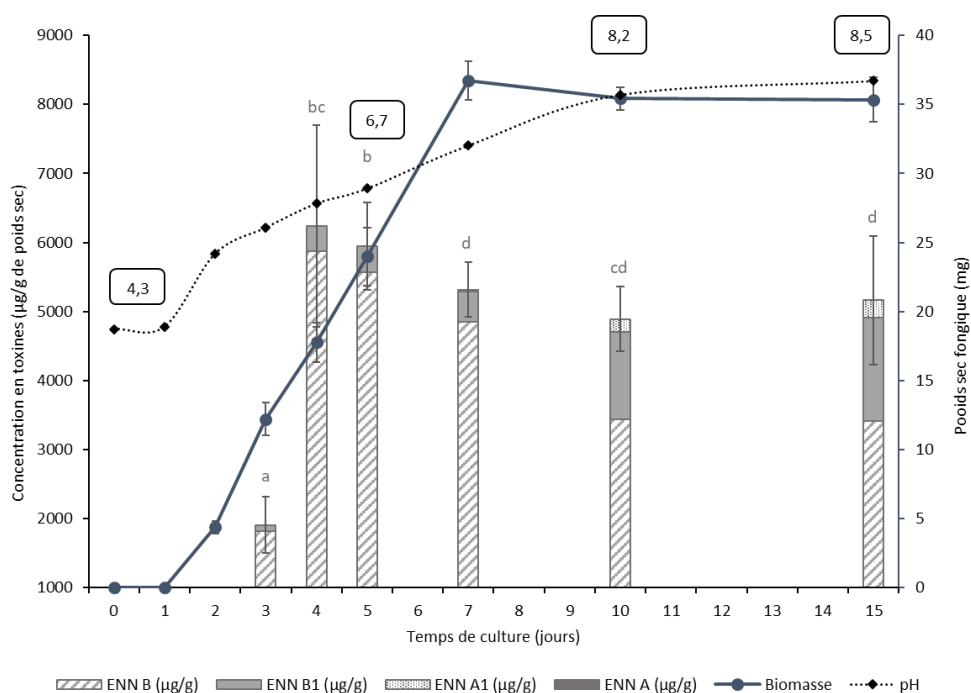


Figure 1 : Cinétique de la croissance fongique de I612, de la production de toxines et de l'évolution du pH dans le milieu liquide FDM. La biomasse fongique (en mg/culture) et la mesure des toxines (enniatiines B, B1, A et A1) sont le résultat de trois répliquats biologiques. Les barres d'erreur sont calculées sur l'erreur standard de la moyenne.

La capacité des champignons filamenteux à augmenter le pH extracellulaire a été reportée pour d'autres espèces phytopathogènes, *F. oxysporum* mais aussi plusieurs espèces de *Colletotrichum* et d'*Alternaria* (Prusky et al., 2016). Elle permettrait de créer un milieu favorable à l'induction de l'expression des facteurs de pathogénicité pour certains agents fongiques (Alkan et al., 2013; Masachis et al., 2016). L'ammonium et les acides organiques sécrétés par les champignons sont les principales molécules responsables de modifications de pH extracellulaire (Fernandes et al., 2017). Plusieurs études ont démontré que ces variations de pH extracellulaire sont nécessaires pour induire la production de certaines mycotoxines. C'est en particulier le cas de la synthèse de trichothécènes B par *F. graminearum* qui requiert une acidification du milieu pour être induite (Merhej et al., 2010). A l'opposé, la production de pénicilline produite par *A. nidulans* serait induite par une alcalinisation du milieu ambiant (Espeso et al., 1993). Ces observations soulèvent la question du rôle des variations du pH environnant sur la production d'enniatiines.

Concernant la production d'enniatiines, des niveaux quantifiables sont observés dès le jour 3 avec des valeurs proches de 2 mg/g de poids sec mycélien. La quantité de toxines accumulées dans le milieu atteint son niveau maximal au 4^{ème} jour avec une valeur proche de 6 mg/g ; cette concentration se stabilise par la suite (entre 4 et 7 jours) puis décroît faiblement. Les niveaux importants d'enniatiines produits confirment que le milieu FDM est un milieu favorable à la toxino-génèse chez *F. avenaceum*.

La décroissance des quantités d'enniatines après 7 jours de culture pourrait s'expliquer par un rendement d'extraction des enniatines qui diminue avec le temps de culture et la complexification du milieu, un piégeage des enniatines dans le mycélium ou une métabolisation de la toxine par *F. avenaceum*. Une telle métabolisation est un mécanisme qui a été décrit pour la dégradation de l'ochratoxine chez *Aspergillus niger*, avec la mise en évidence du rôle d'une protéine enzymatique nommée ochratoxinase (Zhao et al., 2020). Sur la Figure 1, il apparaît clairement que la forme d'enniatines majoritairement produite par la souche I612 est l'enniatine B. En effet, elle représente plus de 91% de la quantité totale des autres types d'enniatines (somme : A + A1 + B + B1) produites après 2 à 7 jours de culture et un peu moins de 70% aux deux derniers temps de culture. L'enniatine B est aussi la molécule majoritairement retrouvée dans les matrices céréalières (Prosperini et al., 2017). Présente en faibles quantités dans les premiers jours de culture, on retrouve beaucoup plus d'enniatine de type B1 au 10^e jour (~ 1/3 de la concentration totale en enniatines). L'enniatine A1 n'est quantifiée qu'à partir du jour 7 tandis que l'enniatine A n'est jamais détectée pour cette souche de *F. avenaceum* dans nos conditions de culture.

Sachant que ces différentes formes d'enniatines résultent de la nature différente des acides aminés qui entrent dans la voie de biosynthèse (enniatine A :3 isoleucine, enniatine A1 :2 isoleucine + 1 L-valine, enniatine B :3 L-valine et enniatine B1/ :2 L-valine + 1 isoleucine (Gautier et al., 2020)), on peut penser que l'apparition de l'enniatine B1 puis de l'enniatine A1 après 7 jours résulterait de l'apparition progressive d'isoleucine dans les milieux de culture.

Des études transcriptomiques ciblées ont été menées et trois gènes ont été étudiés. Ces trois gènes cibles interviennent directement (*esyn1* et *kivr*) ou indirectement (*FavPac1*) dans la biosynthèse d'enniatines. Le seul gène clé bien connu de la voie de biosynthèse des enniatines à l'heure actuelle est *esyn1* qui code pour la protéine enzymatique enniatine synthase (Hornbogen et al., 2002). Dans la littérature, une kétoisovalérate réductase NADPH-dépendante (codée par le gène *kivr*) pourrait supposer être impliquée dans la biosynthèse d'enniatines. Cette enzyme catalyse la réduction de l'acide 2-kétoisovalérique en acide D-hydroxyisovalérique (Stępień and Waśkiewicz, 2013; Zhang et al., 2013). Enfin FavPac1 est un homologue du facteur de transcription qui est impliqué dans la régulation de l'homéostasie du pH chez *A. nidulans* (Peñalva and Arst, 2004) et qui est au centre des études décrites dans le Chapitre 2 de ce manuscrit. Pour ces trois gènes, nous avons défini les conditions optimales pour étudier leur variation d'expression : conditions de RT-qPCR, temps de culture, choix des gènes de référence adaptés. Les amorces et protocoles RT-qPCR optimisés sont décrits dans la partie Matériels et méthodes de ce préambule.

Quatre gènes de référence (β -tubuline, RBP2, Efl α et Citrate synthase) ont été sélectionnés ; les gènes ont été validés et choisis parmi ces quatre, suivant leur stabilité selon les conditions d'étude (effet de la variation du pH ou l'effet d'une supplémentation par un acide phénolique). Une analyse comparée de l'expression des gènes, *esyn1*, *kivr* et *Pac1* pour la souche I612 a été réalisée aux temps 2, 3, 4 et 5 jours. Les résultats ont indiqué une expression quantifiable dès 2 jours de culture, supérieure et équivalente aux jours 3, 4 et 5 pour les trois gènes. La détection initiale de l'expression de ces gènes dès le jour 2 coïncide avec l'initiation de la production d'enniatines dans le milieu. Le jour 5 qui permet de disposer d'une quantité de mycélium non limitante a été choisie pour les études ultérieures. Les niveaux d'expression des trois gènes cibles, exprimés par rapport aux expressions quantifiées au jour 2 sont reportés dans la Figure 2.

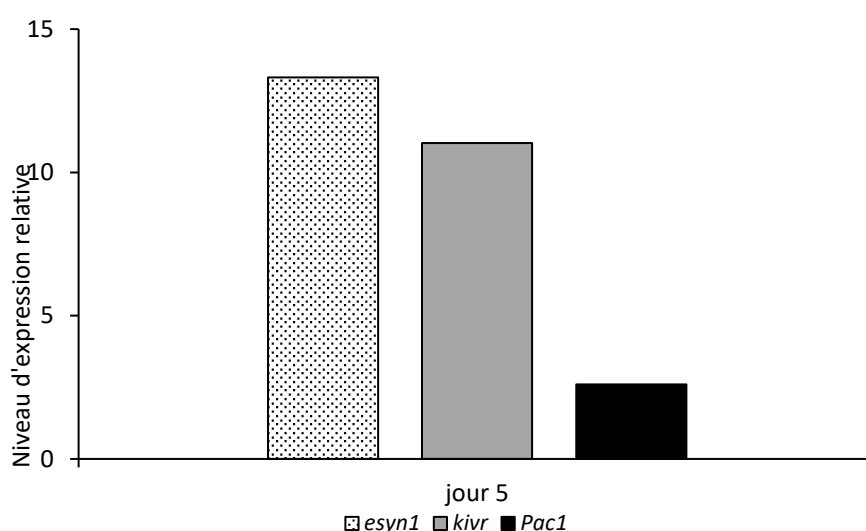


Figure 2 : Expression relative des gènes *esyn1*, *kivr* et *FavPac1* dans le milieu liquide FDM. Les niveaux d'expression relative d'*esyn1* (barres en pointillés), de *kivr* (barres grises) et *FavPac1* (barres noires) sont donnés par rapport au contrôle obtenu au jour 2.

Les caractéristiques majeures des cultures mises en œuvre peuvent se résumer autour des cinq points clefs reportés ci-dessous :

- Forte croissance observée jusqu'au 7^{ème} jour avant l'atteinte d'un palier jusqu'à la fin de la culture
- Augmentation du pH du milieu FDM au cours du développement mycélien
- Initiation de la production d'enniatines dès 3 jours avec une accumulation maximale au 4^{ème} jour puis atteinte d'un palier, voire une diminution faible jusqu'en fin de cinétique
- ENN B est la forme majoritairement produite chez *F. avenaceum* I612
- Expression conséquente des gènes cibles (*esyn1*, *kivr* et *pac1*) après 3, 4 et 5 jours de culture

II. Matériels et méthodes

Sont décrits ici les matériels et méthodes utilisés pour les cultures en milieu liquide.

II.1. Préparation de l'inoculum

Les souches de *F. avenaceum* (Tableau 1) sont conservées en chambre froide (4°C) sous huile sur un milieu gélosé Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, France) incliné. Avant expérimentation, les souches sont repiquées sur boîte PDA à 25°C. Le milieu carboxyméthylcellulose (CMC) (15 g CMC, 1 g d'extrait de levure, 0,5 MgSO₄, 7 H₂O, 1 g NH₄NO₃, 1 g KH₂PO₄, pour 1L de milieu) (Sigma, France) est utilisé pour la production de spores (Cappellini and Peterson, 1965). A partir du repiquage sur milieu PDA, plusieurs implants (4-5 plugs) sont prélevés, puis mis en culture dans le milieu CMC (50 mL) sous agitation (180 rpm, Infors™ Multitron Standard) pendant 3 jours minimum et à 25°C. Cette solution est ensuite filtrée et rincée à l'eau distillée stérile (Sefar Nitex® 100 µm, VWR), le nombre de spores est compté sur cellule de Thoma et dilué pour obtenir une concentration finale de 10⁴ spores/mL.

II.2. Milieux et conditions de culture

Le milieu FDM contient 12,5 g de glucose, 4,25 g of NaNO₃, 5 g NaCl, 2,5 g MgSO₄; 7 H₂O, 1,36 g KH₂PO₄, 0,01 g FeSO₄; 7 H₂O, 0,0029 g ZnSO₄ pour 1L de milieu (Fanelli et al., 2014). Les cultures sont réalisées en trois répliques. Des boîtes de pétri stériles (55 mm de diamètre, VWR) contenant 8 mL de milieu FDM liquide sont inoculées avec 100 µL de suspension de spores. Ces cultures liquides fongiques sont incubées à 25°C et à l'obscurité. Pour les différents temps d'arrêt de cultures, les cultures mycéliennes sont récupérées dans des corning pré-pesés (Eppendorf, 15 mL) et centrifugées à froid (4°C) pendant 10 minutes à 5000 rpm. Le milieu de culture filtré contenant les toxines secrétées par le champignon est conservé à -20°C dans un nouveau corning (Eppendorf, 15 mL) jusqu'à l'extraction des enniatines. Le culot contenant la masse fongique est congelé à -80°C pendant 24h avant d'être lyophilisé pendant 48h (Cryotec®). On distingue les mycélia utilisés pour quantifier le développement fongique de ceux destinés pour l'extraction d'ARN. Dans ce dernier cas, les cultures sont filtrées dans des tubes Supelco stériles (Sigma-Aldrich, France). Le surnageant est récupéré par filtration dans un corning (Eppendorf, 15 mL) tandis que le mycélium est rincé abondamment avec de l'eau distillée stérile. A l'aide d'une spatule, il est transféré dans un tube (Eppendorf, 2 mL) et plongé immédiatement dans l'azote liquide.

Les mycélia sont stockés à -80°C avant extraction des ARNs et les tubes contenant les surnageants sont conservés comme précédemment pour extraire et doser les enniatines.

Des contrôles appropriés utilisant un milieu FDM non inoculé (témoin négatif) sont effectués. La mesure du pH est effectuée à l'aide d'un pH-mètre (Five Easy Plus™, Mettler Toledo).

Tableau 1. Liste des souches de *F. avenaceum* utilisées au cours de l'étude.

Souche	Fournisseur	Hôte	Zone géographique	Année d'isolement
INRA 874	Canadian Collection of Fungal Cultures (FaLH03)	Blé de printemps	Canada	2011
INRA 873	Canadian Collection of Fungal Cultures (FaLH27)	Blé d'hiver	Canada	2011
INRA 612	GEVES (01.01.09.06)	Blé	Ecosse	2010
INRA 611	GEVES (01.01.09.04)	Blé	NC	2010
INRA 499	Bayer	Blé tendre	France (17)	2007
INRA 498	Bayer	Blé tendre	NC	2007
INRA 497	Bayer	Blé tendre	France (09)	2007
INRA 496	Bayer	Blé tendre	NC	2007
INRA 495	Bayer	Blé tendre	France (86)	2007
INRA 494	Bayer	Blé tendre	France (56)	2007
INRA 113	MycSA	Maïs	France (45)	2001
INRA 112	MycSA	Maïs	France (41)	2001

NC : non communiqué

II.3. Extraction et dosage des enniatines

Cinq mL de milieu de culture sont extraits avec dix mL d'acétate d'éthyle (VWR, USA). Après 5 minutes d'agitation (type vortex Multi reax, Grosseron) et de décantation, 5 mL de la phase organique sont récupérés et évaporés à sec à 45°C sous flux d'azote. L'extrait sec est repris dans 200 µL méthanol/eau (50:50, v/v) (VWR, USA) puis filtré sur un filtre seringue (0,22 µm, UGAP) avant d'être analysés par UPLC-DAD (Ultra High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector). La chaîne UHPLC Shimadzu Prominence est équipée de deux pompes LC-20AD, d'un dégazeur DGU-20A3R, d'un échantillonneur automatique SIL-30AC et d'un détecteur à barrettes de diodes SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, France).

La quantification est effectuée avec un étalonnage externe en utilisant des étalons commerciaux d'enniatiens de type A, A1, B et B1 (Sigma-Aldrich, France). A partir d'une solution mère à 100 µg/mL, 6 points de gamme sont préparés et dilués dans du méthanol/eau (50:50, v/v) pour obtenir une gamme d'étalonnage allant de 1 µg/mL à 100 µg/mL. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne Kinetex C18 (150 x 4,6 mm ; 3,5 µm) (Phenomenex, USA) maintenue à 45°C.

Les phases mobiles sont constituées d'eau ultra pure (solvant A, Biopure Romer) et d'acétonitrile (solvant B, VWR), et le gradient d'élution est présenté dans le Tableau 2. Le volume d'injection est de 5 μ L. Le débit est maintenu à 700 μ L/min. Les spectres UV-visibles sont enregistrés de 190 à 450 nm et les aires de pic sont mesurées à 205 nm. Les toxines sont exprimées en μ g/g de masse sèche et présentées individuellement selon le type d'enniatines (A, A1, B ou B1).

Tableau 2 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des enniatines pour l'UPLC-DAD (solvant A : d'eau ultra pure, solvant B : acétonitrile).

Temps (min)	% Solvant (A)	% Solvant (B)
0	70	30
2.5	70	30
7.5	1	99
11	1	99
11.5	70	30
14	70	30

II.4. Suivi de l'expression de gènes cibles

L'ARN total est extrait des mycéliums à 2, 3, 4 et 5 jours. Cinq réplicas biologiques sont préparés pour chaque condition.

Le mycélium congelé est broyé (~ 20 mg) (Precellys Evolution & Cryolis, Bertin Instruments) avec des billes de verre dans 350 μ L de tampon de lyse (Kit NucleoMag RNA® 96, Macherey-Nagel #744350.4). Les billes et les débris cellulaires sont mis en culot par centrifugation (5600g pendant 5 minutes à 4°C). L'ARN total est extrait à l'aide du système automatisé MagMAX™ (Thermo Fischer Scientific) en suivant les instructions du fabricant du kit NucleoMagRNA® 96 incluant le traitement de la DNase. La qualité de l'ARN préparé est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose et quantifié par spectrométrie (Nanodrop 1000/2000). L'absence de contamination par de l'ADN génomique a été vérifiée par qPCR (Light cycler 2.0, Roche) sur 1 μ L d'ARN total (20 ng/ μ L) mélangé à 9 μ L de mélange réactionnel à l'aide du kit QuantiFast™ SYBR® Green PCR (Quiagen, Pays-Bas). Le mix réactionnel est préparé avec 2 μ L de RNase free water, 5 μ L QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 2X et 1 μ L de chaque amorce à 10 μ M avec le programme qPCR présenté dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Paramètres d'amplification de la PCR quantitative pour vérifier l'absence de contamination des ARNs en ADN génomique.

Etape	Nombre de cycle	Température	Temps	Montée en température (°C/sec)
Activation	1	95	5 min	20
Dénaturation	45	95	10 sec	20
Elongation		58	40 sec	20
		95	x	20
Courbe de fusion	1	65	15 sec	20
		95	x	0,1
Refroidissement	1	40	30 sec	20

Un traitement DNase supplémentaire peut-être réalisé selon les instructions du fournisseur (Invitrogen™ Kit TURBO DNA-free) si de l'ADN génomique est détecté dans les échantillons. On redosera alors les ARN traités par spectrophotométrie et vérifiera de nouveau l'absence d'ADN génomique résiduel par qPCR.

La transcription inverse a été réalisée avec le kit SuperSript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur. 1 µg et 350 ng d'ARN totaux sont ajoutés au mix contenant : 1 µL d'oligo(dT)₂₀ 50 µM, 1 µL de mix de dNTP à 10 mM chacun, qsp 13 µL d'eau. Après 5 minutes d'incubation à 65°C suivies d'une minute de refroidissement sur glace, 7 µL de mix RT sont ajoutés aux échantillons. Après 10 minutes à 55°C et 10 minutes à 80°C, les réactions sont transférées sur glace. Puis 1 µL de RNase H 2U/µL est ajouté. Après 20 minutes à 37°C, les échantillons d'ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation pour l'analyse qPCR. Les analyses sont effectuées sur le QuantStudio5™ en utilisant 1 µL d'ADNc (10 ng/µL d'ARN reverse transcrit) mélangé à 9 µL de mélange réactionnel préparé à l'aide du Power Track SYBR® Green Master Mix (Thermo Applied) (5 µL Power Track Sybr Green Master Mix, 0,5 µM de chaque amorce reverse et forward). Le programme d'amplification est présenté ci-dessous dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Paramètres d'amplification de la PCR quantitative pour l'étude de l'expression des gènes.

Etape	Nombre de cycle	Température (°C)	Temps (sec)	Montée en température (°C/sec)
Activation	1	95	20	2,74
Dénaturation	40	95	3	2,74
Elongation		60	20	2,12
		95	1	2,74
Courbe de fusion	1	60	20	2,12
		95	0,01	0,15

Les données ont été effectuées et analysées sur un logiciel système QuantStudio5™ (v1.5.1, Applied Biosystems). Pour chaque gène, l'efficacité a été évaluée en utilisant des dilutions en série des échantillons d'ADNc (20-0,002 ng/μL) et les analyses de données ont été réalisées en comparant les valeurs de Cp. D'ailleurs ces valeurs d'efficacité sont comprises entre 2,00 et 2,03 à partir de la pente de la régression linéaire :

$$E = 2(10^{-\text{pente}} - 1) \text{ avec } E_{\text{MAX}} = 2 \text{ (E = 100\%).}$$

Les niveaux d'expression des gènes étudiés (voir Tableau 5) sont normalisés à l'expression du ou des gènes de ménage les plus stables. L'expression différentielle des gènes a été analysée avec REST®. Pour l'expérience de cinétique, le gène codant pour la citrate synthase (5000 permutations, $p \leq 0,05$) a été choisi comme référence interne. Les résultats sont rapportés par rapport à l'expression du J2 en valeur log2 du rapport entre les échantillons et le contrôle.

Tableau 5 : Caractéristiques des amorces choisies pour les gènes de référence et les gènes ciblés.

Gène de référence		Amplicon (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	Numéro d'accèsion/ Références
β-tubuline	β-tubuline 261F	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	248	(Glass and Donaldson, 1995)
	β-tubuline 536R	GATTGACCGAAAACGAAGTTG		(Pinson-Gadais et al., 2008)
EF1 α	FAEF1αF FAEF1αR	ACTTCCCCTCCAGGATGTCT GTTACCACGTCGGATGTCCT	232	<i>F. avenaceum</i> FaLH03 : JQGD01000010.1
Citrate synthase	FACIT F FACIT R	GCAGTGCTCTCAGCTCTCCT GGGTGGACCAGAGGTAGTCA	171	<i>F. avenaceum</i> FaLH27 : JQGE01000019.1
RPB2	RPB2FaveF RPB2FaveR	CCGAGGATCTCGAACTTTAC CTTCCTCTTGTTCTCTCTTCTC	105	<i>F. avenaceum</i> MRC 1413 : MH582082.1 <i>F. avenaceum</i> p12.56.2016 : MK560856.1 <i>F. avenaceum</i> YNSF16-66 : MK185026.1 <i>F. avenaceum</i> YNSF16-68 : MK185027.1 <i>F. avenaceum</i> CML 3545 : MK572784.1
Histone 3	HistH3FaveF HistH3FaveF	GAGATTGACGATACCAGAAG GATAGCGGAAGACTGGAATC	120	<i>F. avenaceum</i> : Fa05001 : JPYM01000013.1 <i>F. avenaceum</i> FaLH03 : JQGD01000007.1 <i>F. avenaceum</i> p12.56.2016 : MK547655.1
Gènes ciblés		Amplicon (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	Numéro d'accèsion
<i>Pac1</i>	PAC_C-Fave-F(1) PAC_C-Fave-R(1)	CTCTGACGGCTATCTCTTCTA CCAAAGCCTTGGCTAACA	190	<i>F. avenaceum</i> Fa05001 : JPYM01000012.1:136516...138535
Keto-isovalérate reductase (<i>kivr</i>)	KIVR-Fave-F(1) KIVR-Fave-R(1)	CGGAGACTAGACCACAGTAT GCAAAGACGACAGAACTACA	151	<i>F. avenaceum</i> Fa05001 : JPYM01000010.1:959042...960415
Enniatin synthase (<i>esyn1</i>)	EsyAveScriTri-F EsyAveScriTri-R	GAGTCCTCTCCCAAGTTC AGTTGAAGACCACGAGAT	102	<i>G. avenaceum</i> 2562 : AF351597.2 <i>G. avenaceum</i> 262 : AF351594.2 <i>F. tricinctum</i> CBS253.50 : EF040582.1 <i>F. scripi</i> Z18755.3 <i>G. publicaris</i> Z48743.2 <i>G. publicaris</i> 108 :AF351606.2 <i>G. publicaris</i> 107 :AF351603.2 <i>F. poae</i> CBS186.96 : EF029061.1 <i>F. poae</i> CBS317.73 : EF029062.1 <i>F. sporotrichioides</i> CBS178.64 : EF029064.1

III. Bibliographie

- Alkan, N., Espeso, E.A., and Prusky, D. (2013). Virulence Regulation of Phytopathogenic Fungi by pH. *Antioxidants & Redox Signaling* 19, 1012–1025.
- Cappellini, R.A., and Peterson, J.L. (1965). Macroconidium Formation in Submerged Cultures by a Non-Sporulating Strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57, 962–966.
- Elbelt, S., Siou, D., Gelisse, S., Cruaud, C., Lannou, C., Lebrun, M.H., and Laval, V. (2018). Optimized real time QPCR assays for detection and quantification of *Fusarium* and *Microdochium* species involved in wheat head blight as defined by MIQE guidelines. *Molecular Biology* 1–32.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst, H.N., and Peñalva, M.A. (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *The EMBO Journal* 12, 3947–3956.
- Fanelli, F., Ferracane, R., Ritieni, A., Logrieco, A.F., and Mulè, G. (2014). Transcriptional regulation of enniatins production by *Fusarium avenaceum*. *Journal of Applied Microbiology* 116, 390–399.
- Fernandes, T.R., Segorbe, D., Prusky, D., and Di Pietro, A. (2017). How alkalinization drives fungal pathogenicity. *PLOS Pathogens* 13, 1–8.
- Gautier, C., Pinson-Gadais, L., and Richard-Forget, F. (2020). *Fusarium* Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 4788–4798.
- Glass, N.L., and Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323–1330.
- Hornbogen, T., Glinski, M., and Zocher, R. (2002). Biosynthesis of depsipeptide mycotoxins in *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 108, 713–718.
- Masachis, S., Segorbe, D., Turrà, D., Leon-Ruiz, M., Fürst, U., El Ghalid, M., Leonard, G., López-Berges, M.S., Richards, T.A., Felix, G., et al. (2016). A fungal pathogen secretes plant alkalinizing peptides to increase infection. *Nature Microbiology* 1, 1–9.
- Merhej, J., Boutigny, A.-L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2010). An Acidic pH is a determinant factor for TRI genes expression and trichothecenes B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives and Contaminants* 27, 710–717.
- Peñalva, M.A., and Arst, Jr.H.N. (2004). Recent Advances in the Characterization of Ambient pH Regulation of Gene Expression in Filamentous Fungi and Yeasts. *Annual Review of Microbiology* 58, 425–451.
- Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Frasse, P., Barreau, C., Cahagnier, B., Richard-Molard, D., and Bakan, B. (2008). Magnesium represses trichothecene biosynthesis and modulates *Tri5*, *Tri6*, and *Tri12* genes expression in *Fusarium graminearum*. *Mycopathologia* 165, 51–59.

- Ponts, N., Gautier, C., Gouzy, J., Pinson-Gadais, L., Foulongne-Oriol, M., Ducos, C., Richard-Forget, F., Savoie, J.-M., Zhao, C., and Barroso, G. (2020). Evolution of *Fusarium tricinctum* and *Fusarium avenaceum* mitochondrial genomes is driven by mobility of introns and of a new type of palindromic microsatellite repeats. *BMC Genomics* 21, 358.
- Prosperini, A., Berrada, H., Ruiz, M.J., Caloni, F., Coccini, T., Spicer, L.J., Perego, M.C., and Lafranconi, A. (2017). A Review of the Mycotoxin Enniatin B. *Frontiers Public Health* 5, 1–11.
- Prusky, D., Barad, S., Ment, D., and Bi, F. (2016). The pH modulation by fungal secreted molecules: a mechanism affecting pathogenicity by postharvest pathogens. *Israel Journal of Plant Sciences* 63, 22–30.
- Stępień, L., and Waśkiewicz, A. (2013). Sequence Divergence of the Enniatin Synthase Gene in Relation to Production of Beauvericin and Enniatins in *Fusarium* Species. *Toxins* 5, 537–555.
- Turner, A.S., Lees, A.K., Rezanoor, H.N., and Nicholson, P. (1998). Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology* 47, 278–288.
- Zhang, T., Zhuo, Y., Jia, X., Liu, J., Gao, H., Song, F., Liu, M., and Zhang, L. (2013). Cloning and characterization of the gene cluster required for beauvericin biosynthesis in *Fusarium proliferatum*. *Science China Life Sciences* 56, 628–637.
- Zhao, M., Wang, X.Y., Xu, S.H., Yuan, G.Q., Shi, X.J., and Liang, Z.H. (2020). Degradation of ochratoxin A by supernatant and ochratoxinase of *Aspergillus niger* W-35 isolated from cereals. *World Mycotoxin Journal* 13, 287–297.

Chapitre 1

Chapitre 1 : Caractérisation de la diversité phénotypique intraspécifique chez *F. avenaceum*

Les résultats de ce chapitre sont rédigés sous la forme d'un article scientifique qui sera prochainement soumis.

Article : "Phenotypic variations within *Fusarium avenaceum*: variable and versatile behaviours according to abiotic conditions" Gautier et al, soumis prochainement

Charlotte GAUTIER¹, Nathalie FERRER¹, Nathalie GALLEGOS¹, Magalie MOINARD¹, Marie-Noelle BONNIN-VERDAL¹, Sylvain CHEREAU¹, Marie FOULONGNE-ORIOU¹ and Florence RICHARD-FORGET^{1*}

¹ INRAE, UR 1264, Unité MycSA, 71 Avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon, France

* Corresponding author: florence.forget@inrae.fr; Tel: +33-5-57-12-24-83

Keywords: *Fusarium avenaceum*, fungal growth, enniatins, abiotic stresses.

I. Introduction

Fusarium head blight (FHB) is a fungal disease affecting small grain cereals mainly caused by pathogenic fungi of the genus *Fusarium*. Nearly 20 fungal species have been reported to be involved in FHB, the most common in Europe being *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum* and *Fusarium tricinctum* (Beccari et al., 2018). Under appropriate environmental conditions, the previous *Fusarium* species are able to synthesize toxic secondary metabolites called mycotoxins that accumulate in grains and subsequently contaminate processed food and feed products (Bhat et al., 2010). FHB raises significant economic (yield losses, alteration of grain quality) and health (risk to human and animal health related to the presence of mycotoxins) issues. Some of these mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) characterized by a high toxicological relevance are subject to European regulations (regulation n°1126/2007). However, other so-called emerging mycotoxins including enniatins, beauvericin, moniliformin and fusaproliferin that are frequently found in cereal crops are not legislated because the knowledge regarding their *in vivo* toxicity is far too limited to allow performing a human risk assessment (Jestoi, 2008; EFSA, 2014). This is particularly of great concern for enniatins which have been shown to frequently contaminate cereal crops and with concentrations that can be very high, reaching 500 mg/kg of grains in some situations (Gautier et al., 2020). Enniatins are cyclic hexadepsipeptides; they are frequently found in mixtures with other major regulated mycotoxins. No less than 29 different analogues of enniatins have been distinguished so far (Sy-Cordero et al., 2012; Smith et al., 2016). While recent *in vitro* studies have demonstrated that enniatins are cytotoxic, hepatotoxic and even genotoxic (Prosperini et al., 2017; Svingen et al., 2017), the available toxicological data remain highly incomplete; health risks induced by enniatins exposure cannot be excluded for the consumers. This is why a better characterization of *Fusarium* species producing these emerging mycotoxins is essential to implement strategies aiming at preventing the risk of infection and contamination of cereal harvests. This knowledge could become even more crucial with climate changes, that are expected to lead to significant shifts in fungal species infecting cereals and mycotoxin patterns (Miraglia et al., 2009).

F. avenaceum has been identified as one of the main species responsible for the contamination of grains with enniatins (Gautier et al., 2020). Indeed several studies have reported a positive correlation between the amount of DNA of *F. avenaceum* and the content of enniatins in cereal grains (Uhlig et al., 2006; Fredlund et al., 2013; Orlando et al., 2019).

F. avenaceum is an ubiquitous pathogen present on a wide range of hosts, including cereals but also various fruits, vegetables and spices; enniatins can be found in a wide variety of agricultural commodities (Gautier et al., 2020). This observation suggests that the ecophysiological conditions conducive to enniatins biosynthesis are particularly broad. *F. avenaceum* has long been confused with other species such as *Fusarium acuminatum* and *Fusarium arthrosporioides* on the basis of morphological and physiological characteristics (Leslie and Summerell, 2006; Harrow et al., 2010). In an attempt to clarify *F. avenaceum* taxonomy, several studies have used molecular approaches and defined species-specific primers (Turner et al., 1998; Yli-Mattila et al., 2002, 2004). On the basis of mycotoxin profiles, *F. avenaceum* and *F. tricinctum* are the two closest species (Burmeister and Plattner, 1987; Kokkonen et al., 2010). Differently from other major FHB pathogens, such as *F. graminearum*, *F. culmorum* or *F. poae*, that have been classified in the *F. sambucinum* species complex, *F. avenaceum* belongs to a more distant taxonomic group, the *F. tricinctum* species complex (O'Donnell et al., 2013). Several reports have suggested the occurrence of a high genetic diversity within *F. avenaceum* (Feng et al., 2010; Kulik et al., 2011). However, with the exception of studies that have compared the capacity of different isolates to produce mycotoxins (Stępień and Waśkiewicz, 2013) or to infect various plants including cereals (Yli-Mattila et al., 2004), lisianthus (Nalim et al., 2009), lupin (Holtz et al., 2011), faba bean (Afshari et al., 2019), very little is known as regards the phenotypic intraspecific diversity within this *Fusarium* species. Such diversity could underlie the large variety of ecological and ecophysiological niches in which *F. avenaceum* can grow.

Moreover, the knowledge about the environmental factors (temperature, pH, carbon sources, light...) that can affect *F. avenaceum* behaviour and its production of enniatins are scarce. And yet abiotic stresses are well known for significantly affecting the development of various mycotoxigenic fungal species and the biosynthesis of major legislated mycotoxins (Schmidt-Heydt et al., 2008; Picot et al., 2011). Regarding enniatins, the published reports mostly focused on the effect of nutritional factors, mainly carbon and nitrogen sources (Lee et al., 2011), and of the effect of temperature and water activity (Kokkonen et al., 2010). In those studies, the number of enniatin-producing strains that were considered, and more particularly *F. avenaceum* isolates, was however limited to one or few.

The presence of *F. avenaceum* in a wide variety of cereal crops cultivated under a wide range of different environmental conditions raises the issue of the occurrence of a significant phenotypic diversity within this species. Characterizing this phenotypic variation is essential for defining prevention strategies aiming at minimising the levels of enniatins in food and feed products but also to anticipate the evolution of the enniatin risks due to modifications in production practices or climate changes. In this context, the present study was aimed to characterize (1) the phenotypic diversity of *F. avenaceum* for growth and toxin production traits under optimal conditions and (2) the variation of the response to abiotic stresses including pH and temperature, using a panel of twelve fungal strains isolated from cereals and different locations.

II. Materials and methods

II.1. *F. avenaceum* strains and inoculum production

Twelve different *F. avenaceum* strains were used in this study; their characteristics are reported in Table 1. All these strains, issued from monospore cultures, are conserved in the MycSA laboratory or in the Fungal Culture Collection of the International Centre of Microbial Resources (CIRM-CF), curated (Marseille, France). The twelve isolates were first assigned to the *F. avenaceum* species by a morphological characterization of the mycelial hyphae and their produced asexual (macroconidia) and/or vegetative (chlamydospores) mitospores (Leslie and Summerell, 2006). This assignation was further confirmed with species-specific primers (Turner et al., 1998; Elbelt et al., 2018; Ponts et al., 2020).

Stock cultures were maintained at 4°C on solid Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, France) slant medium under mineral oil. For further experiments, *Fusarium* strains were grown on PDA plates at 25°C in the dark for 5 days. To prepare the inoculum, PDA agar implants were introduced into a carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma, France) liquid medium (Cappellini and Peterson, 1965) at 25°C, under gentle shaking (180 rpm) for 3 days in darkness. The conidia were recovered by filtration of the liquid media (Sefar nitex® 100 µm, VWR) then counted using a Thoma cell chamber. The suspension was diluted to a final concentration of 10⁴ spores/mL and was used as inoculum solution.

II.2. Pigmentation and growth assay

Pigmentation of the mycelium and fungal growth were analysed on two solid synthetic media, PDA (Difco, France) or CM (Complete Medium, Leach et al., 1982) in petri dish (90 mm of diameter).

Ten μL of a $10^4/\text{ml}$ spores solution or 1 cm^2 of mycelium plug were disposed in the center of the petri dish. Moreover, these plugs are cut with a sterile spatula on the periphery of a fresh 4-day mycelial culture on a PDA medium. Petri dishes were incubated at 25°C in dark conditions. Three biological replicates were prepared for each condition.

Pictures were taken with a Nikon D3000 camera using standardized camera settings and lighting environments. Images analysis was performed using ImageJ software (Schneider et al., 2012). The images were superimposed and distances were scaled manually using a reference track (5 cm) placed during picture acquisition. All images were processed simultaneously using the “montage” option and the fungal surfaces were automatically delimited using saturation, hue and brightness thresholds. The delimited surfaces were integrated with ROI manager tool and mycelium surfaces values expressed in cm^2 . For growth kinetics, pictures were taken daily from day 1 to day 11. Maximum growth speed was calculated during the exponential phase and expressed in cm^2/day .

To assess the pigmentation, photos at day 11 were used for colour determination using Fiji edition of ImageJ software. From delimited mycelium surface, this software predicts a number of pixels converted into brightness values. For each value, a measure of Red, Green and Blue (RGB) channels was assigned. RGB average values were obtained thanks to colour histogram (Schneider et al., 2012).

Table 1. Strains of *F. avenaceum* used in this study.

Strain	Supplier	Host	Location	Isolate date
INRA 874	Canadian Collection of Fungal Cultures (FaLH03)	Wheat	Canada	2011
INRA 873	Canadian Collection of Fungal Cultures (FaLH27)	Wheat	Canada	2011
INRA 612	GEVES (01.01.09.06)	Wheat	Scotland	2010
INRA 611	GEVES (01.01.09.04)	Wheat	NA	2010
INRA 499	Bayer	Wheat	France (Charente Maritime department)	2007
INRA 498	Bayer	Wheat	NA	2007
INRA 497	Bayer	Wheat	France (Ariège department)	2007
INRA 496	Bayer	Wheat	NA	2007
INRA 495	Bayer	Wheat	France (Vienne department)	2007
INRA 494	Bayer	Wheat	France (Morbihan department)	2007
INRA 113	MycSA	Maize	France (Loiret department)	2001
INRA 112	MycSA	Maize	France (Loir-et-Cher department)	2001

NA: not available

II.3. Cultures in liquid media

Liquid culture experiments were performed using a FDM medium, reported as an enniatin-inducing medium (Fanelli et al., 2014). Sterile petri dishes (55 mm in diameter) containing 8 mL of FDM medium were inoculated with 10^4 spores and then incubated at 25°C in the dark for 11 days. To test the effect of temperature, incubation was performed at 15°C, 20°C, 25°C or 30°C. For each experiment, cultures were done in triplicates.

To test the effect of pH (pH 4, pH 5, pH 6 or pH 7), the FDM medium was prepared using McIlvaine's buffer solutions (McIlvaine, 1921). pH was monitored in media using an electronic pH meter (Five Easy Plus™, F20, FP20, Mettler Toledo).

After incubation, cultures were centrifuged at 4°C and 5000 g for 10 minutes. The supernatants were stored at -20°C until the analysis of enniatins. Fungal biomass was measured by weighing the mycelial pellet after 48 hours of freeze-drying (Cryotec®).

II.4. Toxin analyses

Five mL of culture supernatant were extracted with 10 mL of ethyl acetate (VWR, USA). Five mL of organic phase were evaporated to dryness at 45°C under a gentle nitrogen flow. The dried extract was then resuspended in 200 µL of methanol/water (50:50, v/v) (VWR, USA) before analysis by UHPLC-DAD (Ultra High-Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector). The Shimadzu Prominence UHPLC chain is composed of two pumps LC-20AD, a degasser DGU-20A3R, an auto sampler SIL-30 AC and a diode-array detector SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, France).

Chromatographic separation was carried out on a Kinetex C18 column (150 x 4.6 mm; 3.5 µm) (Phenomenex, USA) maintained at 45°C. The mobile phase consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). Enniatins were separated using an elution gradient as follows: 30% B for 2.5 min, 30 to 99% B in 5 min, 99% B for 3.5 min, 99 to 30% B in 0.5 min, 30% B for 3.5 min. The injection volume was 5 µL. The flow rate was maintained at 700 µL/min. UV-visible spectra were recorded from 190 to 450 nm and peak areas were measured at 205 nm. Quantification was performed with reference to an external calibration (1 to 100 µg/mL) using commercial A, A1, B and B1 enniatin standards purchased from Sigma-Aldrich (France) and dissolved in methanol/water (50:50, v/v). Toxins were expressed in µg/g of dry weight.

II.5. Statistical analysis

Statistical differences of means were tested using ANOVA. When found significant ($p < 0.05$), Tukey's Post Hoc Test ($\alpha = 0.05$) were conducted using ggubr packages in R (version 3.6.3). PCA analysis were conducted using FactoMineR and Factoshiny packages in R version 3.6.3.

III. Results and discussion

III.1. Visual and RGB comparison of the colours of aerial mycelia

Pictures of CM plates after 11 days of culture for the twelve strains of *F. avenaceum* are reported in Figure 1.

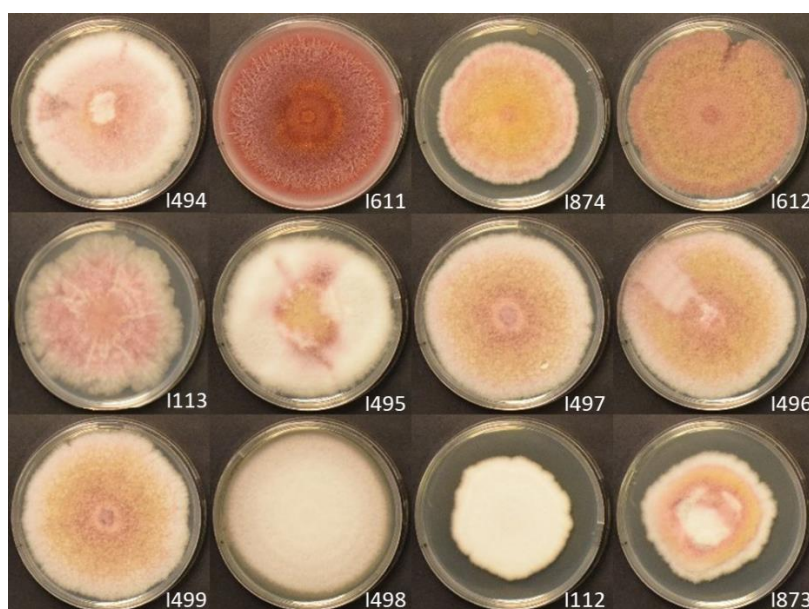


Figure 1. Mycelium aspect of the twelve *F. avenaceum* strains after 11 days of culture at 25°C in CM medium with a spore inoculation.

The Figure 1 clearly illustrates differences in mycelium colour among the twelve studied strains. More or less coloured mycelia were observed with, for instance, a red mycelium associated with the strain I611 and a cream-coloured one for the strain I498. For the other strains, the mycelium colour ranged from white-beige to pink or orange (Figure 1). This experiment was also carried out using plugs as inoculum and we observed the same colour trends (data not shown).

It can be noticed that, with the exception of I874, I873 and I112, the *F. avenaceum* isolates have nearly invaded the totality of the petri dish after 11 days of culture. Differences in the morphological aspect of the mycelium were also observed. While all strains were characterized by an aerial mycelium, the strain I611 appeared to develop with a grazing mycelium. For some strains, the mycelium looked cottony (strains I112, I495 or I873) or fluffy (strains I113 and I612). These data corroborate the observations of previous studies that have reported differences in the colour and aspect of *F. avenaceum* mycelia (Cormack, 1951; Feng et al., 2010; Yli-Mattila et al., 2018). Those authors mentioned aerial and cottony abundant mycelia with white to carmine colour when the isolates were grown in PDA or PSA (Potato Sucrose Agar) medium. We also performed PDA cultures that have led to similar observations regarding the colour and appearance of mycelia, compared to CM cultures (data not shown). PDA and CM are both “rich media” (Leach et al., 1982; Leslie and Summerell, 2006), CM being less concentrated in sugar than PDA (10 g vs. 20 g). In addition, CM contained yeast extract. According to our results, these differences in composition do not seem to affect either mycelial pigmentation or morphology.

During photo processing on ImageJ software, the RGB values were retrieved to quantitatively analyse the colour of the mycelium for each strain of *F. avenaceum*. First of all, whatever the medium (PDA or CM) and the type of inoculum (spores or plug) the red channel was characterized by the highest value, followed by the green and blue channels (Figures 2 and 3). With the spore-inoculated in CM condition (noted s_CM), the red channel values average was 219.3 ± 7.3 and values of 192.7 ± 11.2 and 157.6 ± 13.2 were obtained for the green and blue channels respectively (Figure 2). We also noticed that while the average values of red channel were equivalent between the two inoculation procedures (plug vs. spore), values associated with the green channel and the blue channel were lower in the case of inoculated plugs (data not shown).

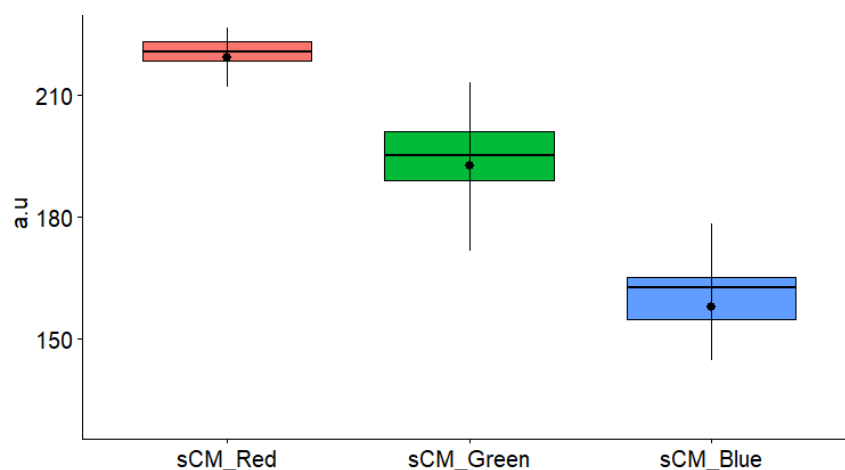


Figure 2. Box-plot of RGB values related to *F. avenaceum* mycelia after 11 days of culture on CM medium inoculated with spores (arbitrary unit: a.u.). Point (●) represents the average, horizontal axis (—), the median and vertical axis (|) is the whisker.

Looking at the panel of strains, most of the isolates were characterized by close RGB channel values as illustrated on Figure 3. For s_CM condition, the mycelium of the strain I112 was associated with the highest values of red (226.4), green (207.1) and blue (171.1), in accordance with the white colour observed in Figure 1. Three other strains of *F. avenaceum* seemed to differentiate themselves from the others: the mycelia of I113, I611 and I612 were characterized by lower green and blue channel values. The three lowest RGB values were associated with the mycelium of the *F. avenaceum* strain I113 (Figure 3).

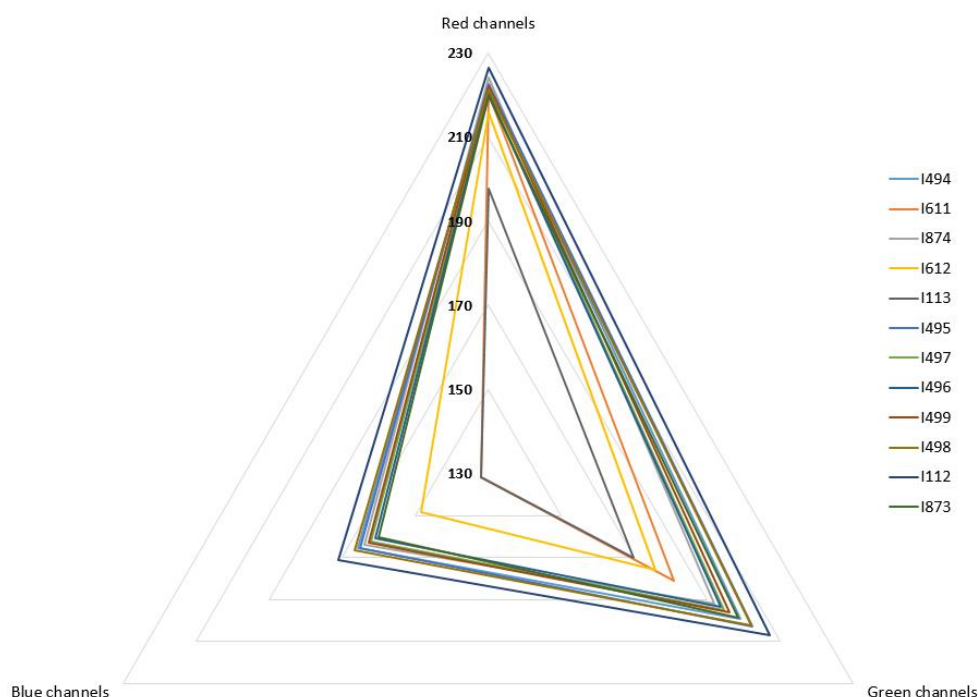


Figure 3. RGB channel values obtained at day 11 for strains of *F. avenaceum* cultivated in CM culture medium (spore inoculated cultures).

Several reports focusing on *F. graminearum*, a trichothecenes-producing species, have indicated that colour characteristics of the mycelia (RGB analysis) can be used to study and predict *in vitro* fungal growth, to observe differences in pigment production during the life cycle of the fungus, or to estimate the amount of toxins produced (Cambaza, 2018; Cambaza et al., 2018, 2019). However, to our knowledge, no similar study has been carried out with *F. avenaceum*, but our results suggest that, despite the variation observed among colour phenotype, RGB imaging tool could be useable for *F. avenaceum* detection. It has been shown that the red pigmentation of the mycelium of *F. graminearum* was associated with the deposit of aurofusarin in the fungal cell walls, in association with other pigments (mainly rubrofusarine and fusarubin) (Malz et al., 2005; Cambaza, 2018). According to the secondary metabolites data reported in the study of Sørensen and Giese, 2013 and to the genomic data published by Lysøe et al. (2014), *F. avenaceum* can produce the aurofusarin pigment. Indeed, the PKS gene involved in the aurofusarin biosynthetic pathway has been found in the genomes of the two Canadian strains (I874 and I873) of *F. avenaceum* (Lysøe et al., 2014). The report of Lysøe et al. (2014) has evidenced the great potential detained by *F. avenaceum* to produce a wide variety of secondary metabolites with more than 25 PKS genes, more than 25 NRPS genes and more than 15 terpene synthase genes.

In addition to aurofusarin, *F. avenaceum* has the genetic potential to produce other pigments including fuscofusarin or terpenoid pigments (Lysøe et al., 2014). The colour differences in our study is likely to be the reflect of the variation of those secondary metabolites production.

III.2. *In vitro* fungal growth

The mycelial areas were determined after 11 days of culture in PDA and CM media, with spore and plug inoculation procedures. Results are gathered in Figure 4. It clearly appears that, for a given condition, variations in fungal radial growth between the 12 isolates occurred.

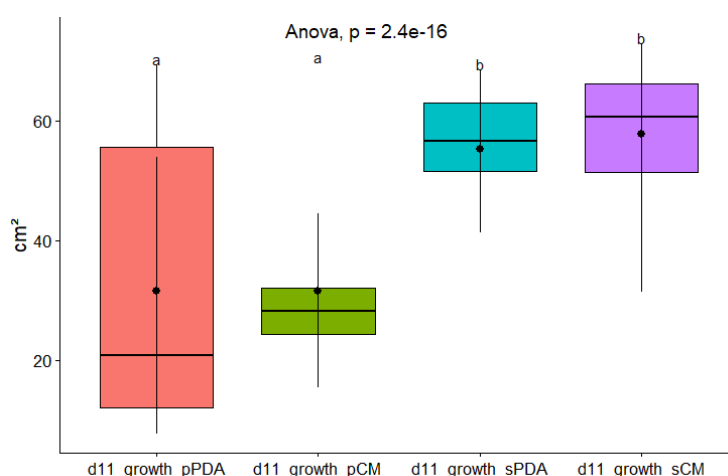


Figure 4. Mycelium area (cm²) of *F. avenaceum* strains after 11 days of culture in PDA and CM media, with a spore (noted s) or plug (noted p) inoculation procedure. Point (●) represents the average, horizontal axis (—), the median and vertical axis (|) is the whisker. Statistical differences between conditions were determined using Anova, followed by a Tukey's Post Hoc Test, $\alpha = 0.05$).

Moreover, for a given medium (CM or PDA), our results indicated significant differences in surface areas depending on the type of inoculum, spores or plugs ($p < 0.001$) (Figure 4). Actually, surfaces occupied by mycelia when plugs were inoculated were on average 1.5 times smaller than surfaces quantified with spores inoculation. On Figure 5A, strains have been classified according to the surfaces reached by mycelia in 11-day-old CM cultures with the plug inoculation modality. Data showed a wide variation between strains, with surfaces occupying 100% of the petri dish for the I113 isolate and less than 25% for the I112 isolate. Differences in mycelium areas with the spore inoculation procedure were less pronounced (Figure 5B). They however corroborated the great capacity of I113 to invade the Petri dish and the low radial growth of I112. When considering the PDA cultures, similar tendencies and strain classification were observed for both type of inoculation procedure (data not shown).

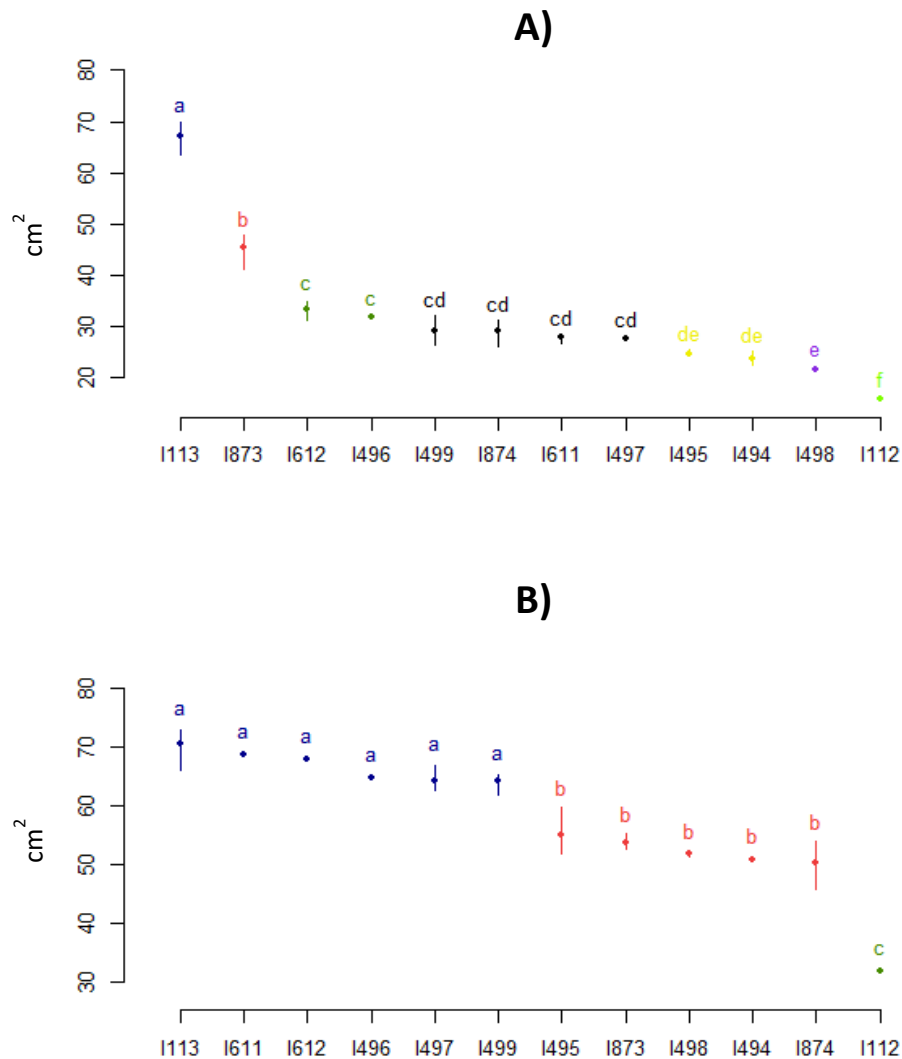


Figure 5. Average surfaces (cm²) of mycelia of *F. avenaceum* strains after 11 days of cultures inoculated with A) plugs or B) spores in CM culture medium. Point (●) represents the average and vertical axis (|) is error bar. Statistically significant differences between strains are indicated by letters (Tukey's Post Hoc Test, $\alpha = 0.05$).

To go further and assess whether the differences in surface areas were related to differences in fungal growth rates, the growth kinetic for each strain cultivated in CM medium were compared (Figure 6). With the plug inoculation procedure (Figure 6A), the growth was initiated between day 4 and day 5 whatever the considered strain. The strain I113 was shown to clearly differ from the others with a growth rate close to 8 cm²/day. For the other 11 strains of *F. avenaceum*, their mycelial growth rate ranged between 2 and 5.5 cm²/day. The slowest growth rates were observed for the strains I112 and I498. With exception of I113, fungal growth kinetic did not reach the growth plateau after 11 days of culture. Regarding spore inoculation modality (Figure 6B), the kinetic curves indicated a lower latency phase compared to the plug inoculation procedure, with a growth initiation between day 2 and day 3.

Growth rates were in the range 3.5-9 cm²/day, *i.e.* globally higher than the values determined in the plug inoculation procedure. The highest growth rate was observed for the I113 strain, while I112 and I498 were in the group of the lowest growing strains.

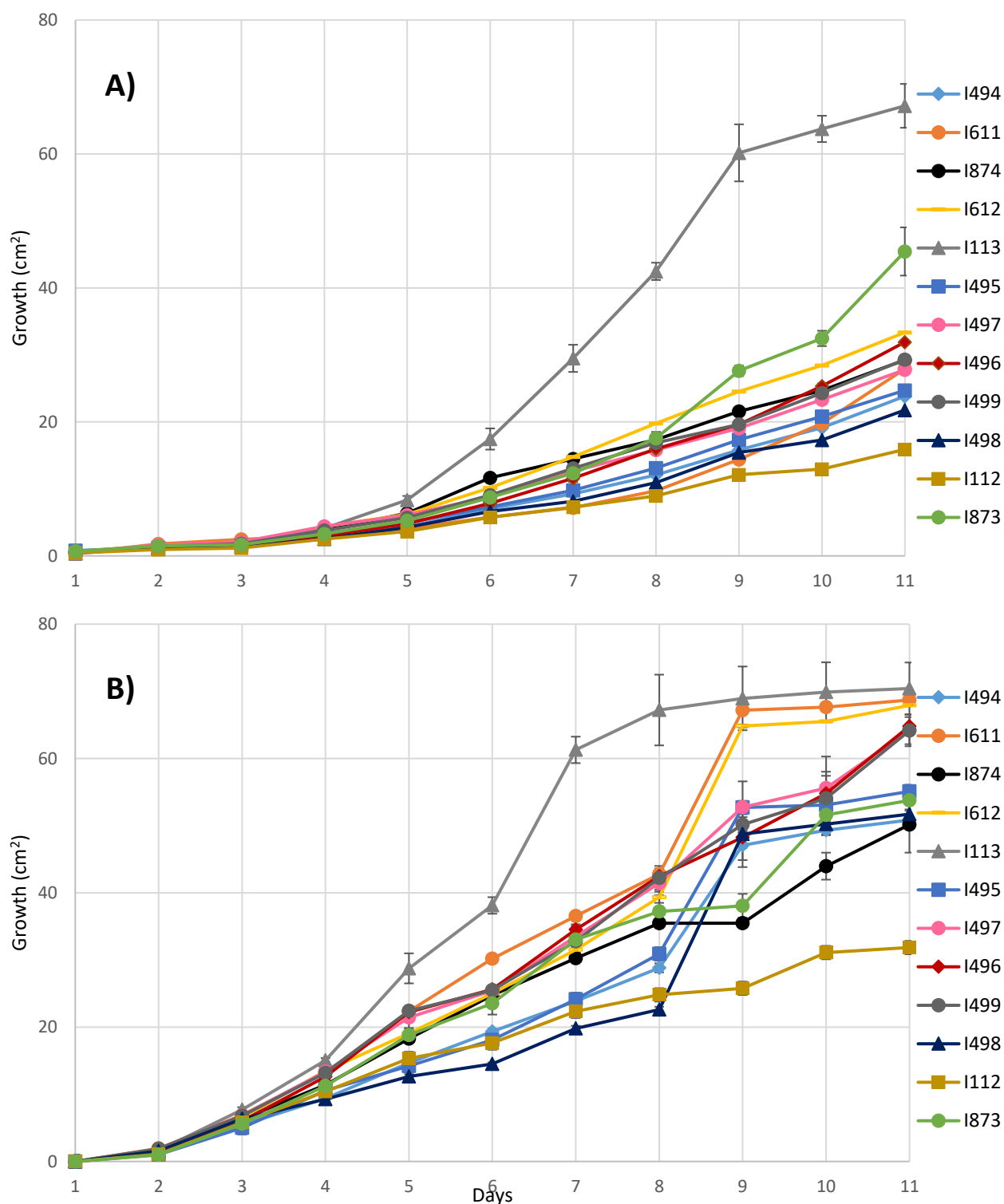


Figure 6. Kinetics of mycelial growth (cm²) from A) plugs or B) spores inoculated CM cultures of *F. avenaceum* strains. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.

It is worth mentioning that this chapter focused only on hyphal extension through radial growth measurement and did not allow to conclude on differences in fungal development. Indeed, neither the aerial mycelium, neither the fact that the mycelium can penetrate the agar, neither the density of the mycelium was considered. For instance, the strains I112, I495 and I874, characterized by a low radial growth, were those for which an aerial mycelium was observed.

III.3. Production of enniatin in FDM media

Mycelium weight and amounts of enniatins produced by each of the twelve strains in 11-day-old FDM liquid cultures are reported on Figure 7.

Values of fungal biomass were in the range 20-55 mg, indicating the occurrence of large differences in fungal development between strains. The highest mycelium weight was obtained for the *F. avenaceum* strains I113 and I496 (biomass > 50 mg) while the lowest one was related to strain I873 (< 20 mg). As previously observed with the radial growth values, the I113 isolate was at the top of the ranking while I112 was among the strains characterized by the lowest fungal biomass.

Looking at enniatins yields, while all strains were shown to produce quantifiable amounts of enniatins in our culture conditions, significant differences in concentration values were observed (Figure 7A). After 11 days of culture in FDM liquid medium, toxin concentrations (in µg per g of dry mycelium) were comprised between 30 µg/g and 8500 µg/g. Low producing strains (I112, I113 and I611) characterized by enniatin yields lower than 150 µg/g could be distinguished from high producing ones (the nine remaining strains) for which the concentrations of enniatins were higher than 1500 µg/g. Notably, the I612 isolate was shown to produce more than 8000 µg/g of enniatins (Figure 7A). Our results, illustrating the occurrence of a high variation in the toxigenic potential of *F. avenaceum* strains, corroborate previously published data (Stępień and Waśkiewicz, 2013; Covarelli et al., 2015; Prosperini et al., 2017). For example in the study of Fanelli et al. (2014), the concentrations of enniatins produced by a panel of *F. avenaceum* strains in FDM agar medium ranged from 14 µg/g to 350 µg/g of enniatins (Fanelli et al., 2014).

Our results indicated that, depending on the strain, not only the amounts of yielded toxins were variable but also the types of enniatins that were produced (Figures 7A and 7B). With regard to the distribution of enniatin forms, a large majority of the studied *F. avenaceum* strains produced mainly enniatins of the type B (Figure 7 A). Indeed, for nine strains, enniatin B was the predominant form, followed by enniatin B1, A and A1.

These results are in accordance with the predominance of enniatin B in contaminated grains (Dagnac et al., 2016; Prosperini et al., 2017). For a set of strains, the low producing ones, the profiles of enniatins were completely different: enniatin A1 was the only form quantified in I611 broths, enniatins A1 and B1 were produced by I113 (with enniatin A1 being the predominant form), enniatins A1, B1 and B were produced by I112.

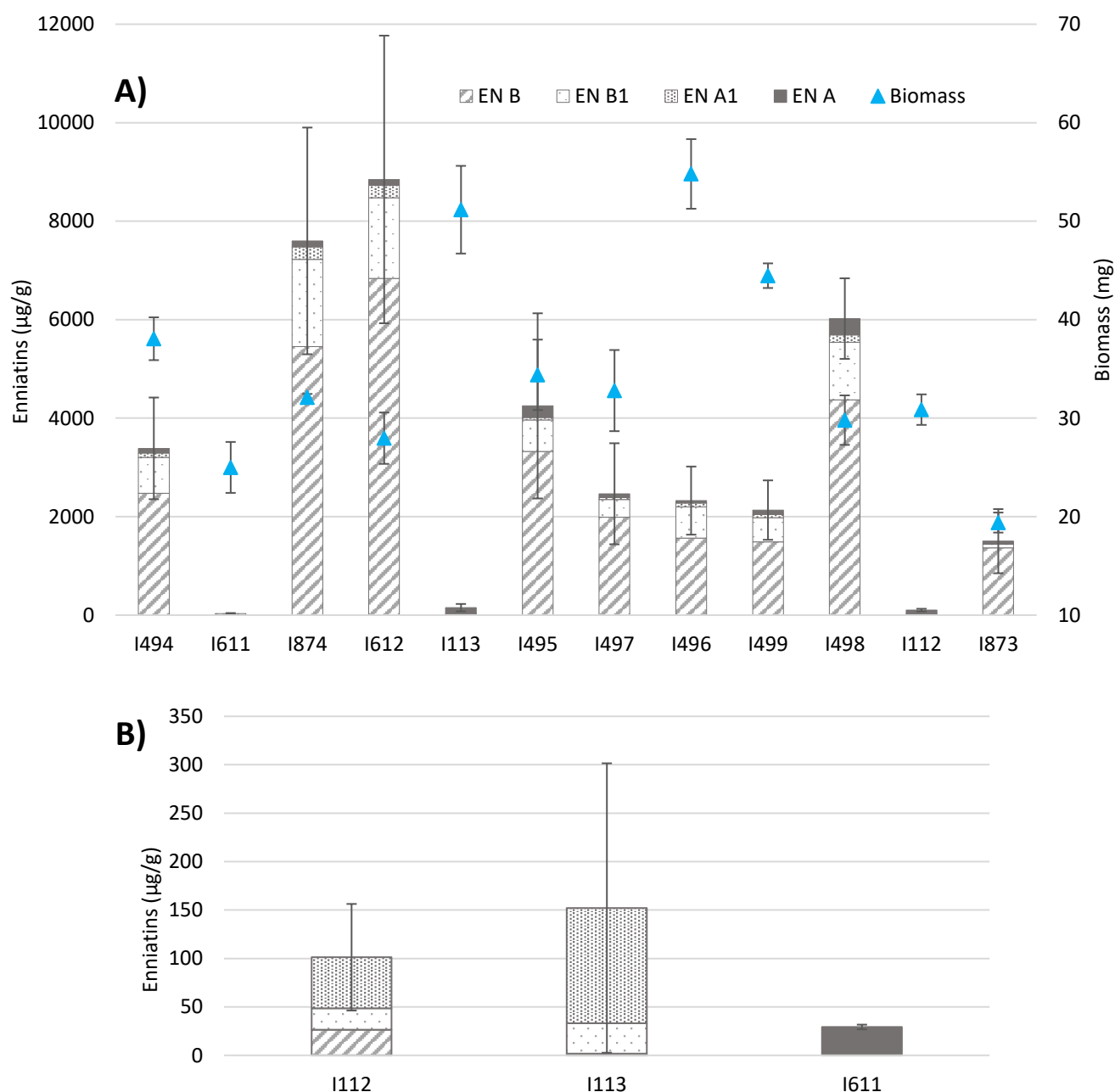


Figure 7. Cumulative histogram of enniatins (A, A1, B and B1) produced (µg/g) after 11 days of culture in FDM medium for A) the 12 strains of *F. avenaceum* and B) a zoom on the low toxin-producing strains. For each strain, the biomass value (mg) is represented by ▲. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.

As a reminder, the diversity of enniatins is due to the primary precursors and more precisely the amino acids entering the biosynthesis pathway (Süssmuth et al., 2011). Thus enniatin B is formed with three residues of valine, enniatin B1 with two valine and one isoleucine, enniatin A with three isoleucine and enniatin A1 with two isoleucine and one valine. The different profiles of the strains studied in the present study could be related to different compositions of broths as regards amino acids, as a result of differences in fungal metabolism. These different profiles could also be the result of different affinities of the ESYN protein to amino acids. Such differences in amino acid affinities were reported for *Fusarium sambucinum* that mainly produces enniatin A or for *Fusarium lateritium* that yields enniatin B (Pieper et al., 1992). It would be relevant to compare the structure of the ESYN protein of each studied *F. avenaceum* strain to visualize the potential occurrence of structural differences that could explain different affinities for amino acids.

III.4. Effect of temperature on the fungal biomass and enniatins production by *F. avenaceum*

The twelve *F. avenaceum* strains were cultivated in liquid FDM medium at four different temperatures (15°C, 20°C, 25°C and 30°C). Mycelium weights and enniatin yields were quantified in 11-day-old broths. Fungal biomass data gathered in Figure 8 indicate that all the tested strains were able to grow at the four temperatures. A great variation was observed within each temperature condition. When comparing the average values of growth, the highest amounts of fungal biomass were obtained at 20°C and 25 °C.

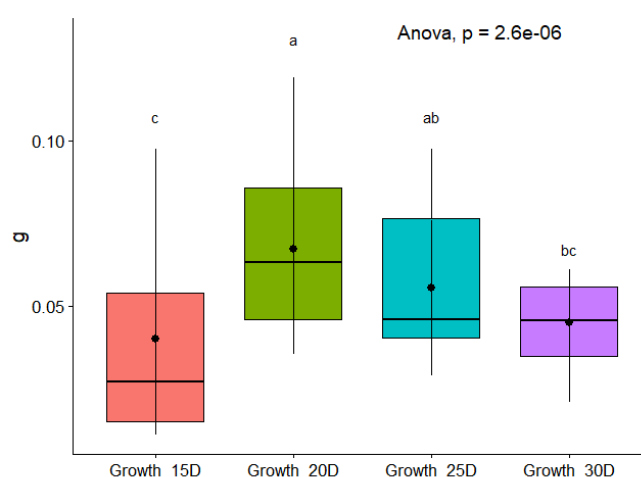


Figure 8. Fungal biomass quantified in 11-day-old FDM broths inoculated with the twelve *F. avenaceum* strains and incubated at 15°C, 20°C, 25°C and 30°C (D is °C). Point (●) represents the average, horizontal axis (—), the median and vertical axis (|) is the whisker. Differences between all temperature conditions were determined using Anova. Significant differences between each temperature are indicated by letters (Tukey's Post Hoc Test, $\alpha = 0.05$).

Regarding the growth profile of each of the twelve strains as a function of temperature, different tendencies were observed. While for most strains the highest mycelium weights were obtained at 20°C (I112, I494, I495, I499, I611, I873 and I874), the I612 strain was characterized by a highest fungal biomass value when cultivated at 15°C. Besides, the development of the strains I113, I498 and the strain I497 was shown to be favoured at 25°C and 30°C, respectively.

Altogether our results have revealed that *F. avenaceum* strains had the capacity to grow over a wide range of temperatures, which could be one reason for their presence in various climates characterized by different temperature patterns. Moreover, our data indicating that 20°C-25°C was the privileged temperature range for a large majority of the studied strains corroborate previously published data (Pettitt and Parry, 1996; Brennan et al., 2003; Hudec and Muchová, 2010)

When considering the enniatins data, results reported in Figure 9 evidenced that the temperature conditions could significantly affect the production of enniatins by *F. avenaceum* ($p = 5.2 \times 10^{-14}$). At the lowest temperatures (15°C and 20°C), no production was detected for most strains. The average enniatins production was highest at 25°C and was shown to still occur at 30°C. Figure 9 also illustrates the variation among strains for a given temperature, 25°C or 30°C.

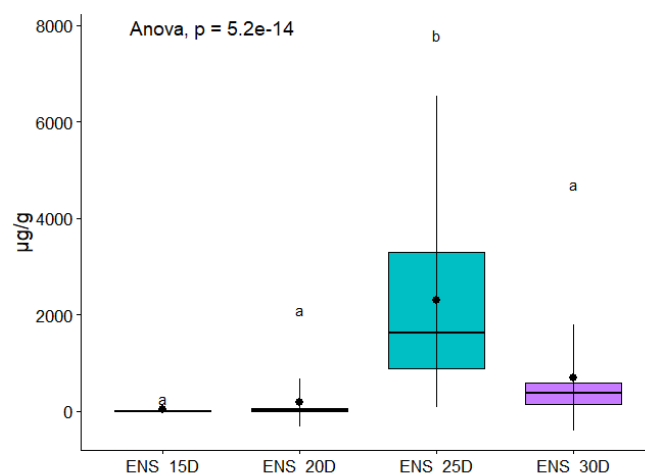


Figure 9. Enniatin amounts (sum of A, A1, B and B1 in µg/g) quantified in 11-day-old FDM broths inoculated with the twelve *F. avenaceum* strains and incubated at 15°C, 20°C, 25°C and 30°C (D is °C). Point (●) represents the average, horizontal axis (—), the median and vertical axis (|) is the whisker. Differences between all temperature conditions were determined using Anova. Significant differences between each temperature are indicated by letters (Tukey's Post Hoc Test, $\alpha = 0.05$).

At the fungal strain level (Figure 10), while most of strains appeared as unable to produce enniatins at 15°C (Figure 10), a quantifiable amount of mycotoxins was detected for three strains (I611, I873 and I874). Besides, 15°C was the temperature which has led to the highest concentration of enniatins for the strain I611. All strains significantly produced enniatins at both 25°C and 30°C, with a mycotoxin yield higher at 25°C than 30°C (Anova test, $p < 0.05$).

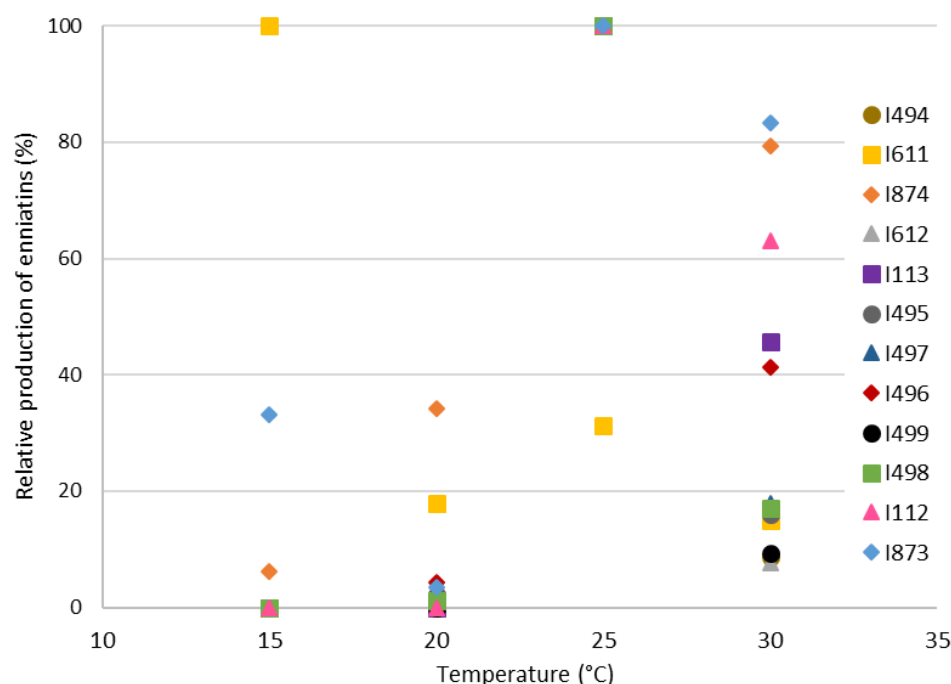


Figure 10. Temperature effect (15°C, 20°C, 25°C or 30°C) on the production of enniatins by the different strains of *F. avenaceum* after 11 days of culture in FDM medium.

Overall, our data suggest that whatever the considered temperature between 15°C and 30°C, a production of enniatins can occur, which could partially explained the worldwide occurrence of this group of mycotoxins in cereal crops. To our knowledge, few studies have investigated the impact of the temperature conditions on the production of enniatins by *F. avenaceum*. We can mention the study of Kokkonen et al., 2010 that has investigated the combined effect of water activity and temperature on the production of enniatins (a_w of 0.994/15°C, a_w of 0.994/25°C and a_w of 0.960/25°C) using a restricted set of three different strains. Those authors have concluded that none of the conditions they tested was more favourable than another. For another enniatin-producing species, *F. sambucinum*, the toxin production was reported to be favoured by temperatures higher than 20°C and lower than 30°C (Audhya and Russell, 1974). Similarly, for *F. oxysporum*, the maximum production of enniatins (H, I and MK1688) was observed at 25°C, even though this production could occur at 15°C, 20°C and 30°C (Lee et al., 2011).

To summarize, our data indicated that not only the growth of *F. avenaceum* but also its toxigenic potential was significantly affected by temperature. In general, a temperature of 20°C was shown to favour the fungal development while the enniatins production of *F. avenaceum* occurred more favourably at a higher temperature (25°C). This has been commonly reported in other *Fusarium* species. For instance, an optimum temperature for the growth of *Fusarium langsethiae* was determined at 20-25°C while for *F. sporotrichioides*, this optimum was 25-30°C (Nazari et al., 2014). The optimal temperature for the production of T-2/HT-2 toxins by *F. langsethiae* was 15°C and between 10-15°C for *F. sporotrichioides*. In comparison, *F. graminearum* and *F. culmorum* grow best at temperatures between 25°C-28°C although their production of trichothecenes B takes place over a wider temperature range between 15°C and 28°C (Llorens et al., 2004). These temperature differences could participate to the contrasting geographical distribution of these different species: *F. langsethiae* being present mainly in Europe (Torp and Nirenberg, 2004) and *F. culmorum*, *F. graminearum* or *F. sporotrichioides* under more various climates (Llorens et al., 2004; Glenn, 2007).

III.5. Effect of ambient pH on fungal biomass and enniatins production by *F. avenaceum* strains

The effect of ambient pH on *F. avenaceum* fungal biomass is shown in Figure 11. After 11 days of culture, a mycelium development was observed whatever the pH conditions (FDM buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH 7). Taken together, our data indicated contrasted fungal biomass values with higher biomass values at pH 6 and pH 7 than at pH 4 and pH 5 ($p = 4.1 \times 10^{-8}$). Moreover, a greater variation between strains was observed at pH 6 and pH7 than at lower pH.

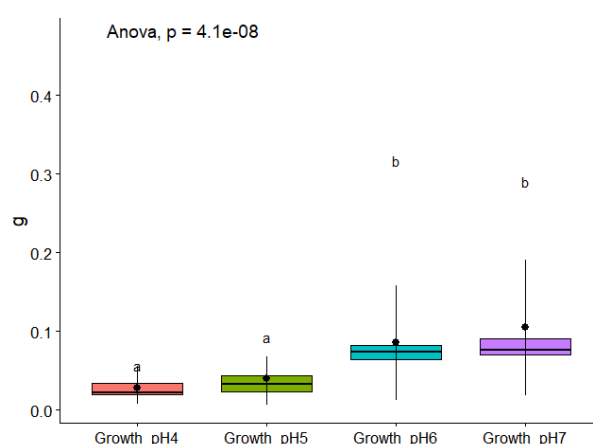


Figure 11. Fungal biomass quantified in 11-day-old FDM broths (buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH 7) inoculated with the twelve *F. avenaceum* strains. Point (●) represents the average, horizontal axis (—), the median and vertical axis (|) is the whisker. Differences between all pH conditions were determined using Anova. Significant differences between each pH are indicated by letters (Tukey's Post Hoc Test, $\alpha = 0.05$).

In Figure 12, it can be pointed out that most strains have a higher growth rate at pH 6-7. One exception was the strain I611 which showed a similar growth whatever the pH conditions (~ 0.04 g). The fungal biomass accumulated in 11-day-old broths did not exceed 0.1 g regardless of the pH, excepted for the I113 cultivated at pH 6 and pH 7.

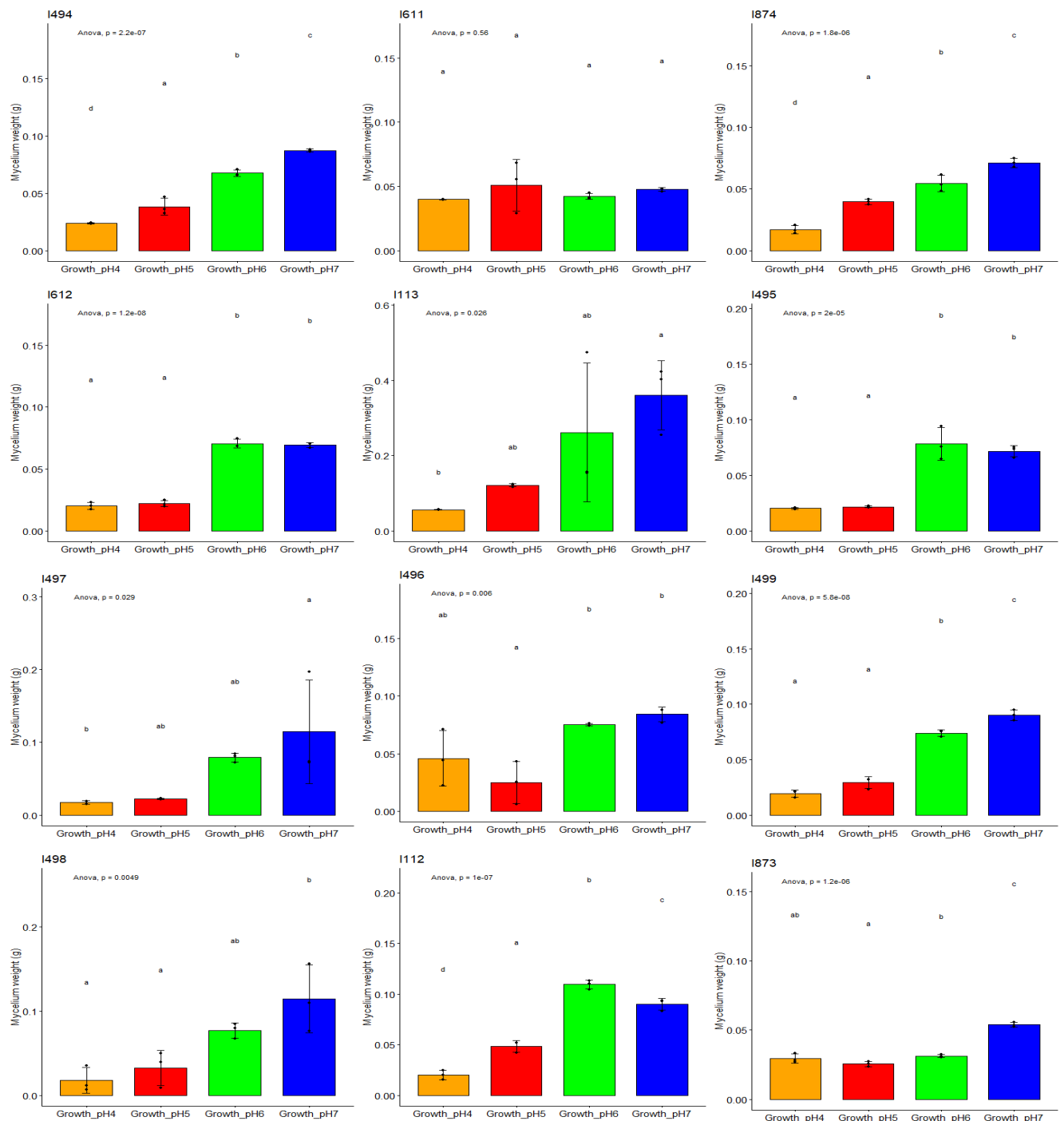


Figure 12. Differences in fungal biomass according to pH conditions (FDM buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH 7) for each of the twelve strains after 11 days of culture. Points (●) represents the biological replicates and vertical axis (|) is error bar. Significant differences between each pH are indicated by letters (Tukey's Post Hoc Test, $\alpha = 0.05$).

The amounts of enniatins produced by the twelve *F. avenaceum* strains in the different pH conditions are shown in Figure 13. It clearly appears that the production levels were not significantly different between pH conditions ($p = 0.11$).

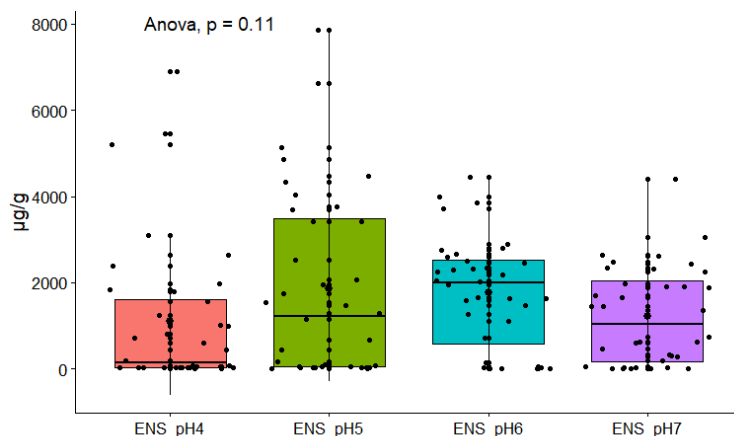


Figure 13. Enniatin amounts (sum of A, A1, B and B1 in $\mu\text{g/g}$) quantified in 11-day-old FDM broths (buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH7) inoculated with the twelve *F. avenaceum* strains. Point (●) represents the average, horizontal axis (—), the median and vertical axis (|) is the whisker. Differences between all pH conditions were determined using Anova.

Besides, *F. avenaceum* strains were shown to have contrasted pH response profiles (Figure 14). For the strains I612, I496 and I498 and the two low producing isolates, I611 and I113, the amounts of yielded enniatins were not significantly different whatever the pH of the culture media. For the strains I495 and I112, the amounts of enniatins quantified in 11-day-old broths were significantly higher for the pH values 4 and 5. Thus, the strain I112 was shown to produce more than 1500 $\mu\text{g/g}$ of enniatins at pH 4 and less than 100 $\mu\text{g/g}$ at pH 5, 6 and 7. Conversely, for the strain I497 and to a less extend for the strains I873 and I874, the FDM media buffered at pH 6 and/or pH 7 were shown to be the best conditions to promote the production of enniatins. We have also analysed the forms of enniatins produced by each strain in the different FDM buffered media and observed that the pH conditions did not significantly modify the profiles observed in the unbuffered FDM medium (data not shown).

Overall, results of this pH experiment indicate that all the tested strains of *F. avenaceum* can grow and produce enniatins regardless of the considered pH of the FDM medium, in the range 4-7. Our data have also highlighted that the pH conditions required for a maximal production of enniatins were highly variable between strains. To our knowledge, our study is the first one describing the effect of ambient pH on the production of enniatins by *F. avenaceum*. A study focusing on the production of enniatins by *F. sambucinum* (Audhya and Russell, 1974) has suggested that the synthesis of these mycotoxins could be favoured at alkaline pH conditions.

Our results are consistent with literature data that have evidenced the ability of strains of various fungal species (*Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*) not only to grow, but also to produce mycotoxins over a wide pH range (Esteban et al., 2006; Zong et al., 2015). The present results are however quite different to what has been previously described for *F. graminearum* and the production of type B trichothecenes (Merhej et al., 2010). Those authors have shown that the production of deoxynivalenol was abrogated in culture media buffered at pH 6.5.

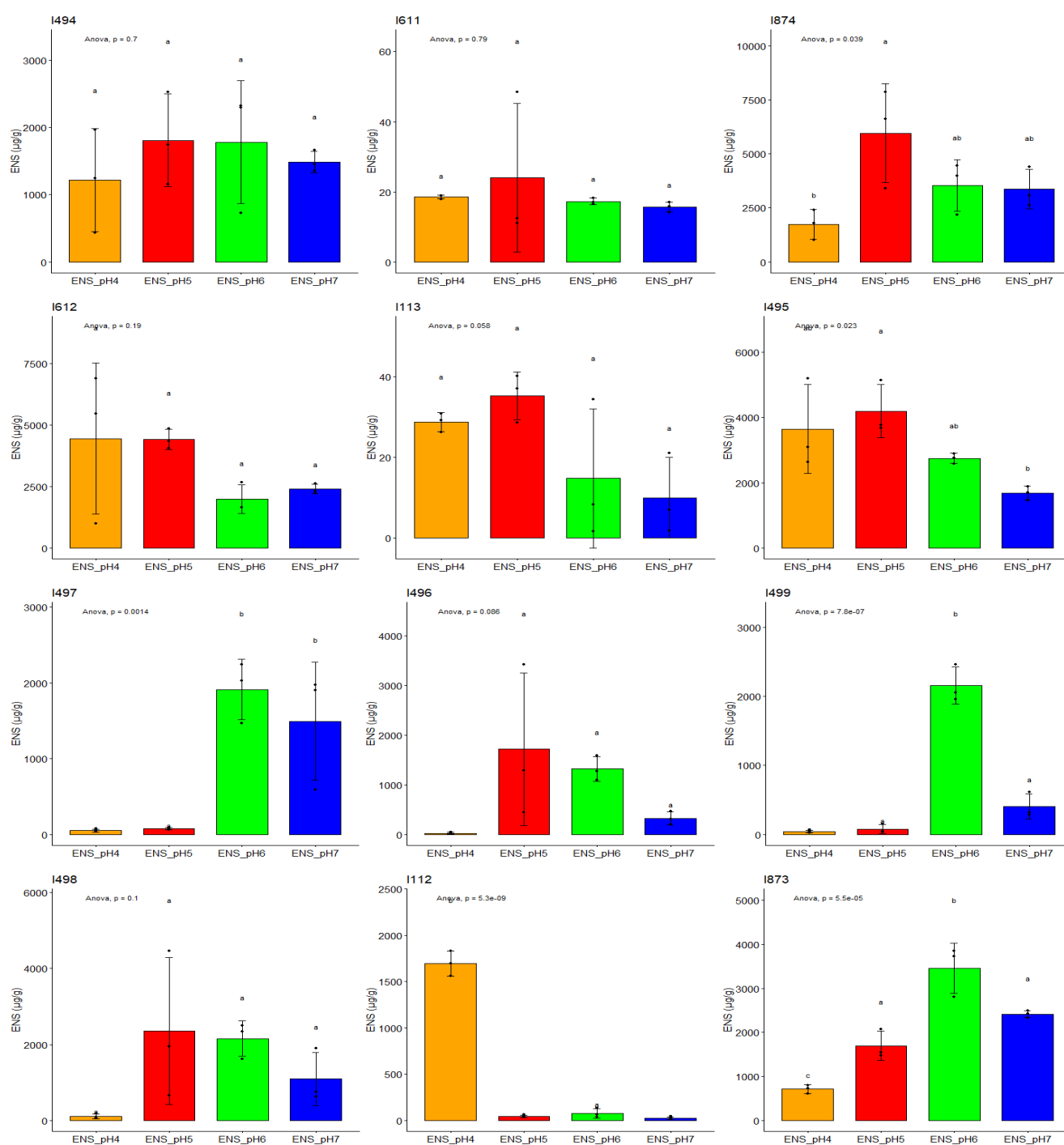


Figure 14. Differences in enniatins amounts (sum of A, A1, B and B1 in µg/g) according to pH conditions (FDM buffered at pH 4, pH 5, pH 6 and pH 7) for each of the twelve strains after 11 days of culture. Points (●) represents the biological replicates and vertical axis (|) is error bar. Significant differences between each pH are indicated by letters (Tukey's Post Hoc Test, $\alpha = 0.05$).

III.6. High diversity between strains of the same species

Using the phenotypic variables discussed above, a multivariate analysis was performed to assess their ability to discriminate the twelve strains of our panel. The two Principal Component (PC) of the resulting PCA explain 52.88% of the total variation and PC1 accounts for more than 36% of the variation.

The scatter plot reported in Figure 15 shows the projection of the panel of strains. It highlights the high clustering of each biological replicate for each strain studied. Each strain is also found clearly individualized. The majority of the individuals gather in the centre of the scatter plot while strains I112 and I113 can be distinguished from this pool. These two strains discriminate from the group gathering the ten other strains (close to the origin), which for their part, have common characteristics.

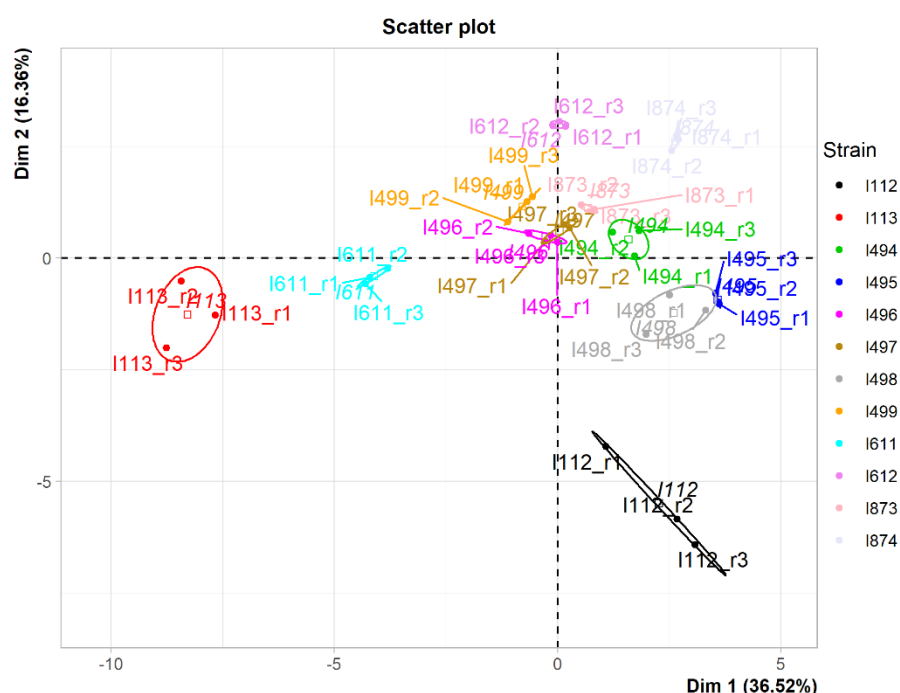


Figure 15. Score Plot of principal component 1 (Dim 1) and 2 (Dim 2) based on variables issued from the studies of colour and growth of mycelium, effect of pH and temperature on biomass and toxin production for the twelve different strains of *F. avenaceum*. Point (●) represents the biological replicates of each strain.

The associated loadings plot, reported in Figure 16, shows the contribution of each variable to the PC and highlights the most discriminating variables between strains. Therefore, the observed differences between the strain I113 and the other ones may be related to its ability to grow efficiently at any pH and to produce weak levels of enniatins. Regarding strain I112, its position on the PCA may be explained by its greater growth at 30°C and by the high RGB values characterizing its mycelium when cultivated on solid CM plates.

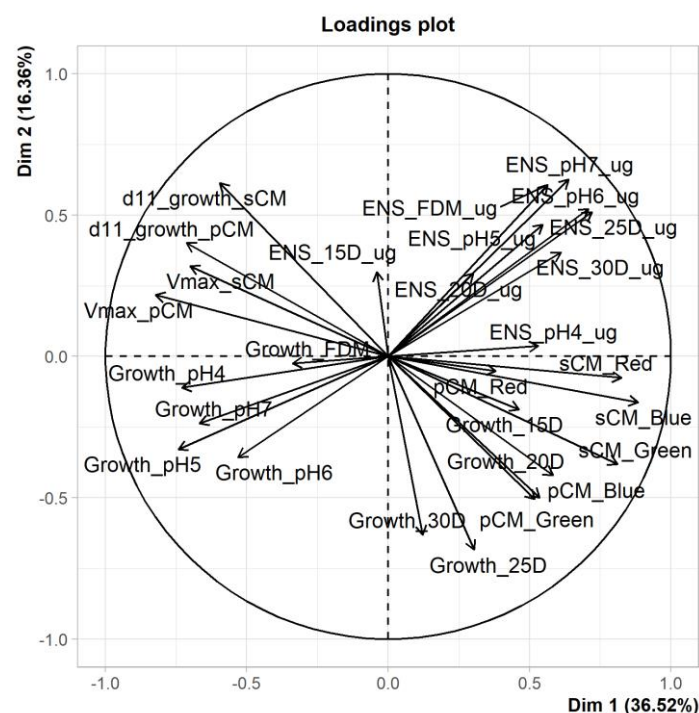


Figure 16. Loadings plot of principal component (PC) one and two of the principal component analysis (PCA).

In addition, the PCA representation indicates that the mycelium development at different pH and the enniatins production seem to be negatively correlated. This observation is in accordance with the conclusions of Stępień et al., 2011; Gálvez et al., 2017 who observed that the *F. proliferatum* growth rate did not correlate with the production of mycotoxins (fumonisins, beauvericin and moniliformin). More generally, this observation is in accordance with the widely documented idea that the production of mycotoxins plays a key role in the fungal adaptive response to stresses (Ponts, 2015) and that the conditions conducive to fungal growth are frequently not the most favourable conditions for the production of mycotoxins.

IV. Conclusion

In the present study, we reported an intraspecific phenotypic diversity for numerous traits related to growth and enniatins production together with contrasted behaviours according to modifications of environmental parameters (temperature, pH) within a panel of twelve *F. avenaceum* strains.

Despite that our sampling is not fully representative of the species our data suggest that *F. avenaceum* shows a high variability as regards the capacity of isolates to develop and produce toxins *in vitro*, in different culture media and under different abiotic stress conditions.

Furthermore, while our results have evidenced that the growth and enniatins production was possible under a wide range of conditions, they have also shown strain differences in their preference for temperature and pH conditions. Altogether, the obtained data are in accordance with the widespread distribution of *F. avenaceum* such as the widespread occurrence of enniatins. To go further and confirm these first insights, the panel of studied strains needs to be enlarged such as the number of considered culture conditions. Indeed, only twelve strains isolated mainly from wheat (two from maize) cultivated in a same climate area (with the exception of two strains from Canada) were considered in the present study. According to the wide range of plant hosts associated with *F. avenaceum* (Gautier et al., 2020), it would be necessary to include strains isolated from vegetables and to complete our study by investigating the impact of the substrate composition and/or additional abiotic stresses (a_w , CO_2).

The origin of the observed phenotypic variation requires also to be further investigated. Is this variation linked to a genetic diversity? Occurrence of a genetic diversity between *F. avenaceum* strains isolated from faba beans or peas has previously been reported by several authors (Feng et al., 2010; Afshari et al., 2019). Regarding *F. avenaceum* associated with cereals, very few data are available. The analysis of variants between two genomes of *F. avenaceum* showed up to 3.2% of polymorphism, suggesting a high level of genomic diversity within the species (Lysøe et al., 2014). To go further, as previously suggested by several teams (Sørensen and Giese, 2013; Lysøe et al., 2014; Villani et al., 2019), a comparative genomic approach using the twelve strains of our panel would be of high interest, in particular regarding the capacity of isolates to produce secondary metabolites and different forms of enniatins.

Lastly, our data that have shown the differences in phenotypes for a given *F. avenaceum* strain when cultivated in different environmental conditions illustrate the phenotypic plasticity of *F. avenaceum*. Phenotypic plasticity is generally acknowledged to increase the survival of an organism under specific conditions. Thus, the former results are another argument that can explain the wide variety of ecological niches in which *F. avenaceum* can survive.

In conclusion, our study that supports the versatile nature of *F. avenaceum* already mentioned by Lysøe et al., 2014 has provided first insights that could partially explain the widespread occurrence of *F. avenaceum* and enniatins. This study should be deepened to investigate how *F. avenaceum* can cope with environmental changes in order to limit its current and future (as a result of climate change) expansion and the contamination of agricultural commodities with enniatins.

V. References

- Afshari, N., Hemmati, R., and Steikh, F. (2019). Characterization of *Fusarium avenaceum* from faba bean (*Vicia faba*) in Iran, genetic diversity, aggressiveness, and cultivar evaluation. *Journal of Plant Pathology* 1–8.
- Audhya, T.K., and Russell, D.W. (1974). Production of Enniatins by *Fusarium sambucinum*: Selection of High-yield Conditions from Liquid Surface Cultures. *Journal of General Microbiology* 82, 181–190.
- Beccari, G., Senatore, M.T., Tini, F., Sulyok, M., and Covarelli, L. (2018). Fungal community, *Fusarium* head blight complex and secondary metabolites associated with malting barley grains harvested in Umbria, central Italy. *International Journal of Food Microbiology* 273, 33–42.
- Bhat, R., Rai, R.V., and Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 57–81.
- Brennan, J.M., Fagan, B., van Maanen, A., Cooke, B.M., and Doohan, F.M. (2003). Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology* 577–587.
- Burmeister, H.R., and Plattner, R.D. (1987). Enniatin Production by *Fusarium tricinctum* and its Effect on Germinating Wheat Seeds. *Phytopathology* 77, 1483.
- Cambaza, E. (2018). Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds. *Foods* 7, 1–15.
- Cambaza, E., Koseki, S., and Kawamura, S. (2018). The Use of Colors as an Alternative to Size in *Fusarium graminearum* Growth Studies. *Foods* 7, 1–9.
- Cambaza, E., Koseki, S., and Kawamura, S. (2019). RGB Imaging as Tool to Analyze the Growth of *Fusarium graminearum* in Infected Oats (*Avena sativa*) and Rice (*Oryza sativa*). *Biology* 1–17.
- Cappellini, R.A., and Peterson, J.L. (1965). Macroconidium Formation in Submerged Cultures by a Non-Sporulating Strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57, 962–966.
- Cormack, M.W. (1951). Variation in the cultural characteristics and pathogenicity of *Fusarium avenaceum* and *F. arthrosporioides*. *Canadian Journal of Botany* 29, 32–45.
- Covarelli, L., Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Meca, G., Juan, C., and Mañes, J. (2015). Biosynthesis of beauvericin and enniatins *in vitro* by wheat *Fusarium* species and natural grain contamination in an area of central Italy. *Food Microbiology* 46, 618–626.
- Dagnac, T., Latorre, A., Fernández Lorenzo, B., and Llompart, M. (2016). Validation and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the assessment of the co-occurrence of mycotoxins in maize silages from dairy farms in NW Spain. *Food Additives & Contaminants* 33, 1850–1863.
- EFSA (2014). Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal* 12, 174.

- Elbelt, S., Siou, D., Gelisse, S., Cruaud, C., Lannou, C., Lebrun, M.H., and Laval, V. (2018). Optimized real time QPCR assays for detection and quantification of *Fusarium* and *Microdochium* species involved in wheat head blight as defined by MIQE guidelines. *Molecular Biology* 1–32.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., and Cabañes, F.J. (2006). Effect of pH on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *Food Additives and Contaminants* 23, 616–622.
- Fanelli, F., Ferracane, R., Ritieni, A., Logrieco, A.F., and Mulè, G. (2014). Transcriptional regulation of enniatins production by *Fusarium avenaceum*. *Journal of Applied Microbiology* 116, 390–399.
- Feng, J., Hwang, R., Chang, K.F., Hwang, S.F., Strelkov, S.E., Gossen, B.D., Conner, R.L., and Turnbull, G.D. (2010). Genetic variation in *Fusarium avenaceum* causing root rot on field pea. *Plant Pathology* 59, 845–852.
- Fredlund, E., Gidlund, A., Sulyok, M., Börjesson, T., Krska, R., Olsen, M., and Lindblad, M. (2013). Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats — Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 167, 276–283.
- Gálvez, L., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Stępień, Ł., and Palmero, D. (2017). *Fusarium proliferatum* – Causal agent of garlic bulb rot in Spain: Genetic variability and mycotoxin production. *Food Microbiology* 67, 41–48.
- Gautier, C., Pinson-Gadais, L., and Richard-Forget, F. (2020). *Fusarium* Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 4788–4798.
- Glenn, A.E. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 137, 213–240.
- Harrow, S.A., Farrokhi-Nejad, R., Pitman, A.R., Scott, I.A.W., Bentley, A., Hide, C., and Cromey, M.G. (2010). Characterisation of New Zealand *Fusarium* populations using a polyphasic approach differentiates the *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* species complex in cereal and grassland systems. *Fungal Biology* 114, 293–311.
- Holtz, M.D., Chang, K.F., Hwang, S.F., Gossen, B.D., and Strelkov, S.E. (2011). Characterization of *Fusarium avenaceum* from lupin in central Alberta: genetic diversity, mating type and aggressiveness. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33, 61–76.
- Hudec, K., and Muchová, D. (2010). Influence of temperature and species origin on *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* pathogenicity to wheat seedlings. *Plant Protection Science* 46, 59–65.
- Jestoi, M. (2008). Emerging *Fusarium*-Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 21–49.
- Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., and Jestoi, M. (2010). Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 143, 17–25.

- Kulik, T., Pszczółkowska, A., and Lojko, M. (2011). Multilocus Phylogenetics Show High Intraspecific Variability within *Fusarium avenaceum*. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 5626–5640.
- Leach, J., Lang, B.R., and Yoder, O.C. (1982). Methods for Selection of Mutants and *In Vitro* Culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *Microbiology* 128, 1719–1729.
- Lee, H.-S., Kang, J.-W., Kim, B.H., Park, S.-G., and Lee, C. (2011). Statistical optimization of culture conditions for the production of enniatins H, I, and MK1688 by *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111, 279–285.
- Leslie, J.F., and Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Valle-Algarra, F.M., and Jiménez, M. (2004). Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology* 94, 43–54.
- Lysøe, E., Harris, L.J., Walkowiak, S., Subramaniam, R., Divon, H.H., Riiser, E.S., Llorens, C., Gabaldón, T., Kistler, H.C., Jonkers, W., et al. (2014). The Genome of the Generalist Plant Pathogen *Fusarium avenaceum* Is Enriched with Genes Involved in Redox, Signaling and Secondary Metabolism. *Plos One* 9, 1–17.
- Malz, S., Grell, M.N., Thrane, C., Maier, F.J., Rosager, P., Felk, A., Albertsen, K.S., Salomon, S., Bohn, L., Schäfer, W., et al. (2005). Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 42, 420–433.
- McIlvaine, T.C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal Biological Chemistry* 49, 183–186.
- Merhej, J., Boutigny, A.-L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2010). An Acidic pH is a determinant factor for TRI genes expression and trichothecenes B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives and Contaminants* 27, 710–717.
- Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., et al. (2009). Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009–1021.
- Nalim, F.A., Elmer, W.H., McGovern, R.J., and Geiser, D.M. (2009). Multilocus Phylogenetic Diversity of *Fusarium avenaceum* Pathogenic on *Lisianthus*. *Phytopathology* 99, 462–468.
- Nazari, L., Patteri, E., Terzi, V., Morcia, C., and Rossi, V. (2014). Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat. *Food Microbiology* 39, 19–26.
- O'Donnell, K., Rooney, A.P., Proctor, R.H., Brown, D.W., McCormick, S.P., Ward, T.J., Frandsen, R.J.N., Lysøe, E., Rehner, S.A., Aoki, T., et al. (2013). Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important Fusaria. *Fungal Genetics and Biology* 52, 20–31.
- Orlando, B., Grignon, G., Vitry, C., Kashefifard, K., and Valade, R. (2019). *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Research* 35, 369–380.

- Pettitt, T.R., and Parry, D.W. (1996). Effect of climate change on *Fusarium* foot rot of winter wheat in the United Kingdom. Frankland JC, Mangan N and Gadd GM (Eds) Fungal and Environmental Change, Cambridge University Press 21–31.
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Piraux, F., Caron, D., Lannou, C., and Richard-Forget, F. (2011). The Dent Stage of Maize Kernels Is the Most Conducive for Fumonisin Biosynthesis under Field Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 8382–8390.
- Pieper, R., Kleinkauf, H., and Zocher, R. (1992). Enniatin synthetases from different fusaria exhibiting distinct amino acid specificities. *The Journal of Antibiotics* 45, 1273–1277.
- Ponts, N., Gautier, C., Gouzy, J., Pinson-Gadais, L., Foulongne-Oriol, M., Ducos, C., Richard-Forget, F., Savoie, J.-M., Zhao, C., and Barroso, G. (2020). Evolution of *Fusarium tricinctum* and *Fusarium avenaceum* mitochondrial genomes is driven by mobility of introns and of a new type of palindromic microsatellite repeats. *BMC Genomics* 21, 358.
- Prosperini, A., Berrada, H., Ruiz, M.J., Caloni, F., Coccini, T., Spicer, L.J., Perego, M.C., and Lafranconi, A. (2017). A Review of the Mycotoxin Enniatin B. *Frontiers in Public Health* 5, 1–11.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N., and Geisen, R. (2008). Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. *FEMS Microbiology Letters* 284, 142–149.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675.
- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E., and Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their *in vitro* Combined Toxicological Effects. *Toxins* 8, 36.
- Sørensen, J., and Giese, H. (2013). Influence of Carbohydrates on Secondary Metabolism in *Fusarium avenaceum*. *Toxins* 5, 1655–1663.
- Stępień, L., and Waśkiewicz, A. (2013). Sequence Divergence of the Enniatin Synthase Gene in Relation to Production of Beauvericin and Enniatins in *Fusarium* Species. *Toxins* 5, 537–555.
- Stępień, L., Koczyk, G., and Waśkiewicz, A. (2011). Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics* 52, 487–496.
- Süssmuth, R., Müller, J., von Döhren, H., and Molnár, I. (2011). Fungal cyclooligomerdepsipeptides: From classical biochemistry to combinatorial biosynthesis. *Natural Product Reports* 28, 99–124.
- Svingen, T., Lund Hansen, N., Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Jensen, U., and Have Rasmussen, P. (2017). Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high hepatotoxicity on a high-content imaging platform. *Environmental Toxicology* 32, 1658–1664.
- Sy-Cordero, A.A., Pearce, C.J., and Oberlies, N.H. (2012). Revisiting the enniatins: a review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. *The Journal of Antibiotics* 65, 541–549.

- Torp, M., and Nirenberg, H.I. (2004). *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology* 95, 247–256.
- Turner, A.S., Lees, A.K., Rezanoor, H.N., and Nicholson, P. (1998). Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology* 47, 278–288.
- Uhlig, S., Torp, M., and Heier, B.T. (2006). Beauvericin and enniatins A, A1, B and B1 in Norwegian grain: a survey. *Food Chemistry* 94, 193–201.
- Villani, A., Proctor, R.H., Kim, H.-S., Brown, D.W., Logrieco, A.F., Amatulli, M.T., Moretti, A., and Susca, A. (2019). Variation in secondary metabolite production potential in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex revealed by comparative analysis of 13 genomes. *BMC Genomics* 20, 1–22.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Bulat, S.A., Alekhina, I.A., and Nirenberg, H.I. (2002). Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex – a polyphasic approach. *Mycological Research* 106, 655–669.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Konstantinova, P., and Gagkaeva, T.Y. (2004). Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and north-western Russia. *European Journal of Plant Pathology* 110, 573–585.
- Yli-Mattila, T., Hussien, T., Gavrilova, O., and Gagkaeva, T. (2018). Morphological and Molecular Variation Between *Fusarium avenaceum*, *Fusarium arthrosporioides* and *Fusarium anguioides* Strains. *Pathogens* 7, 1–15.
- Zong, Y., Li, B., and Tian, S. (2015). Effects of carbon, nitrogen and ambient pH on patulin production and related gene expression in *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 206, 102–108.

Chapitre 2

Chapitre 2 : Rôle du facteur de régulation Pac1 dans la modulation de la production d'enniatiines par le pH ambiant chez *F. avenaceum*

L'impact des facteurs abiotiques et en particulier du pH sur la production de mycotoxines et l'expression des gènes de biosynthèse associés a fait l'objet de nombreuses études (Espeso et al., 1993; Keller et al., 1997; Flaherty et al., 2003). Ces études se sont principalement concentrées sur les mycotoxines majeures (ochratoxines, aflatoxines, fumonisines, déoxynivalénol) et à notre connaissance n'ont pas considéré les mycotoxines dites émergentes comme les enniatiines. Pour exemple, il a été montré que la production de trichothécènes et l'expression des gènes *Tri* chez *F. graminearum* sont induites à pH acide (Merhej et al., 2010). Les auteurs précédents ont de plus suggéré que l'expression des gènes *Tri* est sous le contrôle d'un facteur de transcription, nommé FgPac1, orthologue du facteur de transcription PacC identifié par Peñalva and Arst, 2002 chez *A. nidulans* comme acteur majeur de la réponse aux changements de pH. Ces travaux ainsi que ceux portant sur d'autres familles de mycotoxines sont présentés dans le paragraphe II.1 (Homéostasie du pH, facteur de transcription PacC et production de mycotoxines) de la partie introductive de ce manuscrit de doctorat.

Nos résultats présentés dans le Chapitre 1 ont montré que le pH ambiant est un élément important de modulation de la biosynthèse d'enniatiines, soulevant la question des mécanismes moléculaires impliqués. Au cours des travaux présentés dans ce Chapitre 2, nous avons testé l'hypothèse qu'il existe un facteur de régulation orthologue de PacC chez *F. avenaceum* dont l'expression module la production d'enniatiines.

I. Résultats

I.1. pH et production d'enniatines par *F. avenaceum* : résultats marquants (« Préambule », Chapitre 1)

Dans la partie « Préambule », nous avons suivi l'évolution du pH et la cinétique d'accumulation d'enniatines au cours du développement de la souche I612 de *F. avenaceum* en milieu liquide FDM. Nous avons mis en évidence que le développement fongique s'accompagne d'une alcalinisation du milieu : pH 4 à J₀ vs. pH 8 à J₁₀.

Dans le Chapitre 1, l'analyse des effets du pH (entre 4 et 7) sur le développement mycélien et la production d'enniatines d'un panel de 12 souches *F. avenaceum* a montré que :

- Les milieux neutres (pH 6-7) sont les plus favorables au développement de *F. avenaceum* ;
- Pour tous les isolats considérés, une production d'enniatines est possible quel que soit le pH, entre 4 et 7 ;
- La valeur de pH conduisant à une production maximale d'enniatines est différente selon les souches, ce qui nous a conduit à identifier trois groupes de souches caractérisés par trois types de profils de réponse au pH : (1) une production d'enniatines équivalente pour tous les pH testés, (2) une production d'enniatines réduite dans les milieux FDM tamponnés à des pH proches de la neutralité (6 ou 7), (3) une production d'enniatines réduite dans les milieux tamponnés à des « pH acide » (4 ou 5).

Pour tenter de décrypter les mécanismes sous-jacents de modulation de la production d'enniatines par le pH, nous avons choisi parmi notre panel une souche « représentante » pour chacun des profils énoncés précédemment à savoir la souche I494 pour le profil (1), la souche I612 pour le profil (2) et la souche I497 pour le profil (3). La souche I874 dont le génome est séquencé (FaLH03 dans Lysøe et al., 2014 a également été retenue. Les profils de production de ces quatre souches en fonction des conditions de pH sont présentés sur la Figure 1. Ces quatre souches modèles seront utilisées tout au long de ce Chapitre 2.

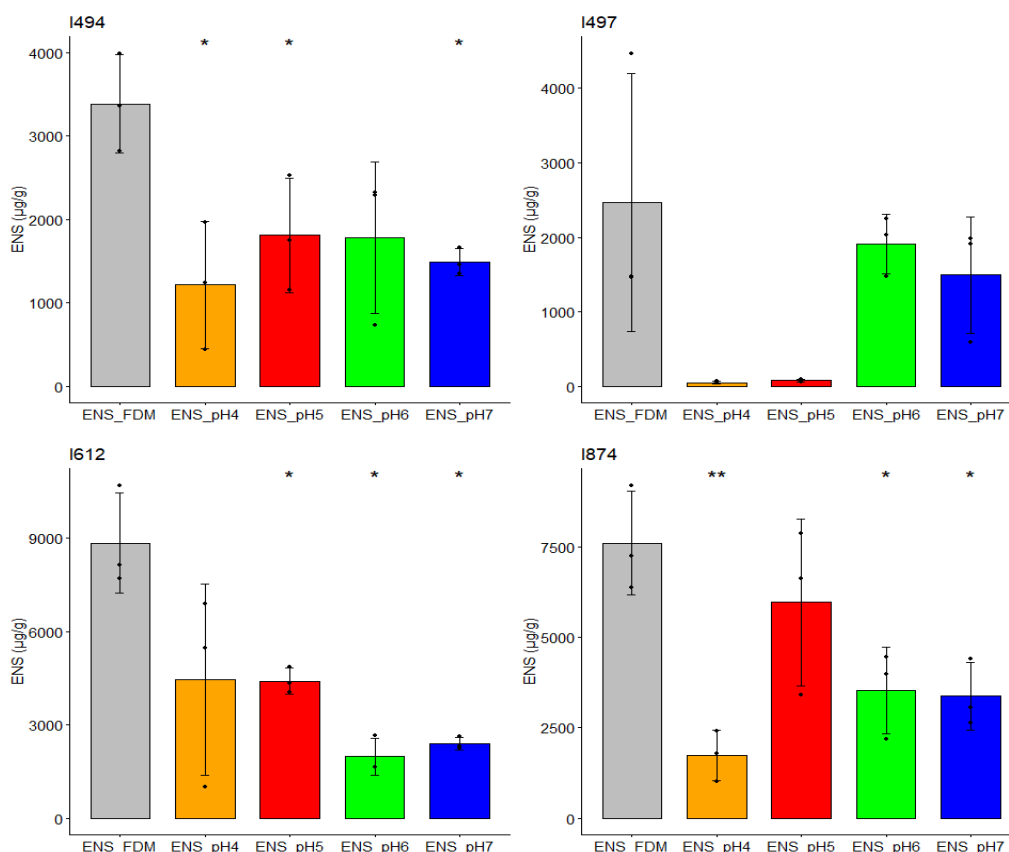


Figure 1. Effet du pH (en milieu FDM ou FDM tamponné à pH 4, pH 5, pH 6 et pH 7) sur la production d'enniatines (somme des enniatines A, A1, B et B1 en µg/g de biomasse sèche) par quatre souches de *F. avenaceum* (I494, I497, I612 et I874) après 11 jours de culture. Les étoiles * indiquent que le Test de Student est significatif (* p-value < 0,05, ** p-value < 0,01) par rapport au milieu FDM.

I.2. Identification et caractérisation d'un orthologue putatif de *FgPac1* chez *F. avenaceum*

A partir du protéome de référence Fa05001 de *F. avenaceum*, nous avons cherché une séquence homologue de Pac1 et trouvé un orthologue putatif (accession GenBank n°KIL88987) avec 88% d'identité. Nous l'appellerons FavPac1 pour la suite de notre étude. Un alignement protéique multiple a été réalisé et est présenté en Figure 2. La protéine FavPac1 partage 43%, 48%, 86% et 88% d'identité de séquence en acides aminés avec la protéine PacC/Pac1 d'*A. nidulans*, *N. crassa*, *F. oxysporum* et *F. graminearum* respectivement. Les séquences protéiques de Pac1 de *F. graminearum* et de *F. avenaceum* présentent la plus forte homologie de séquence par rapport aux autres espèces. Cette protéine est constituée de 635 acides aminés et contient trois domaines en doigt de zinc de type C₂H₂ hautement conservés (position 66-86, 99-121 et 129-149) dans la région N-terminale. Pac1 de *F. avenaceum* contient également trois régions hautement conservées que sont les domaines A, B, C et la boîte protéase de signalisation. Toutefois ces régions sont moins bien conservées en N-terminal tandis que les doigts de zinc partagent quant à eux une plus grande identité entre les différentes espèces.

Le gène qui code FavPac1 a une taille de 2020 pb et possède trois exons et deux introns (Scaffold 12 (-) join (136516...137982, 138042...138245, 138299...138535)). Un orthologue putatif de *Pac1* existe donc chez *F. avenaceum* ; son rôle dans la production d'enniatiines et dans la régulation de l'expression des gènes *esyn1* et *kivr* a été étudié.

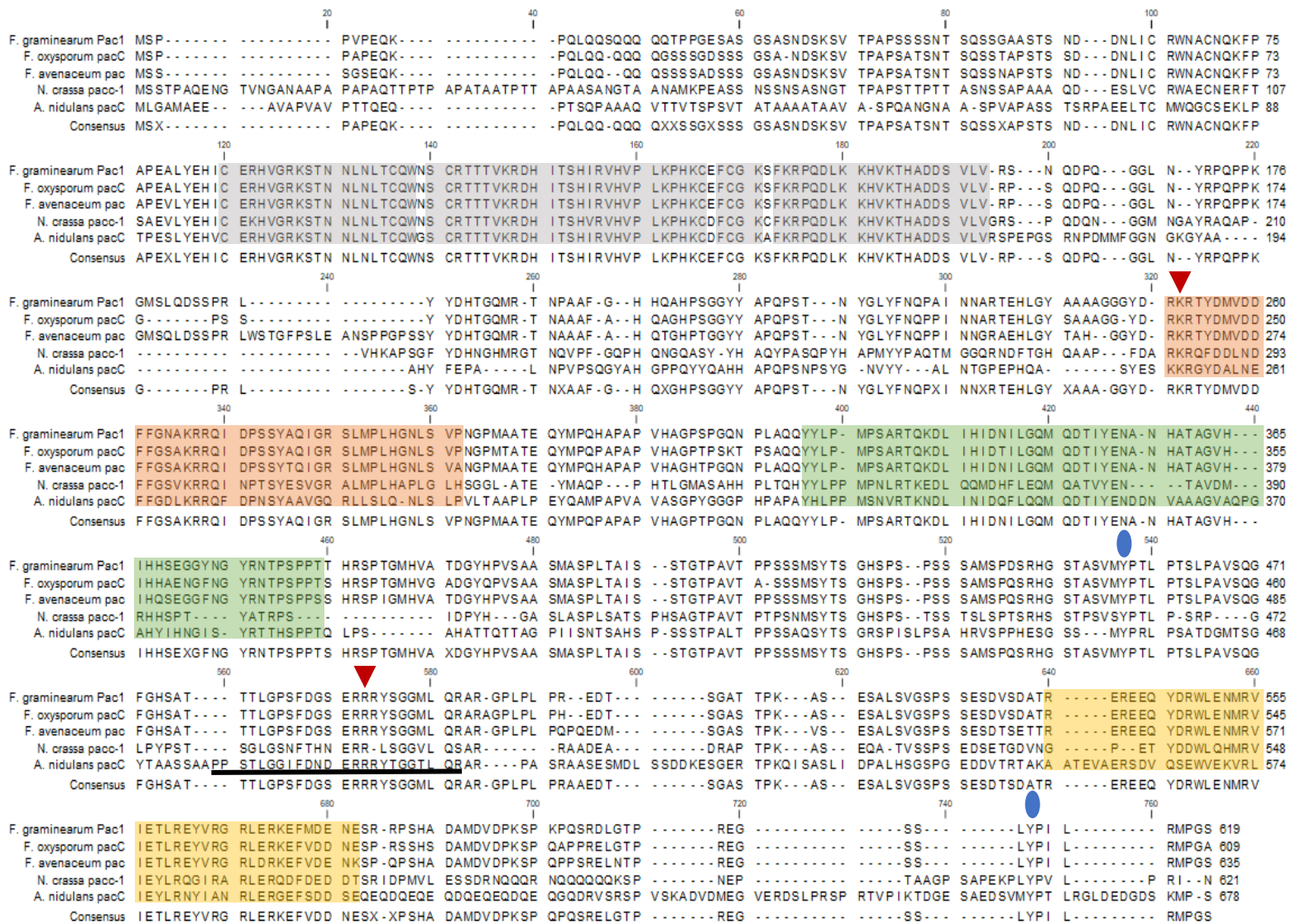


Figure 2. Alignement de séquences protéiques multiple de FavPac1 avec d'autres séquences homologues de PacC caractérisées. Les séquences traduites des gènes *Pac1* de *F. graminearum* (HM745929), *pacC* de *F. oxysporum* (AY125958), *Pac1* de *F. avenaceum* (KIL88987), *pacc-1* de *N. crassa* (Q7RVQ8) et *pacC* d'*A. nidulans* (Z47081) sont présentées. L'alignement a été généré avec le logiciel CLC Sequence Viewer 8. Les régions grisées correspondent aux domaines en doigts de zinc conservés. Les trois régions d'interaction sont colorées respectivement en orange pour la région A, en vert pour la région B et en jaune pour la région C (voir l'Introduction). La boîte de reconnaissance par la protéase de signalisation est soulignée. Les deux sites de clivage (maturation protéolytique) sont représentés par un triangle rouge et les deux sites de fixation de PalA avec un ovale bleu.

I.3. Construction de mutants délétés pour le gène *FavPac1*

Des mutants *knock-out* (KO) *FavΔPac1*, ont été construits pour chacune des quatre souches de *F. avenaceum* précédemment présentées, i.e., I494, I497, I612 et I874. Chez ces mutants, la séquence codante du gène *Pac1* est remplacée par une cassette de résistance à l'hygromycine (notée HYGRO^R) utilisée comme marqueur de sélection (Figure 3A). Après deux cycles d'isolement monosporal des transformants obtenus, l'intégration de la cassette de résistance à l'hygromycine au locus *FavPac1* dans ces derniers a été vérifiée par amplification PCR des jonctions créées ainsi que l'absence d'amplification de la séquence codante de *FavPac1* (Figure 3B). La perte de la séquence codante de *FavPac1* (Figure 3C) ainsi que l'absence d'intégration ectopique de la cassette de résistance à l'hygromycine ont été validées par re-séquençage des génomes entiers.

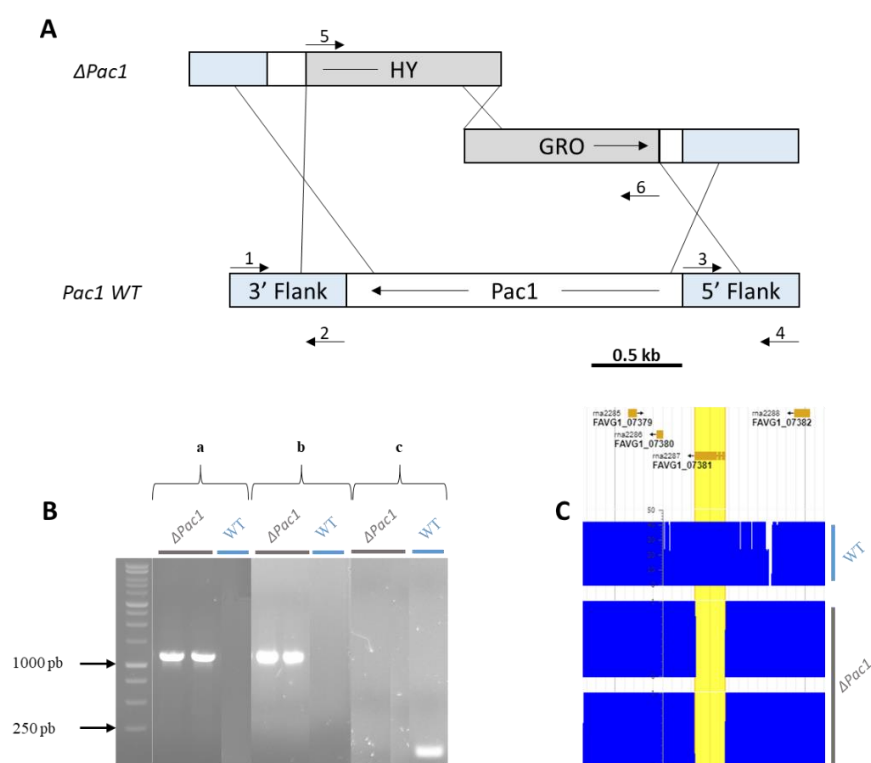


Figure 3. Construction et validation des mutants *FavΔPac1*. A) Les mutants KO *FavΔPac1* contiennent en remplacement du gène *Pac1*, une cassette de résistance à l'hygromycine (HYGRO^R) intégrée au locus par recombinaison homologue. Les amorces utilisées pour réaliser la construction de ces mutants par fusion de trois fragments PCR sont représentées par des flèches numérotées. B) Stratégie PCR pour valider la délétion du gène *Pac1* chez les transformants de *F. avenaceum* : a) PCR réalisée avec la paire d'amorces 7/11 ; un fragment de 1148 pb indique l'intégration de la cassette de résistance côté 5'. b) PCR réalisée avec la paire d'amorces 12/10 ; un fragment de 1030 pb indique l'intégration de la cassette de résistance côté 3'. c) PCR réalisée avec la paire d'amorces 13/14 ; un fragment de 123 pb indique la présence de *Pac1* chez le WT mais absent chez *FavΔPac1*. C) Visualisation de l'absence de *Pac1* chez les mutants mais présent chez le WT suite à un séquençage à haut débit (Illumina® - Banque NGS). L'alignement a été généré avec le logiciel JBrowse par rapport à la souche de référence Fa05001 portant le gène *Pac1* (FAVG1_07381).

Parmi les vingt-six transformants sélectionnés (toutes souches confondues) résistants à l'hygromycine, seize contenaient la cassette HYGRO^R intégrée uniquement au locus. Le détail des transformants et mutants KO obtenus pour chaque fond génétique est présenté dans le Tableau 1. Nous avons conservé deux mutants *FavΔPac1* pour chaque fond génétique pour la suite de notre étude.

Tableau 1. Nombre de transformants obtenus puis validés par PCR et séquençage comme étant des mutants KO.

	I494	I497	I612	I874
Transformants obtenus	10	3	3	10
Validation par PCR/Séquençage	6	3	2	5

I.4. Impact de la délétion de *FavPac1* sur la capacité de *F. avenaceum* à produire des spores

La capacité de sporulation a été étudiée chez les souches sauvages (WT) et les mutants KO, après quatre jours de culture en milieu CMC. Les résultats reportés sur la Figure 4 indiquent une production de spores chez toutes les souches sauvages et mutantes. Cette production varie d'une souche sauvage à l'autre, avec une gamme de concentration comprise entre $1,28.10^4$ - $3,45. 10^6$ spores/mL. La souche I874 WT est la plus productrice de spores, la souche I494 WT est la moins productrice. Pour deux des quatre fonds génétiques, la délétion de *FavPac1* a conduit à une réduction significative de la capacité de sporulation (I497 et I874). L'ampleur de cette réduction est différente et significative pour les *I497ΔPac1* et *I874ΔPac1*. Par exemple, *I497Δ1* et *I497Δ2* ont perdu respectivement 42% et 75% de leur capacité de sporulation comparée à I497 WT. Cependant, cette délétion n'a pas eu d'effet sur les fonds génétiques I494 et I612. Il est important de noter que toutes les spores avaient la même forme ; il n'y avait pas de différence entre les souches sauvages et délétées. Ces résultats indiquent que la délétion de *Pac1* peut affecter la sporulation.

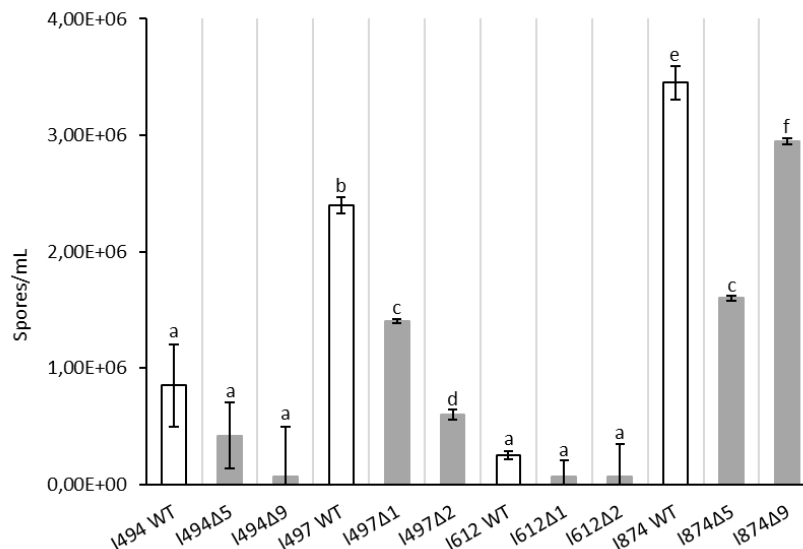


Figure 4. Comparaison de la sporulation moyenne entre WT et $\Delta Pac1$. Pour chaque échantillon, des implants ont été incubés pendant 4 jours à 25°C sous agitation et à l'obscurité pour induire la sporulation en milieu liquide CMC. Les spores sont dénombrées au microscope à l'aide d'une cellule de Thoma (trois comptages successifs/souche). Les résultats ont été comparés à l'aide d'un test ANOVA ($p < 0,05$) suivi d'un test Tukey ($p < 0,05$). Les barres d'erreur représentent l'écart-type des trois répétitions biologiques moyennées.

1.5. Impact de la délétion de *FavPac1* sur la réponse au stress chez *F. avenaceum*

Pour analyser le rôle de *FavPac1* dans la réponse à différents stress abiotiques, les souches sauvages et les mutants KO associés ont été cultivés en présence de NaCl et sorbitol (stress osmotique), de H₂O₂ et cadmium (stress oxydant). La Figure 5 rassemble l'ensemble des photographies prises après 11 jours de culture.

Dans le milieu solide complet (CM), les souches sauvages ont totalement envahi les boîtes. La délétion de *FavPac1* chez les souches mutantes n'a pas (ou très faiblement, par exemple pour I874) affecté leur croissance ; des différences dans l'apparence du mycélium sont cependant observées. Pour tous les isolats testés, la supplémentation en H₂O₂ 15 mM montre une totale absence de développement due à un retard de croissance ou de germination. Pour les milieux CM additionnés avec du NaCl 1 M, du sorbitol 1 M, ou du chlorure de cadmium 150 μM, des différences de phénotype ont pu être observées entre souches sauvages et les mutants KO (Figure 5). L'effet le plus marqué est observé avec le NaCl : l'ensemble des souches mutantes a montré une sensibilité accrue comparée à celle des souches sauvages. Avec la supplémentation en sorbitol (1 M), la croissance des souches sauvages n'a pas semblé être affectée et seuls les mutants *I494Δ5* et *I494Δ9* ont montré une croissance réduite. Au-delà de la croissance, l'aspect du mycélium était également différent entre les sauvages et les mutants, le mycélium des *FavΔPac1* était « mousseux ».

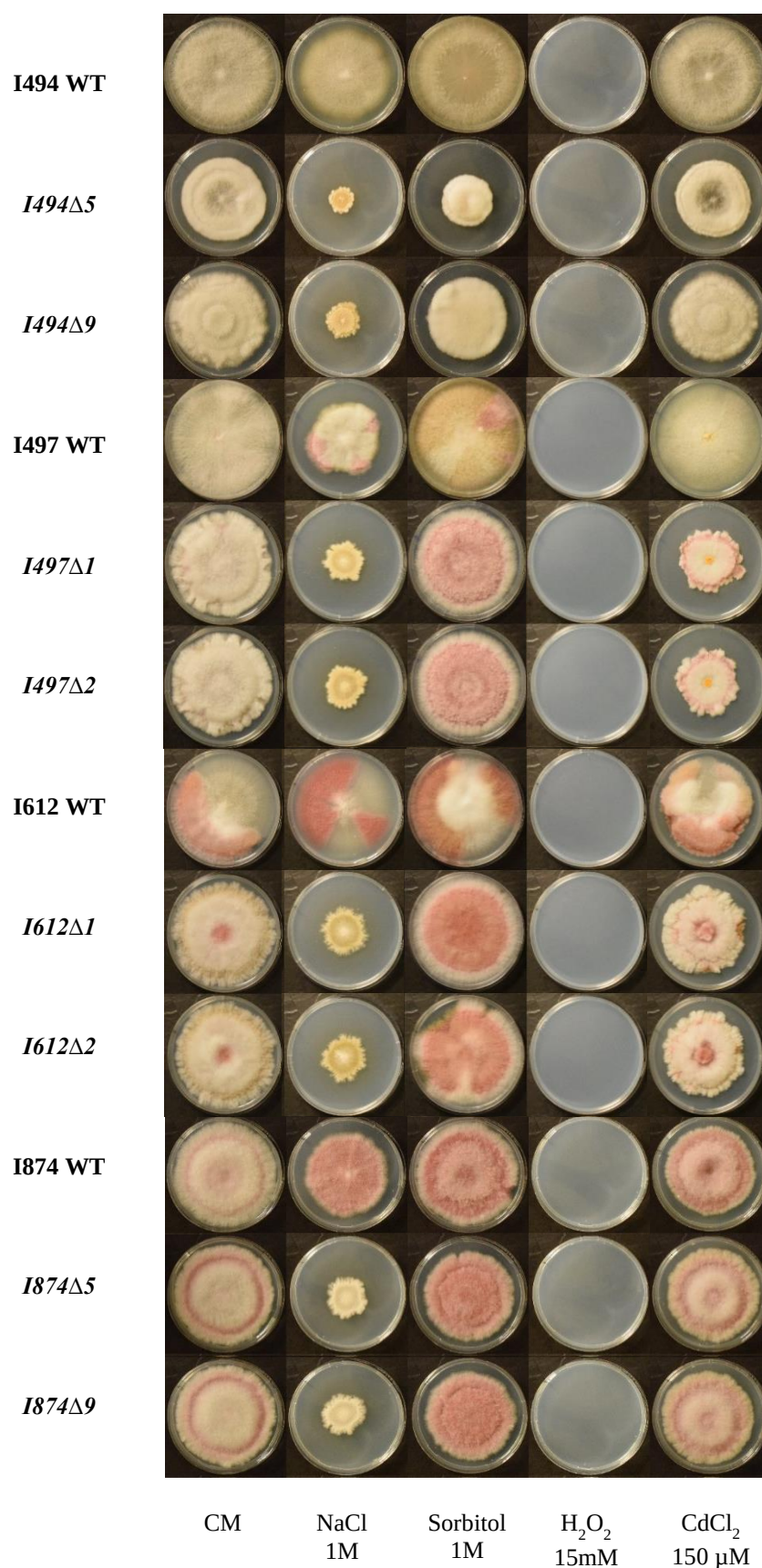


Figure 5. Etude de la croissance radiale des souches sauvages et des mutants de *F. avenaceum*. Les spores (10^4 /mL) des souches sauvages de *F. avenaceum* et leur $\Delta FavPac1$ respectifs ont été inoculées pendant 11 jours sous l'effet d'un stress oxydatif avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 15 mM) ou du chlorure de cadmium ($CdCl_2$, 150 μ M) et d'un stress osmotique avec du sorbitol (1M) ou du chlorure de sodium ($NaCl$, 15 mM).

La présence de cadmium dans le milieu a affecté visiblement le développement des souches sauvages I612 et I874 et a limité la croissance des isolats délétés pour *FavPac1* pour les fonds génétiques I494, I497 et I612. Ces observations suggèrent que *FavPac1* joue un rôle dans les mécanismes de réponse à des stress abiotiques chez *F. avenaceum*. Ce rôle serait particulièrement important dans le cas d'un stress salin NaCl et dépendant du fond génétique pour un stress osmotique sorbitol ou oxydant de type CdCl₂. Il est intéressant de noter que la délétion de *FavPac1* a affecté la sensibilité des souches mutantes I494 (souche pour laquelle les conditions de pH entre 4 et 7 ne modulent pas significativement la production d'enniatines) pour tous les stress testés, notamment avec le sorbitol.

I.6. La délétion de *FavPac1* affecte la réponse de *F. avenaceum* au pH ambiant en termes de croissance et de production d'enniatines

Afin de déterminer si *FavPac1* est impliqué dans la modulation de la croissance et de la production d'enniatines par le pH ambiant, les souches sauvages ainsi que les souches *FavΔPac1* ont été cultivées pendant 12 jours dans différentes conditions de pH (Figure 6). Trois milieux ont été testés : le milieu FDM (avec évolution du pH, *i.e.*, de pH 4 à J0 à pH 8 à J12), le milieu FDM tamponné à pH 4 et le milieu FDM tamponné à pH 7. Dans les cultures en milieu FDM non tamponné et en FDM tamponné à pH 7, l'évolution du pH a été suivie et s'est révélée identique entre les souches et leurs mutants (données non présentées). Chez les sauvages, le pH du milieu FDM pH 4 est constant jusqu'en fin de culture alors qu'un pH de 6-7 est mesuré chez les *FavΔPac1*.

En ce qui concerne l'accumulation de biomasse (Figure 6A), les résultats obtenus en milieu FDM non tamponné sont variables. Les souches sauvages I494, I612 et I497 se développent de façon équivalente par rapport à certains de leurs mutants respectifs (*I494Δ5*, *I497ΔPac1* et *I612Δ1*) *a contrario* du fond génétique I874 où c'est la souche sauvage qui se développe moins bien que ses mutants *I874ΔPac1*. De plus, l'absence du gène *FavPac1* chez les mutants *I494Δ9* et *I612Δ2* conduit à une diminution de la biomasse par rapport à celle du sauvage. Il apparaît que pour les conditions en milieu FDM tamponné à pH 4, la croissance des différentes souches mutantes est augmentée significativement comparée à celle des souches sauvages et ceci pour les quatre fonds génétiques testés. Néanmoins il faut rappeler qu'un changement de pH est survenu chez les mutants *FavΔPac1*, ce qui peut expliquer ces différences de biomasse.

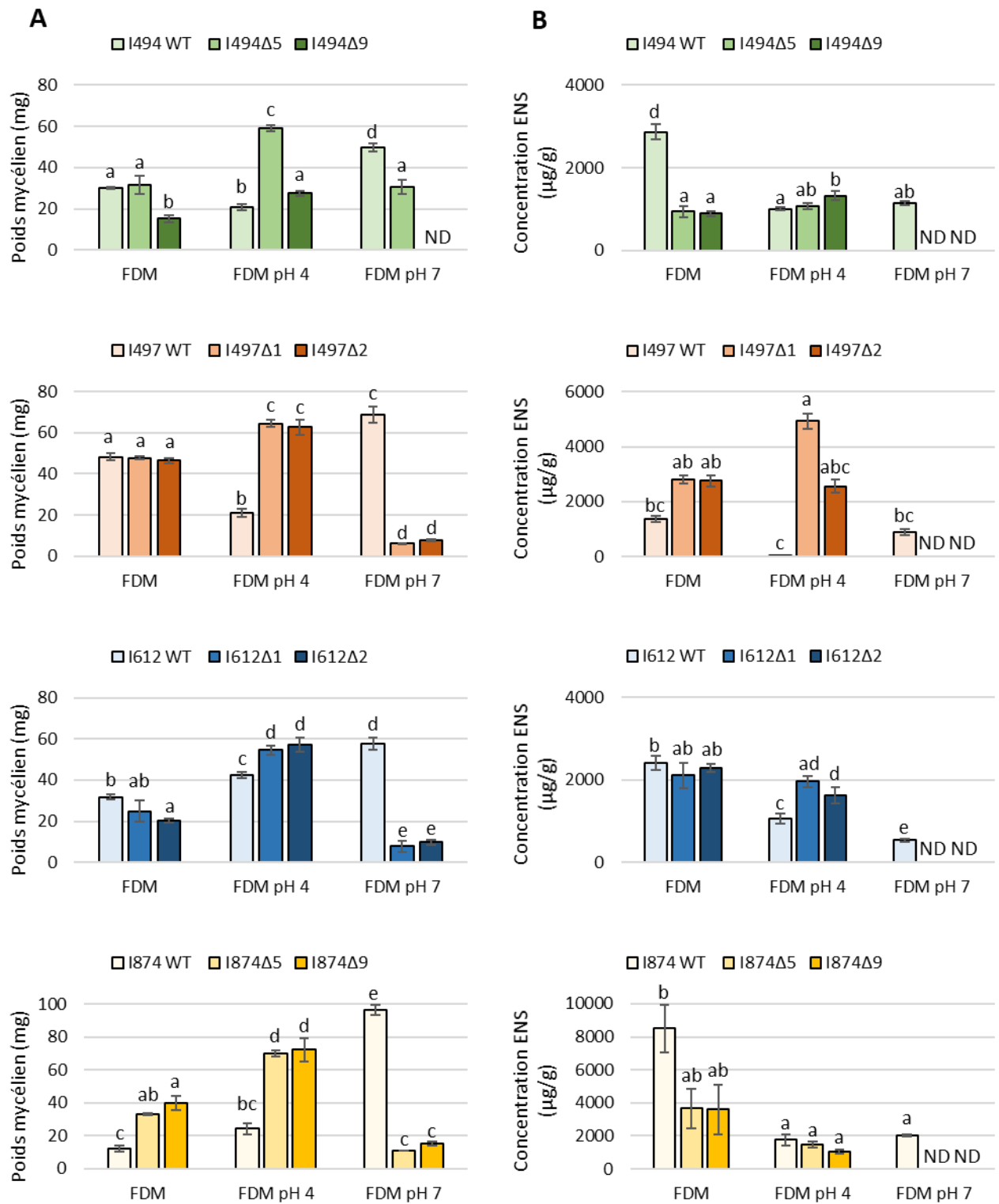


Figure 6. Comparaison entre WT et $\Delta Pac1$ A) de la biomasse fongique (en mg) et B) de la production d'enniatines (somme ENS A, A1, B et B1 en $\mu\text{g/g}$) après 12 jours de culture en milieu FDM ou FDM tamponné, ND signifie non détecté. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des trois répétitions biologiques moyennées. Les résultats ont été comparés à l'aide d'un test ANOVA ($p < 0,05$).

A pH 7, on remarque une croissance fongique importante chez tous les sauvages. En revanche, une réduction significative de la croissance est observée pour l'ensemble des souches délétées pour *FavPac1*. L'ensemble de ces résultats indique que *FavPac1* serait impliqué dans la modulation du développement fongique sous l'effet du pH ambiant chez *F. avenaceum* mais qu'il n'en est pas le seul acteur.

En ce qui concerne la production d'enniatines (Figure 6B), les résultats sont différents selon la souche considérée pour les cultures en milieu FDM non tamponné. On observe une diminution de la production d'enniatines chez les souches mutantes comparées aux sauvages pour I494 et I874, une augmentation pour I497 et une absence d'effet pour I612.

A pH 4, la délétion de *FavPac1* a induit une augmentation de la production d'enniatines chez les mutants des souches I494 (uniquement *I494Δ9*), I497 (uniquement *I497Δ1*) et I612. Toutefois cette délétion n'a pas conduit à des différences significatives pour le fond génétique I874, ni pour certains mutants de d'autres fonds génétiques (*I494Δ5* et *I497Δ2*). Une réduction drastique à pH 7 est constatée pour les souches KO comparées aux souches sauvages. Cette diminution est à mettre en relation avec la réduction de croissance décrite précédemment à pH 7 chez tous les mutants (Figure 6A). Ces données indiquent que la modulation de la production d'enniatines sous l'effet du pH ambiant est médiée pour partie par *FavPac1*.

Cette étude a été complétée par la comparaison des niveaux d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des enniatines (*esyn1* et *kivr*) entre la souche sauvage I612 et son mutant *I612Δ2* après 4 jours de culture (Tableau 2). L'expérience a été réalisée pour les milieux FDM non tamponnés et FDM pH 4, l'absence de croissance des souches KO à pH 7 rendant l'analyse impossible à ce pH et à ce temps de culture. Les analyses en qPCR vont dans le même sens que les données de toxines : l'expression d'*esyn1* est multipliée par un facteur de 450 et celle de *kivr* par un facteur proche de 22 chez la souche délétée cultivée à pH 4 comparée à la souche WT. De plus, nous avons vérifié que *Pac1* s'exprimait uniquement chez les sauvages. Ces données confirment que d'autre(s) acteur(s) serai(en)t impliqué(s) dans la régulation de l'expression des gènes de biosynthèse d'enniatines par le pH ambiant chez *F. avenaceum*.

Tableau 2. Facteurs de régulation en Log2 obtenus pour les gènes *esyn1* et *kivr* de la souche *F. avenaceum* I612Δ2 par rapport à la souche sauvage I612 en milieu FDM pH 4 après 4 jours de culture. Les facteurs de régulation Log2 ont été calculés à l'aide du logiciel REST.

Souche	Gènes	
	<i>esyn1</i>	<i>kivr</i>
I612 WT/ I612Δ2	-2,463	-0,708

Nos résultats illustrent le rôle de FavPac1 dans la modulation de la croissance fongique et la production d'enniatiines sous l'effet du pH ambiant. Ce rôle est apparu comme dépendant du fond génétique. Ces résultats sont synthétisés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Synthèse des résultats obtenus.

pH milieu	Souches WT <i>FavPac1</i>		Souches mutantes <i>FavΔPac1</i>	
	FDM pH 4	FDM pH 7	FDM pH 4 (augmente pH final 6-7)	FDM pH 7
Croissance FDM tamponné/FDM	+/-	+	+	-
Croissance <i>FavΔPac1</i> /WT	x		+	-
Production toxines FDM tamponné/FDM	-	+/-	+/-	-
Production toxines <i>FavΔPac1</i> /WT	x		+/-	-
Forme Pac1	Pac1 ⁷²	Pac1 ²⁷	Pac1	Pac1
Hypothèse	Diminution de la biosynthèse = production basale de toxines	Biosynthèse de mycotoxines non stimulée = Pac1 impliqué en « <i>just-in-time</i> »	Activation de la biosynthèse (2/4 fonds génétiques) = Autre(s) facteur(s)	Absence d'activation de la biosynthèse

II. Discussion

Plusieurs études ont mis en évidence l'influence de l'environnement sur la production de mycotoxines chez les champignons filamenteux (Merhej et al., 2011, 2012; Montibus et al., 2013). Nous avons remarqué une augmentation de pH (de 4 à 8 en 10 jours) du milieu de culture non tamponné au cours de la croissance de *F. avenaceum* (en « Préambule »). Cette capacité à alcaliniser le milieu, a déjà été rapportée pour d'autres genres fongiques (Fernandes et al., 2017) et pourrait être une stratégie mise en place par *F. avenaceum* pour créer un environnement favorable à son développement. En ce qui concerne la production d'enniatines, nos résultats ont montré que ces mycotoxines peuvent être produites dans une large gamme de pH, entre 4 et 7 (voir Chapitre 1), à l'inverse de ce qui est observé chez *F. graminearum* pour lequel un changement de pH extracellulaire et un milieu acide ($\text{pH} \leq 4$) est nécessaire à la production de toxines selon des mécanismes qui impliquent le facteur de transcription FgPac1 (Gardiner et al., 2009; Merhej et al., 2010). Nous nous sommes intéressés au système de régulation régi par le pH chez *F. avenaceum*. Ce système est très conservé et le rôle clef de ce facteur de transcription PacC/Rim101p a été mis en évidence chez de nombreux champignons filamenteux et levures (voir l'Introduction). Des orthologues de PacC d'*A. nidulans* existent et sont bien caractérisés chez divers champignons dont FgPac1 chez *F. graminearum*. Dans cette étude, nous avons identifié une séquence homologue protéique FavPac1 et elle partageait respectivement 86% et 88% d'identité avec *F. oxysporum* et *F. graminearum*. En revanche, avec les autres orthologues d'autres genres fongiques (*N. crassa* ou *A. nidulans*), le facteur FavPac1 de *F. avenaceum* présentait un faible degré de conservation, en particulier dans la région des doigts de zinc et au niveau des trois domaines d'interaction ce qui suggère des réseaux de régulation différents.

La construction de mutants KO de *FavPac1* a été entreprise afin de déterminer si ce facteur de transcription jouait un rôle dans la modulation des plusieurs traits physiologiques chez *F. avenaceum*. Nous avons ainsi observé que cette délétion affecte négativement la sporulation mais seulement pour deux des quatre fonds génétiques (I497 et I874). Ce résultat est en accord avec ce qui a été observé chez d'autres champignons comme *A. carbonarius* et *S. cerevisiae*, pour lesquels la sporulation est affectée (Li and Mitchell, 1997; Barda et al., 2020) mais aussi chez *F. graminearum* et *A. ochraceus* pour lesquels la délétion n'induisait pas de modifications dans leur capacité de conidiation (Merhej et al., 2011; Wang et al., 2018).

Nos résultats ont aussi indiqué que FavPac1 semblait intervenir dans la tolérance à certains stress abiotiques et en particulier un stress NaCl. Nous pouvons cependant nous demander (i) si les mutants *FavΔPac1* sont capables de modifier le pH des milieux CM en présence de stress et ainsi (ii) si c'est le pH ou la délétion qui est responsable de cette perte de tolérance au stress. Il sera important de compléter notre travail avec le suivi de l'évolution du pH dans les milieux CM. Chez *F. oxysporum*, Caracuel et ses collaborateurs ont indiqué que les souches dépourvues du gène *PacC* étaient plus sensibles au stress salin en raison d'un défaut dans le processus intracellulaire d'efflux des cations (Na^+ et K^+) (Caracuel et al., 2003). Ce champignon dispose soit d'un système d'extrusion dépendant de *PacC* mettant en jeu le gène *ENA1* codant pour une pompe Na^+ -ATPase (de type-P, famille des efflux) à pH alcalin (Benito et al., 2002), soit d'un système indépendant de *PacC* basé sur la présence d'un antiport Na^+/H^+ pour maintenir l'homéostasie des niveaux de sodium intracellulaire à pH alcalin. Il serait intéressant de disposer d'éléments supplémentaires (suivi du pH, expression des gènes *ENA1*...) chez *F. avenaceum* pour conclure d'un éventuel lien entre la signalisation du pH et les gènes de type *ENA1* dans les mécanismes de réponse au stress salin.

Nos résultats ont aussi indiqué que les souches délétées pour trois des quatre fonds génétiques étudiés étaient caractérisés par une croissance très affectée par un stress oxydatif induit par CdCl_2 . Chez *F. graminearum*, le facteur de transcription FgAP1 notamment intervient dans la réponse au stress oxydant par l'activation de gènes codant pour des enzymes de détoxification (Montibus et al., 2015). Une séquence consensus de PacC a été retrouvée en amont du gène *AaAP1* d'*Alternaria alternata*, homologue de FgAP1 (Lin et al., 2009). En ce qui concerne le stress oxydatif de type peroxyde d'hydrogène, la littérature rapport qu'il affecte la germination des spores chez de nombreuses espèces fongiques (Joseph et al., 1998; Hatem, 2017), en accord avec l'absence de croissance observée pour tous les isolats dans les milieux supplémentés avec H_2O_2 . A notre connaissance, l'effet du stress oxydant sur *F. avenaceum* n'est pas connu.

En ce qui concerne l'implication de *FavPac1* dans la régulation de la production d'enniatiines sous l'effet du pH ambiant chez *F. avenaceum*, nos résultats ont souligné la variété des mécanismes potentiellement impliqués, en lien avec l'observation que la production d'enniatiines est possible quel que soit le pH du milieu entre 4 et 8. Un milieu tamponné à pH 8 (données non présentées) a été testé pour les quatre des fonds génétiques étudiés, un développement mycélien et une production d'enniatiines sont possibles à ce pH basique.

Les quatre souches sauvages se développaient mieux mais produisaient moins d'enniatines en FDM pH 8 par comparaison avec le milieu FDM non tamponné. Toutefois les résultats obtenus (croissance et toxines) entre la condition FDM pH 7 et FDM pH 8 étaient semblables.

L'absence de production d'enniatines pour les souches délétées pour *FavPac1* à pH 7 suggère que le gène *esyn1* serait suractivé à pH neutre-alkalin par rapport à pH 4 aussi bien chez les sauvages que chez les mutants. En parallèle, l'absence d'effet de la délétion à pH 4 pour deux fonds génétiques étudiés (sur les quatre) est en accord avec l'idée de l'absence de maturation de la protéine FgPac1 à pH 4 et donc de l'absence de son action.

Pour la suite de nos travaux, deux approches peuvent être proposées pour confirmer que *FavPac1* est un véritable orthologue de *FgPac1* ; le add-back en restituant la copie unique de *FavPac1* ou la complémentation fonctionnelle en insérant *FgPac1* chez les *FavΔPac1*. Dans les deux cas, si le phénotype sauvage est restauré, nous confirmerons que le phénotype des mutants est bien dû à la délétion et la fonction de *FavPac1* sera alors démontrée.

La littérature rapporte que d'autres régulateurs sont capables d'influencer la production de métabolites secondaires, en lien avec les variations de pH, comme la source de carbone ou d'azote (Kim et al., 2005; Serrano et al., 2002). Par exemple, le mutant *FgΔPac1* de *F. graminearum* est capable de produire des toxines à pH neutre alors que cette production est totalement réprimée chez la souche sauvage et ce résultat semble être lié de à la présence d'une unique source d'azote dans le milieu synthétique glucose (Merhej et al., 2011), le nitrate. De plus, l'équipe de Gardiner a montré que certaines amines et le pH agissaient en synergie pour induire l'expression des gènes *Tri* ainsi que la production de déoxynivalénol à pH acide (Gardiner et al., 2009).

Nous pouvons supposer que les mécanismes de régulation de l'assimilation de l'azote (lié au facteur de transcription GATA AreA) interfèrent avec le facteur de régulation FavPac1 chez *F. avenaceum* compte tenu des résultats obtenus chez les *FavΔPac1* (pH final du milieu FDM pH 4 = 6-7). Les milieux riches en azote modulent la production de fumonisines par le biais de ce facteur AreA sous un pH neutre-alkalin (Mihlan et al., 2003; Kim and Woloshuk, 2008). De plus, il est important de noter que ce facteur de régulation est inactif à un pH inférieur à 6 et que le milieu FDM contient des sources d'azote (NaNO₃).

Ces arguments laissent à penser qu'en FDM pH 4, AreA joue un rôle dans l'activation de la biosynthèse d'enniatines chez les mutants. Pour vérifier l'implication des différents facteurs évoqués précédemment (*ENA1*, AreA), nous pourrions envisager de faire du RNA-sequencing (RNA-seq) sur les sauvages et mutants *FavΔPac1*.

Ainsi, même si les mécanismes restent à être précisés, l'ensemble de ces travaux a montré que, comme chez d'autres champignons filamenteux, le facteur de transcription *FavPac1* orthologue putatif de *PacC* intervient dans la modulation de l'expression de plusieurs traits phénotypiques chez *F. avenaceum*, dont la production d'enniatines.

III. Matériels et méthodes

La plupart des procédures expérimentales ont déjà été décrites dans le « Préambule » et le Chapitre 1.

III.1. Souches, milieux et conditions de culture

Quatre souches de *F. avenaceum*, toutes productrices d'enniatines ont été utilisées pour cette étude. Dans le Tableau 4 figure les caractéristiques de ces souches. Les cultures de spores ont été réalisées en milieu CMC (Cappellini and Peterson, 1965). Des essais sur la sporulation ont été réalisés directement à partir de ces cultures en CMC filtrées puis les spores ont été dénombrées sur cellule de Thoma. Des essais de croissance ont été réalisés avec des spores comme source d'inoculum (10^4 spores/mL) sur un milieu complet (CM) (Ilgen et al., 2009) auquel est ajouté avant solidification du peroxyde d'hydrogène, chlorure de cadmium, sorbitol ou chlorure de sodium (Sigma Aldrich®, Saint Louis, USA). La production de toxines a été mesurée en culture liquide FDM et en milieu FDM tamponné (pH 4 et pH 7). Pour chacune de ces expérimentations, trois réplicats biologiques ont été réalisées.

Tableau 4. Liste des souches *F. avenaceum* utilisées pour l'étude.

Souches	Fournisseur	Hôte	Lieu et Année d'isolement
INRA 874	Canadian Collection of Fungal Cultures (FaLH03)	Blé de printemps	Canada, 2011
INRA 612	GEVES (01.01.09.06)	Blé	Ecosse, 2010
INRA 497	Bayer	Blé tendre	France (09), 2007
INRA 494	Bayer	Blé tendre	France (56), 2007

III.2. Identification in silico de Pac1 chez *F. avenaceum*

La séquence de Pac1 de *F. graminearum* (accession GenBank n°HM745929) a été utilisée comme donnée d'entrée pour effectuer un Blast protéique (blastp). Le résultat de l'alignement protéique a donné une seule séquence chez *F. avenaceum* Fa05001 correspondant au « ph-response transcription factor » (accession GenBank n°KIL88987). Un alignement multiple protéique a été réalisé avec le logiciel CLC Sequence Viewer 8 en utilisant les séquences protéiques de *Pac* d'autres genres fongiques comme *F. oxysporum* (accession GenBank n°AY125958), *N. crassa* (accession GenBank n°Q7RVQ8) et *A. nidulans* (accession GenBank n°Z47081).

III.3. Ingénierie des mutants *FavΔPac1*

Quatre souches sauvages de *F. avenaceum* (I494, I497, I612 et I874) ont été utilisées comme souches parents pour construire les mutants délétés *FavΔPac1*. Tous les primers et conditions d'amplification utilisés sont présentés dans le Tableau 5. Les régions flanquantes de *Pac1* (977 pb en 5' et 886 pb en 3') sont amplifiées par PCR (deux couples de primers utilisés : 1/2 et 3/4) chez la souche I874 de *F. avenaceum*.

La cassette de résistance à l'hygromycine contient le gène *hph* sous contrôle du promoteur, *CPC1* de *N. crassa* et du terminateur *TrpC* d'*A. nidulans*. Elle a été amplifiée par PCR avec les primers 5/6 issue du plasmide pBSK(-) NeoHygroR. L'assemblage *in vivo* des fragments a été réalisé par recombinaison homologue dans la souche FY1679 de *S. cerevisiae* transformée avec trois fragments de produits de PCR. Pour les deux suivantes ; l'extraction ADN de *S. cerevisiae* et l'amplification de la construction complète sont détaillées dans la publication de Chen et al., 2020. Les transformants fongiques obtenus sont validés par PCR (Tableau 1) puis par séquençage NGS.

III.4. Séquençage et analyses

Pour le séquençage des génomes des souches sauvages et mutantes suivi de l'analyse des données, le protocole expérimental figure dans l'article de Chen et al., 2020.

Tableau 5. Liste des amorces utilisées pour la construction et la validation des mutants $\Delta Pac1$ chez *F. avenaceum*. Les nucléotides en gras correspondent aux séquences complémentaires entre chaque fragment à amplifier. L'ADN polymérase Haute Fidélité (Phusion™, Kapa Hifi) et l'ADN polymérase GoTaq® sont utilisées pour les amplifications PCR. Lorsque l'ADN polymérase GoTaq® est utilisée, elle est mentionnée par une étoile (*) dans le tableau. Pour chaque couple de primers est défini une température d'hybridation (Ta).

Ingénierie des mutants $\Delta Pac1$	Oligonucléotide	Séquence (5'-3')		Ta (° C)
Recombinaison dans la levure (5' flank)	1- 5F-PAC-F1	GTAACGCCAGGGTTTCCAGTCA CGACG AGAAACAGTAACATCGAAACC		58*
	2- HY-PAC-5R1	AGGGACACCGGAGACAGGGCGGCCTTATCGTCTATCCTTCTCTGCTG		
	3- GRO-3PAC-F1	CGTTTCGGGTTTACCTCTTCTAG CGGGGAATAACGTGAAGTG		
Recombinaison dans la levure (3' flank)	4- 3r-3PAC-R3	GCGGATAACAATTTACACAGAGAAACAGCTCCGAAAGTCTCCAGTGTA		60*
	5- neoHY-1-debutR	GGCCGCCCTGTCTCCGGTGTCCCT		
	6- neoHY-8-finF	CTAGAAAGAGGTAAACCCGAAACG		
Recombinaison dans la levure (cassette hygromycine)	7- 5PAC-F2	GGAACCTAACTTAACCTACCTG		64
	8- HY3	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA		
	9-HY4	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA		
Recombinaison de la souche sauvage <i>F. avenaceum</i>	10- 3PAC-R4	TGTTAATACCGGTCCAAACAG		64
	7- 5PAC-F2	GGAACCTAACTTAACCTACCTG		
	11- HY2R	GCCAATGCAGGCGCCATGG		
Diagnostic PCR	12- HY7F	AGTAGATGCCGACCGGGTTC		60*
	10- 3PAC-R4	TGTTAATACCGGTCCAAACAG		
	13- FaPac1-F	TCTGCCACCAACCACTCTC		
Diagnostic PCR	14- FaPac1-R	ACCGCTCATATCTCTCTG		60*

IV. Bibliographie

- Barda, O., Maor, U., Sadhasivam, S., Bi, Y., Zakin, V., Prusky, D., and Sionov, E. (2020). The pH-Responsive Transcription Factor PacC Governs Pathogenicity and Ochratoxin A Biosynthesis in *Aspergillus carbonarius*. *Frontiers in Microbiology* 11, 210.
- Benito, B., Garciadeblás, B., and Rodríguez-Navarro, A. (2002). Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology* 148, 933–941.
- Cappellini, R.A., and Peterson, J.L. (1965). Macroconidium Formation in Submerged Cultures by a Non-Sporulating Strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57, 962–966.
- Caracuel, Z., Casanova, C., Roncero, M.I.G., Pietro, A.D., and Ramos, J. (2003). pH Response Transcription Factor PacC Controls Salt Stress Tolerance and Expression of the P-Type Na⁺ - ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 2, 1246–1252.
- Chen, Z., Zehraoui, E., Atanasoff-Kardjalieff, A.K., Strauss, J., Studt, L., and Ponts, N. (2020). Effect of *H2A.Z* deletion is rescued by compensatory mutations in *Fusarium graminearum*. *PLOS Genetics* 16, 1–28.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst, H.N., and Peñalva, M.A. (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *The EMBO Journal* 12, 3947–3956.
- Fernandes, T.R., Segorbe, D., Prusky, D., and Di Pietro, A. (2017). How alkalization drives fungal pathogenicity. *PLOS Pathogens* 13, 1–8.
- Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., and Woloshuk, C.P. (2003). *PAC1*, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5222–5227.
- Gardiner, D.M., Osborne, S., Kazan, K., and Manners, J.M. (2009). Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology* 155, 3149–3156.
- Hatem, M.W. (2017). Evaluation of the efficiency of hydrogen peroxide against *Fusarium oxysporum*, which causes fusarium wilt on tomato plant. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 5, 1112–1116.
- Ilgen, P., Hader, B., Maier, F.J., and Schäfer, W. (2009). Developing Kernel and Rachis Node Induce the Trichothecene Pathway of *Fusarium graminearum* During Wheat Head Infection. *The American Phytopathological Society* 22, 899–908.
- Joseph, L.M., Koon, T.T., and Man, W.S. (1998). Antifungal effects of hydrogen peroxide and peroxidase on spore germination and mycelial growth of *Pseudocercospora* species. *Canadian Journal of Botany* 76, 2119–2124.
- Keller, N.P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T.D., and Burow, G.B. (1997). pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87, 643–648.
- Kim, H., and Woloshuk, C.P. (2008). Role of *AREA*, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology* 45, 947–953.

- Kim, J.-E., Han, K.-H., Jin, J., Kim, H., Kim, J.-C., Yun, S.-H., and Lee, Y.-W. (2005). Putative Polyketide Synthase and Laccase Genes for Biosynthesis of Aurofusarin in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1701–1708.
- Li, W., and Mitchell, A.P. (1997). Proteolytic Activation of Rimlp, a Positive Regulator of Yeast Sporulation and Invasive Growth. *Genetics* 145, 63–73.
- Lin, C.-H., Yang, S.L., and Chung, K.-R. (2009). The YAP1 Homolog–Mediated Oxidative Stress Tolerance Is Crucial for Pathogenicity of the Necrotrophic Fungus *Alternaria alternata* in Citrus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 942–952.
- Lysøe, E., Harris, L.J., Walkowiak, S., Subramaniam, R., Divon, H.H., Riiser, E.S., Llorens, C., Gabaldón, T., Kistler, H.C., Jonkers, W., et al. (2014). The Genome of the Generalist Plant Pathogen *Fusarium avenaceum* Is Enriched with Genes Involved in Redox, Signaling and Secondary Metabolism. *Plos One* 9, 1–17.
- Merhej, J., Boutigny, A.-L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2010). An Acidic pH is a determinant factor for TRI genes expression and trichothecenes B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives and Contaminants* 27, 710–717.
- Merhej, J., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2011). The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 48, 275–284.
- Merhej, J., Urban, M., Dufresne, M., Hammond-Kosack, K.E., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2012). The velvet gene, *FgVe1*, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology* 13, 363–374.
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T.-W.D., and Tudzynski, B. (2003). AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Molecular Microbiology* 47, 975–991.
- Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M.-N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2013). The bZIP Transcription Factor Fgap1 Mediates Oxidative Stress Response and Trichothecene Biosynthesis But Not Virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 8, 1–12.
- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., and Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 41, 295–308.
- Peñalva, M.A., and Arst, H.N. (2002). Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 426–446.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J.R., and Ariño, J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Molecular Microbiology* 46, 1319–1333.
- Wang, Y., Liu, F., Wang, L., Wang, Q., Selvaraj, J.N., Zhao, Y., Wang, Y., Xing, F., and Liu, Y. (2018). pH-Signaling Transcription Factor AopacC Regulates Ochratoxin A Biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 4394–4401.

Chapitre 3

Chapitre 3 : Modulation de la biosynthèse d'enniatines par les acides phénoliques

Article: “Investigating the efficiency of hydroxycinnamic phenolic acids to inhibit the production of enniatins by *F.avenaceum* and modulate the expression biosynthetic genes.” Gautier et al., 2020.

Investigating the efficiency of hydroxycinnamic phenolic acids to inhibit the production of enniatins by *F. avenaceum* and modulate the expression of biosynthetic genes

Charlotte Gautier ¹, Laetitia Pinson-Gadais ¹, Marie-Noelle Verdal-Bonnin ¹, Christine Ducos ¹, Judith Tremblay ¹, Sylvain Chéreau ¹, Vessela Atanasova ¹ and Florence Richard-Forget ^{1,*}

¹ INRAE, Mycology and Food Safety (MycSA), F-33882 Villenave d'Ornon, France; charlotte.gautier@inrae.fr (C.G.); laetitia.pinson-gadais@inrae.fr (L.P.); marie-noelle.verdal-bonnin@inrae.fr (M.B.); christine.ducos@inrae.fr (C.D.); tremblay.jud@hotmail.com (J.T.); sylvain.chereau@inrae.fr (S.C.); vessela.atanasova@inrae.fr (V.A.); florence.forget@inrae.fr (F.F.)

* Correspondence: florence.forget@inrae.fr (F.F.); Tel.: +33-557-122-483

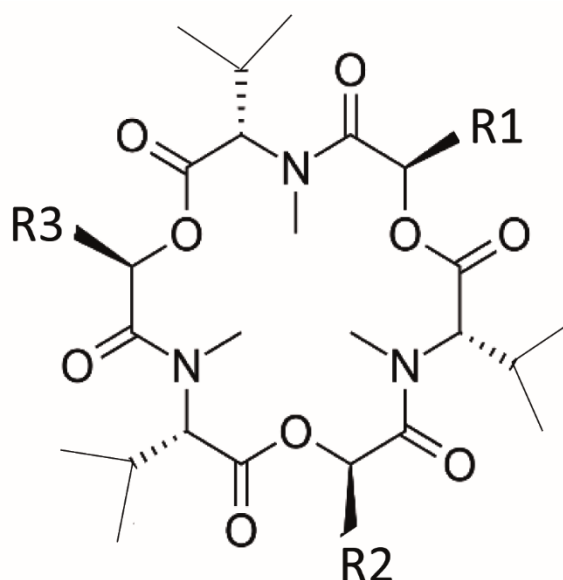
Abstract: Enniatins (ENNs) that belong to the group of emerging mycotoxins are widespread contaminants of agricultural commodities. There is currently insufficient evidence to rule out health concern associated with long-term exposure to ENNs and efforts must be strengthened to define control strategy. While the potential of plant compounds to counteract the contamination with legislated mycotoxins has been reported, nothing was known regarding ENNs. The present study evidenced for the first time the efficiency of hydroxycinnamic acids to inhibit the fungal growth and ENNs yield by *Fusarium avenaceum*. Notably, 0.5 mM of exogenous ferulic, caffeic and *p*-coumaric acids led to a drastic reduction of ENNs synthesis in pH4 broths, ferulic acid being the most potent. The ENNs inhibitory activity of ferulic acid was shown to be associated with a significant down-regulation of the expression of ENNs biosynthetic genes. To further investigate the bioactivity of ferulic acid, its metabolic fate was characterized in fungal broths and the capacity of *F. avenaceum* to metabolize it through a C2-clivage type degradation demonstrated. Overall, our data support the promising use of ferulic acid in ENNs prevention strategies, either as part of an environmental-friendly plant-care product or as a biomarker of plant resistance.

Keywords: *Fusarium avenaceum*; enniatins; phenolic acids; transcriptional control

Key Contribution: This study demonstrates the high efficiency of ferulic acid to down-regulate the expression of enniatins biosynthetic genes and inhibit the production of enniatins by *F. avenaceum*. These data along with the apparently weak potential of *F. avenaceum* to metabolize ferulic acid support the promising use of ferulic acid in strategies aiming to prevent the contamination with enniatins.

1. Introduction

Mycotoxins are a critical food safety concern in various agricultural commodities, posing significant health risk to humans and livestock. These fungal metabolites have also a significant economic impact that includes increased health care cost, reduced livestock production, losses in crops, or product recalls. This economic consideration also embraces costs of mycotoxins management linked to prevention, sampling, analysis, mitigation and litigation. Extensive research effort has been implemented during the past decades with the aim to reduce the levels of mycotoxins in food and feedstuffs [1]. Since mycotoxins are hardly to be eliminated once they are present in commodities, prevention methods, gathering pre-harvest field management and post-harvest storage, are acknowledged as the most efficient strategies to ensure food and feed safety and have been one of the major research topics related to mycotoxins [2–4]. Currently more than 400 mycotoxins produced by a variety of fungal species have been evidenced. Among this huge number of metabolites, a small set of approximately 30 mycotoxins, designed as major mycotoxins because of their high toxicological relevance, has been the subject of in-depth studies. These major mycotoxins include *Aspergillus* mycotoxins (aflatoxins and ochratoxins), *Penicillium* mycotoxins (ochratoxins and patulin) and *Fusarium* mycotoxins (deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins). These toxins are regulated in many countries. In Europe [5], the regulation (EC) No 1881/2006 established maximum permissible limits for these major mycotoxins in various foodstuffs. In the two past decades, a class of lesser-known mycotoxins, gathered under the term “emerging mycotoxin” has gained increased interest among the scientific community. There is no clear definition for the term “emerging mycotoxin”; it covers a range of mycotoxins that are neither routinely analyzed nor legislatively regulated, the occurrence of which is increasingly documented [6]. The *Fusarium* mycotoxins enniatins (ENNs), beauvericin, moniliformin and fusaproliferin fall into this group of mycotoxins. The most prevalent toxins among the so-called emerging mycotoxins are ENNs [7] that can be found in a wide range of substrates including potato, apple, sugar beet, coffee beans and cereal grains, cereals being the most commonly contaminated agricultural commodities [8]. The map of ENNs occurrence in European cereal harvests, recently drawn by Gautier et al. [9], clearly illustrates the high frequency of ENNs contamination events together with the high values of contamination levels that can exceed 500 mg kg⁻¹ for certain crops and countries. ENNs are cyclic hexadepsipeptides. To date, 29 ENNs that are distinct from each other by the nature of the N-methylamino acid residues have been identified [10]. Among these 29 variants, ENNs A, A1, B and B1 are the most frequently detected in cereal grains; their chemical structures are reported in Figure 1. Nearly 30 fungal species have been shown to have the capacity to yield ENNs, with *Fusarium avenaceum* and *Fusarium tricinctum* being the major contributors of the contamination of cereal grains [9]. While the chemical pathway of ENNs biosynthesis has been well documented [11], its genetic basis is less known. In addition to *esyn1* encoding the enniatin synthetase, a non-ribosomal peptide synthetase, that plays a primary role in the biosynthetic pathway of ENNs, only one other gene, *kivv*, that encodes a ketoisovalerate reductase, has been related to ENNs biosynthesis [9]. Notwithstanding the high prevalence of ENNs in food and feed products, sometimes even in high concentrations, there are still significant knowledge gaps regarding their toxicity. Actually, whereas their cytotoxicity has been widely investigated leading to the demonstration of various effects including apoptosis, mitochondrial damages and reactive oxygen species production [12], their *in vivo* toxicity remains poorly documented. There are not sufficient *in vivo* toxicity data to allow performing a human risk assessment and not enough evidence to rule out concern about long-term exposure [13]. The issue of interacting toxic effects when ENNs co-occur with other major mycotoxins should also not be neglected [14]. Thus, in the light of current scientific knowledge, health risks induced by ENNs exposure cannot be excluded and efforts must be pursued to define efficient control strategy to minimize the presence of these mycotoxins in agricultural commodities.



Enniatin	Abbreviation	R1	R2	R3
Enniatin A	ENN A	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Enniatin A1	ENN A1	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
Enniatin B	ENN B	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
Enniatin B1	ENN B1	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

Figure 1. Chemical structure of enniatins A, A1, B and B1.

The preharvest strategy package recommended to reduce *Fusarium* mycotoxins in cereal harvests combines several interventions including adaptation of the crop sequence, crop residue management, choice of cultivar, proper use of fungicide and appropriate sowing date and rate [15]. In recent years, the environmental and health risks associated with chemical pesticides, plus the risk of increased spreading of *Fusarium* isolates resistant to commonly used synthetic fungicides, have stimulated research into alternative methods of disease management. Prevention measures based on the use of phytochemicals with antimicrobial activities have been investigated [16]. Increasingly, plant phenolic compounds have become the subject of mycotoxin research and many groups have demonstrated their capacity to restrain the fungal growth and the production of various mycotoxins, including *Fusarium* mycotoxins such as deoxynivalenol [17–19], T2 and HT2 toxins [20,21] and fumonisins [22,23]. However, to the best of our knowledge, no study has examined the effect of phenolic compounds on the growth of ENNs-producing *Fusarium* species and on ENNs biosynthesis. Among phenolic compounds, hydroxycinnamic acids, that are the most widely distributed phenolic acids in plants, have been frequently reported to display the highest bioactivity against toxigenic fungi [24]. This high efficiency has been ascribed to their lipophilic and antioxidant properties, two characteristics assumed to play a primary role in antifungal and mycotoxin inhibitory activities [25].

The present work aimed at providing first insights on the potential of phenolic hydroxycinnamic acids such as caffeic (CAF), ferulic (FER), *p*-coumaric (COUM), chlorogenic (CHLO), sinapic (SIN) and syringic (SYR) acids to interfere with the growth of *F. avenaceum* and its production of ENNs. To a better understanding of the mechanisms involved in the modulation of ENNs yields, the capacity of selected hydroxycinnamic acids to modulate the expression of ENNs biosynthetic genes was analyzed. The study was complemented with further investigation into the way hydroxycinnamic acids can be degraded or converted by *F. avenaceum*.

2. Results

2.1 Effect of hydroxycinnamic acids on the radial growth of *F. avenaceum* I612

Concentrations that inhibit 50% of the radial growth (IC_{50} values) of *F. avenaceum* I612 cultivated on solid Potato Dextrose Agar (PDA) medium were determined for six selected hydroxycinnamic acids and are gathered in Table 1. The determined IC_{50} values ranged from 1.4 mM to 5.2 mM. The lower the IC_{50} value, the higher the fungicidal efficiency of the phenolic acid under consideration. Thus, FER and COUM were characterized as the most toxic compounds whereas CAF and CHLO displayed the weakest antifungal effect against *F. avenaceum*.

Table 1. Experimental half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of hydroxycinnamic acids against *F. avenaceum* I612 cultivated on solid Potato Dextrose Agar medium.

Phenolic acids	CAF	FER	CHLO	COUM	SIN	SYR
IC_{50} (mM)	5.1	1.4	5.2	1.4	3.4	3.4

CAF - caffeic acid, FER – ferulic acid, CHLO – chlorogenic acid, COUM – coumaric acid, SIN – sinapic acid, SYR – syringic acid.

2.2 Effect of hydroxycinnamic acids on mycelium weights and production of ENNs by *F. avenaceum* I612

The antifungal effect and mycotoxin inhibitory activity of the six selected hydroxycinnamic acids were further investigated in buffered liquid media inoculated by *F. avenaceum* I612. A concentration of 0.5 mM, which is close to the amounts of phenolic acids in wheat grains [26], was chosen. Two pH conditions (pH 3 and pH 6) were considered to flank the pKa values of the phenolic acids and evaluate the contribution of dissociated and non-dissociated forms to their bioactivity. pKa values of the studied phenolic acids are reported in Table 2. Data regarding mycelium weights indicated the occurrence of a significant inhibition of *F. avenaceum* fungal biomass accumulation for only two conditions: cultures at pH 3 supplemented with 0.5 mM FER and SIN acids (data not shown). In 10-day-old cultures, mycelium weights were reduced by 43% and 36% in presence of FER and SIN, respectively. The amounts of ENNs (sum of ENN A, A1, B and B1) produced by *F. avenaceum* I612 in pH 3 and pH 6 buffered liquid cultures supplemented or not with hydroxycinnamic acids (0.5 mM) are reported in Table 2. In pH 3 media, a significant inhibition of the ENNs biosynthesis was induced by phenolic acid supplementation, regardless of the hydroxycinnamic acid. Notably, no ENNs or only traces of ENNs were detected in FER, CAF and COUM treated broths. A drastic reduction in ENNs yields was also observed in presence of CHLO, SIN and SYR acids with inhibitory ratios reaching 98, 92 and 80%, respectively. In pH 6 modalities, for which dissociated forms of hydroxycinnamic acids are predominant, a significant reduction of ENNs production was evidenced for three treatments: FER, CAF and COUM acid-supplemented broths. The inhibition percentages were lower than those quantified in media buffered at pH 3, ranging from 35% (CAF) to 70% (COUM). No significant inhibition was observed with SIN, SYR and CHLO.

Table 2. Effect of hydroxycinnamic acids at 0.5 mM on the production of enniatins by *F. avenaceum* I612 in *Fusarium* defined medium buffered at pH 3 and pH 6.

Phenolic acid	pKa value	Enniatins (A, A1, B, B1) sum ($\mu\text{g g}^{-1}$ of dry biomass)	
		FDM medium pH 3	FDM medium pH 6
Control	-	1664.68 $\pm$ 175.58	1627.87 $\pm$ 179.45
CAF	4.62	1.23 $\pm$ 0.88*	967.29 $\pm$ 176.46*
FER	4.58	0.00*	620.98 $\pm$ 148.95*
CHLO	2.66	31.56 $\pm$ 6.09*	1872.27 $\pm$ 308.99
COUM	4.64	0.56 $\pm$ 0.21*	441.52 $\pm$ 87.72*
SIN	6.61	128.50 $\pm$ 33.32*	1443.46 $\pm$ 309.60
SYR	3.90	335.97 $\pm$ 41.53*	1662.08 $\pm$ 569.59

CAF - caffeic acid, FER – ferulic acid, CHLO – chlorogenic acid, COUM – coumaric acid, SIN – sinapic acid, SYR – syringic acid, FDM - *Fusarium* defined medium. Data are means $\pm$ standard deviation using three biological replicates. Differences between control and tested phenolic acids were determined using Kruskal-Wallis test. Asterix (*) indicates significant differences when compared with control (Conover-Iman method, $P < 0.05$).

2.3 Effect of FER, CAF and COUM on fungal biomass and production of ENNs by a panel of *F. avenaceum* strains

The effect of 0.5 mM FER, CAF and COUM – the three phenolic acids characterized by the highest bioactivity in the previous trial – was further evaluated using five additional *F. avenaceum* strains with different capacities to produce ENNs (Table 4, material and methods section). Two strains of the panel were low-producing ones (I112 and CBS 143.25) and three were high-producing isolates (I495, I497 and FaLH27) characterized by ENNs yields close or higher than 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dried mycelium in 10-day-old broths. The I612 strain belongs to this group of high-producing isolates. pH values of the liquid buffered media were set at pH 4 and pH 7 to flank pKa values of the phenolic acids whereas allowing the production of ENNs by each of the considered strains in all untreated cultures. Results (mycelium weights and ENNs) are expressed as the ratio between the amounts quantified in the treated cultures and in control ones (Figures 2 and 3).

With regards to antifungal effects in pH 4 buffered media (Figure 2a, 2b and 2c), a significant reduction in fungal biomass was observed for three strains in FER-treated cultures (I495, CBS 143.25 and FaLH27 with inhibition rates ranging from 25 to 55%), for one strain with COUM (I495 - inhibition rate close to 50%) whereas no significant inhibition was evidenced in cultures supplemented with CAF. In pH 7 buffered media, a substantial inhibition (close to 50%) of the fungal growth was observed for only two modalities: I497 broths supplemented with COUM and FER. Altogether, our data clearly evidence the highly variable sensitivity of *F. avenaceum* strains to the three selected phenolic acids. According to the number of impacted strains, FER appears as a more potent antifungal compound than COUM and CAF.

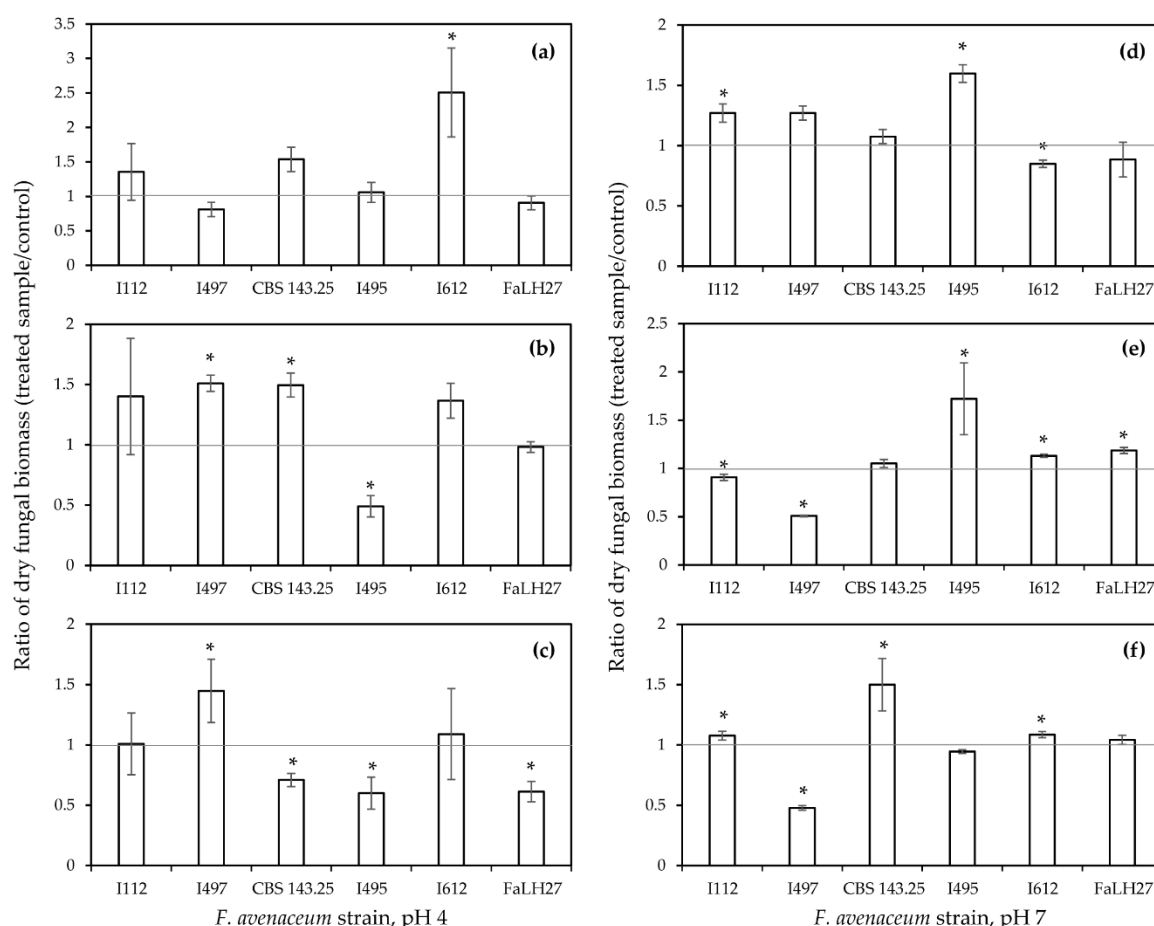


Figure 2. Effect of (a, d) caffeic acid, (b, e) *p*-coumaric acid and (c, f) ferulic acid at 0.5 mM on the fungal biomass weights of six *F. avenaceum* strains in 10-day-old broths buffered at (a, b, c) pH 4 and at (d, e, f) pH 7. Differences between control and phenolic acid-treated cultures were determined using Kruskal-Wallis test. Asterix (*) indicates significant differences when compared with corresponding controls (Conover-Iman method, $P < 0.05$).

Looking at ENNs yields, results reported in Figure 3 clearly evidence the drastic inhibition induced by each of the three phenolic acids in pH 4 buffered media, regardless of the inoculated isolate. Notably, exogenous FER abrogated the production of ENNs for four strains (I112, I495, I497 and CBS 143.25), led to traces of ENNs in I612 broths and to a 65% reduction of the ENNs amounts produced by the FaLH27 isolate. In pH 7 buffered media, with the exception of two strains, I612 and FaLH27, for which the production of ENNs was slightly or not significantly inhibited regardless of the phenolic acid treatment, supplementation with CAF, COUM and FER led to a significant reduction in ENNs amounts.

Taken together, the previous data suggest that the effects on fungal growth and on ENNs biosynthesis induced by hydroxycinnamic acids can be two independent events. Indeed, for most of the modalities, a significant reduction in ENNs yields was observed while the fungal growth was not affected. Moreover, even though inhibitory effects on fungal growth and ENNs yields were shown in pH 7 buffered media, the number of affected strains and the inhibition rates were broadly higher in pH 4 condition. These data corroborate the highest bioactivity of non-dissociated forms of phenolic acids.

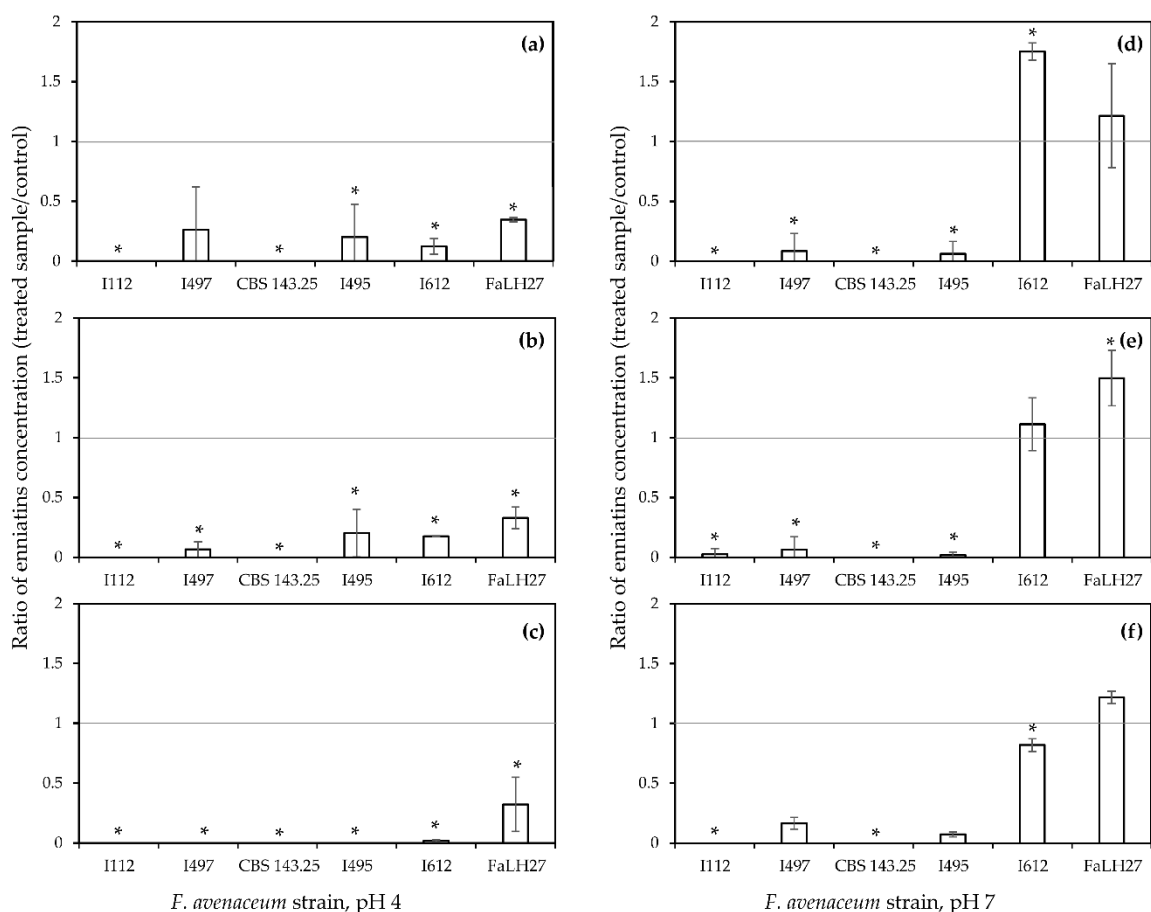


Figure 3. Effect of (a, d) caffeic acid, (b, e) *p*-coumaric acid and (c, f) ferulic acid at 0.5 mM on enniatins production by six *F. avenaceum* strains in 10-day-old broths buffered at (a, b, c) pH 4 and at (d, e, f) pH 7. Differences between control and phenolic acid-treated cultures were determined using Kruskal-Wallis test. Asterix (*) indicates significant differences when compared with corresponding control (Conover-Iman method, $P < 0.05$).

2.4 Effect of FER on the expression of ENNs biosynthetic genes from *F. avenaceum* I612

To further investigate the mechanism by which FER can affect the production of ENNs, the expression of two genes involved in the ENNs biosynthesis pathway (*esyn1* and *kivr*) was analyzed. The expression of *esyn1* and *kivr* was compared from *F. avenaceum* I612 strain grown in pH 4 and pH 7 media supplemented or not with 0.5 mM FER after 5 days of culture. As reported on Figure 4, the production of ENNs in the culture media used for this study starts at day 4, speeds up between day 4 and day 7 to then stabilizes. Levels of the elongation factor *ef1α* and the RNA polymerase II (*rpb2*) genes, used as reference genes, were not different between ferulic-treated cultures and untreated cultures. The expression values of the target *esyn1* and *kivr* genes were normalized by the reference gene expression values and were expressed as down regulation factor in the treated conditions relative to the control conditions (Table 3).

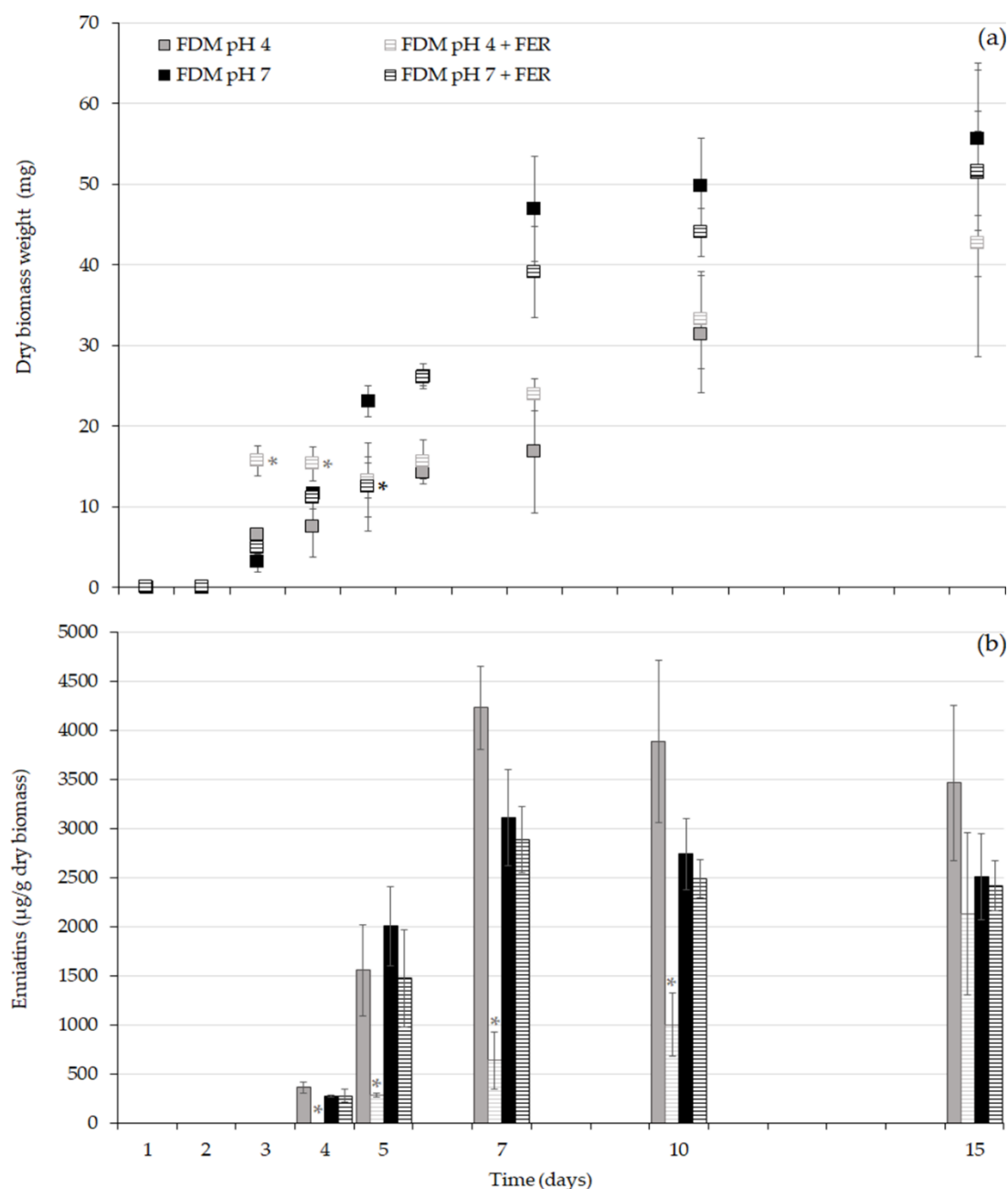


Figure 4. Kinetics of (a) fungal growth and (b) enniatins production by *F. avenaceum* I612 in *Fusarium* defined media buffered at pH 4 (grey) and at pH 7 (black) supplemented (striped grey or striped black) or not (full grey or full black) with ferulic acid at 0.5 mM. Differences between control and ferulic acid-treated cultures in terms of fungal biomass and enniatins were determined separately for each day using Kruskal-Wallis test. Asterix (*) indicates significant differences when compared with corresponding control (Conover-Iman method, $P < 0.05$). FER – ferulic acid, FDM – *Fusarium* defined medium.

Our data indicate a substantial downregulation of the expression of *esyn1* and *kiv1* induced by exogenous FER in the pH 4 medium. Indeed, the log2 values of the regulation factors reached -11.5 for *esyn1* and -8.4 for *kiv1*, meaning that the expression of *esyn1* was reduced by more than 2900 times and that of *kiv1* by more than 330 times. This result suggests that the decrease in ENNs production observed in pH 4 FER-treated cultures (as clearly seen in Figure 4b) could be ascribed to a decrease in the level of biosynthetic genes expression. In pH 7 media, the expression of *esyn1* and *kiv1* was minimally affected by the FER treatment (log2 values of the regulation factor were -0.75 for *esyn1* and -0.6 for *kiv1*), in accordance with the lack of observed effect on toxin production (Figure 4b).

Table 3. Log2 regulation factors obtained for *esyn1* and *kiv* genes in the ferulic acid supplemented culture relative to the control culture.

Medium	Gene	
	<i>esyn1</i>	<i>kiv</i>
FDM / FDM + FER	- 3.4	- 3.1
FDM pH 4 / FDM pH 4 + FER	- 11.50	- 8.40
FDM pH 7 / FDM pH 7 + FER	- 0.75	- 0.6

Log2 regulation factors were calculated using the REST software. FDM - *Fusarium* defined media, FER – ferulic acid.

2.5 Fate of FER in *F. avenaceum* I612 broths

To investigate the metabolism pathway of FER by *F. avenaceum*, evolution of FER amounts was monitored in culture supernatants over the course of *F. avenaceum* I612 growth in pH 4 and pH 7 media. Results are gathered in Figures 5a and 5b. First analyses showed that FER levels were stable in pH 4 and pH 7 non-inoculated cultures during the 15 days of incubation at 25°C (data not shown). In supernatants of pH 4 inoculated cultures (Figure 5a), a rapid decrease in FER amounts during the first days of culture, *i.e.* during the exponential phase of fungal growth (Figure 4a), was observed, resulting in non-quantifiable levels at day 7. In liquid chromatography/diode-array detector (LC/DAD) profiles of the supernatants monitored at 260 nm, the presence of two additional peaks was highlighted. On the basis of retention times and UV spectra of reference standards, these peaks were identified as vanillic acid (VAN) and protocatechuic acid (PROTO). VAN was only quantified at day 4 and day 5; the highest quantified amount was closed to 0.3 µmoles. PROTO was detected starting 5 days after inoculation with levels ranging from 0.1 to 0.25 µmoles. In supernatants of pH 7 inoculated cultures (Figure 5b), the decrease in FER amounts was slower than that observed in pH 4 broths; 12% of the supplemented FER was still present in 10-day-old broths. Similarly to what was observed in pH 4 broths, the FER decrease was accompanied by the formation of VAN and PROTO. Regardless of the pH of the media, VAN and PROTO were not present in non-inoculated supernatants supplemented with FER, suggesting that their production could be related to the metabolism of FER by *F. avenaceum*. The unbalanced ratio between FER disappearance (4 µmoles) and VAN + PROTO acids accumulation (below 1 µmole) may indicate the occurrence of additional mechanisms underpinning the decrease in FER. In addition to other metabolism pathways leading to products that were not be visualized with the LC/DAD method used throughout this study, FER disappearance could also result from its penetration into fungal cells.

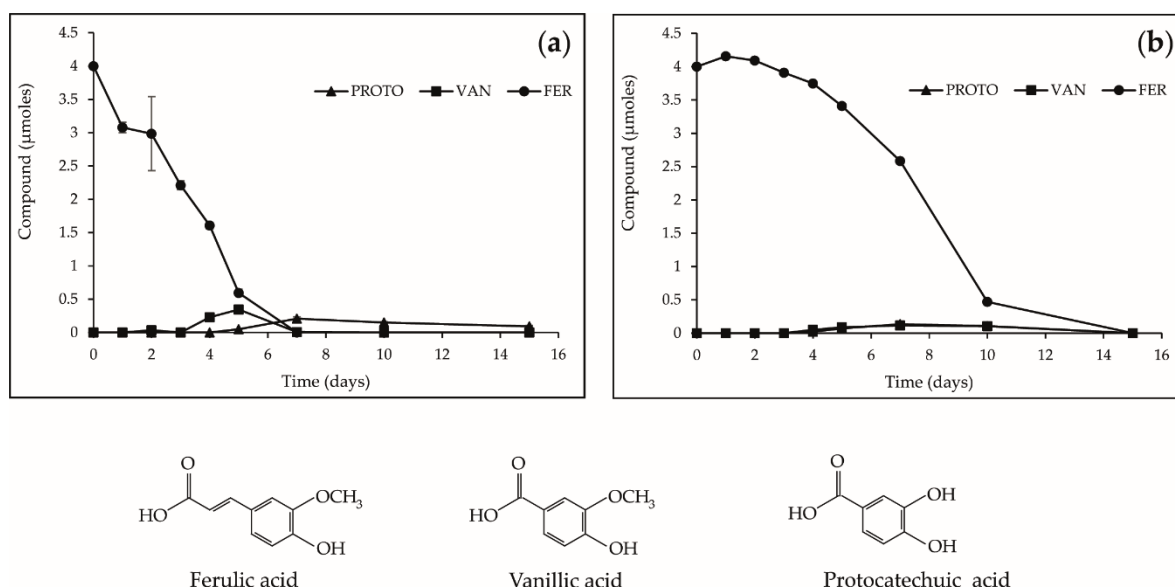


Figure 5. Time-course of ferulic acid decline in *F. avenaceum* I612 cultures in *Fusarium* defined medium buffered at (a) pH 4 and at (b) pH 7. Chemical structure of ferulic acid and its metabolites. Values are expressed as means $\pm$ standard deviation using three biological replicates. FER – ferulic acid, VAN - vanillic acid and PROTO – protocatechuic acid.

3. Discussion

According to the increasing evidence of the worldwide and frequent occurrence of crop contamination with ENNs, together with the potential risk of health hazards associated with chronic exposure and the likelihood of synergistic toxic effects when ENNs co-occur with other regulated mycotoxins, ENNs might pose a major threat to human and animal health [9]. Efforts should be pursued to define efficient control strategies to mitigate their presence in cereal harvests. Among pre- and post-harvest measures commonly applied to combat toxigenic fungi and minimize the contamination with mycotoxins, chemical control is widely used. In recent years, accelerated efforts have been undertaken in the screening of plant metabolites for their potential use as alternatives to synthetic fungicide and the development of environmental-friendly solutions to counteract the growth of toxigenic fungi and their production of mycotoxins [16]. These efforts have been mainly concentrated on legislated mycotoxins, intensely on aflatoxins, ochratoxins, trichothecenes and fumonisins [27,28]. The present study evidenced for the first time the capacity of several plant hydroxycinnamic acids to inhibit the fungal growth of ENNs producing fungal isolates and to efficiently reduce the production of ENNs. Notably, exogenous FER, CAF and COUM were shown to drastically reduce the production of ENNs by a set of *F. avenaceum* strains cultivated at pH 4. Taken together, our data indicated that, among the most abundant hydroxycinnamic acids occurring in plant tissues, FER possessed the highest fungicidal activity against *F. avenaceum* but also the highest ENNs inhibitory activity. This result corroborates previous studies that have led to the conclusion that FER was the most potent phenolic acid with antifungal and anti-mycotoxin activity against various *Fusarium* species including *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium poae*, *Fusarium langsethiae* and *Fusarium sporotrichioides* [20,25,29]. According to our results, FER that has been suggested to play a pivotal role in cereal resistance to *F. graminearum* and to deoxynivalenol accumulation [24,30] could also contribute to the mechanisms employed by plants to counteract the infection by *F. avenaceum* and contamination with ENNs.

We also observed that lowering the pH value of the culture media led to an increased bioactivity of hydroxycinnamic acids. A same trend has been reported regarding the antimicrobial properties of various phenolic acids, including hydroxycinnamic and benzoic acids [31,32]. Actually, the concentration of undissociated forms of phenolic acids increases with decreasing pH and these undissociated forms are more lipophilic compared to dissociated phenolic acids. Undissociated forms are therefore more prone to penetrate the fungal membrane and to induce irreversible perturbations including hydrophobicity modifications, changes in negative surface charge and the formation of pores leading to leakage of essential intracellular constituents [33]. The faster disappearance of FER observed during the exponential phase of mycelial growth of *F. avenaceum* cultivated in pH 4 media compared to pH 7 culture media (Figure 4) is consistent with the highest solubility of undissociated forms in the fungal membrane. Moreover, our results suggested that FER disappearance could also result from its biotransformation by *F. avenaceum*. In fact, analysis of *F. avenaceum* broths showed that the decrease in FER was accompanied by the formation of VAN and PROTO (Figure 5). Bioconversion of FER into VAN by filamentous fungi has been widely studied and different metabolic pathways have been proposed. A first decarboxylation of FER into 4-vinylguaicol followed by its conversion into vanillin and finally the reduction of vanillin into VAN was suggested for *Schizophyllum commune* [34]. For *Pycnoporus cinnabarinus* [35], *Aspergillus niger* and *Phanerochaete chrysosporum* [36], the proposed metabolic route includes a first oxidative cleavage of the propenoic side chain of FER to yield VAN, that can be further oxidized into vanillin or decarboxylated into methoxyquinone. According to our results, neither vanillin nor methoxyquinone were detected in FER-supplemented media inoculated by *F. avenaceum*. We however detected the presence of PROTO which could be explained by the metabolisation of VAN catalyzed by a vanillate-O-demethylase [37,38]. In our experiments, while more than 4 μ moles of FER have disappeared from the culture broths after 7 days of incubation at pH 4 or 10 days at pH 7, the sum of quantified VAN + PROTO acids did not exceed 1 μ mole. Even though the occurrence of additional biotransformation pathways of FER, which the chromatographic methods we used did not allow to evidence, cannot be excluded, these findings could suggest that disappearance of FER in *F. avenaceum* broths is mostly due to its integration within the fungal membranes.

When comparing the fungicidal and anti-mycotoxin activities of FER, CAF and COUM acids (Figures 2 and 3), it appeared that these two effects could be related to independent mechanisms. Indeed, for several modalities, a significant reduction in ENNs yield was observed, while *F. avenaceum* growth was not or weakly affected. As clearly demonstrated by our results, exogenous FER induced a drastic decrease of the expression of ENNs biosynthetic genes, which corroborates the occurrence of a regulatory mechanism that specifically targets the production of ENNs. These data are in accordance with previously published reports that have indicated that the efficiency of some natural plant compounds to inhibit the production of mycotoxins was associated with a transcriptional down-regulation of biosynthetic genes. For instance, the expression of key genes involved in the biosynthesis of aflatoxin B1 and ochratoxin A was shown to be significantly reduced by exposure to cinnamaldehyde, a natural plant substance derived from cinnamon [39,40]. In the same way, the inhibition of the biosynthesis of type B (deoxynivalenol) and type A (toxins T-2 and HT-2) trichothecenes by FER has been partially ascribed to a decrease in the expression of several *tri* genes [17,20]. Interestingly, the intensity of the reduction of the expression of ENNs biosynthetic genes induced by exogenous FER was remarkably higher than that observed in the studies mentioned above; regulation factors higher than 2900 for *esyn1* and 330 for *kiv* were quantified in the present study while these factors were lower than 10 regarding trichothecenes biosynthetic genes [17,20]. The mechanism that can explain the high efficiency of FER to modulate the expression of *esyn1* need to be elucidated. One hypothesis could be linked to the capacity of FER to alleviate oxidative stress which has been shown to activate the biosynthesis of various mycotoxins and increase the expression of biosynthetic genes [41,42]. On a mechanistic view, several reports have evidenced that transcription factors homologs to Yap1 in *Saccharomyces cerevisiae* played a key role in fungal tolerance to oxidative stress and promoted the production of toxins [43,44]. However, while the connection between oxidative stress response and regulation of mycotoxin biosynthetic pathway has been investigated for most of the major legislated mycotoxins, nothing is known regarding the effect of oxidative stress on the production of ENNs.

4. Conclusions

The results obtained in this study highlights the high efficiency of FER to inhibit the production of ENNs by *F. avenaceum* associated with a notable capacity of this phenolic acid to induce a down-expression of ENNs biosynthetic genes. These data along with the apparently weak potential of *F. avenaceum* to metabolize FER support the promising use of this plant natural compound in strategies aiming to prevent the contamination of crops with ENNs, either as part of an environmental-friendly plant-care product or as a biomarker of plant resistance. The present study stresses the fact that efforts must be pursued to fully understand the mechanistic clues underpinning the effect of FER on the biosynthesis of ENNs but also, more generally, the effect of environmental factors on the production of this family of so-called emerging mycotoxins.

5. Materials and Methods

5.1. Chemicals and standards

For LC/DAD analysis, LC-grade acetonitrile and methanol were purchased from VWR (Fontenay-Sous-Bois, France). Vanillic, protocatechuic, caffeic, ferulic, *p*-coumaric, sinapic, syringic and chlorogenic acids, as well as enniatin A, enniatin A1, enniatin B and enniatin B1 were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

5.2 *F. avenaceum* strains, media and culture conditions

Six *F. avenaceum* strains were used in this study; their characteristics and toxigenic potential are summarized in Table 4. They have been assigned as belonging to the *F. avenaceum* species by using qPCR, with species-specific primers [45,46]. These *Fusarium* strains were chosen according to the amount of enniatins they can produce: low producing (I112 and CBS 143.25) and high producing strains (FaLH27, I612, I497 and I495).

Table 4. Origin, isolation characteristics and toxigenic potential of the *F. avenaceum* strains used in this study.

Strain	Source	Host	Country and year of isolation	Sum of enniatins ¹ (µg g ⁻¹)
FaLH27	Canadian collection of fungal cultures	Winter wheat	Canada, 2011	1152.4 ± 98.2
I612	INRAE/MycSA collection	Wheat	Scotland, 2010	2948.7 ± 21.0
I497	INRAE/MycSA collection	Soft Wheat	France, 2007	995.3 ± 13.3
I495	INRAE/MycSA collection	Soft Wheat	France, 2007	1360.3 ± 91.6
I112	INRAE/MycSA collection	Corn	France, 2001	105.2 ± 30.2
CBS 143.25	Centraal Bureau voor Schimmelkulturen, The Netherlands	N/A ²	N/A ² , 1926	31.3 ± 2.8

¹ Sum of enniatin A, enniatin A1, enniatin B and enniatin B1 produced by *F. avenaceum* strains after 10 days of culture in *Fusarium* defined medium [45,46]. ² N/A – Data not available.

Stock cultures were maintained at 4°C on PDA (Difco, France) slants under mineral oil. When inoculum was required, the *Fusarium* strains were grown on PDA plates at 25°C in the dark for 5 days, and spore suspensions prepared in carboxymethyl cellulose (CMC) (Sigma, France) liquid medium (15 g CMC, 1 g Yeast extract, 0.5 MgSO₄, 7 H₂O, 1 g NH₄NO₃, 1 g KH₂PO₄, for 1 L medium) and incubated in darkness at 25° C and at 180 rpm in a Multitron incubator shaker (INFORS AG, Bottmingen, Switzerland). After 3 days, the conidia were recovered using centrifugation (2300 g for 10 min), counted in a Thoma chamber and diluted with sterile water to a final concentration of 10⁴ spores mL⁻¹.

Radial growth inhibition was performed on PDA medium in Petri dishes (diameter 90 mm) inoculated at the center with ten microliters of I612 spore suspension at 10^4 spores mL^{-1} . PDA media were supplemented with CAF, FER, COUM, CHLO, SIN and SYR at two, three, four, five or six mmol l^{-1} . For each condition, plates (in triplicate) were incubated at 25°C for six days. 6-day-old plates were photographed and fungal surface areas were determined using the ImageJ software package (developed by the U.S. National Institutes of Health). Growth Inhibition Values (GIV) were expressed as the ratio [(average surface areas in the control dishes minus the average surface areas in the treated dishes) on the average surface areas in the control dishes]. For each phenolic acid, the relation $\text{GIV} = f([\text{Phenolic Acid}])$ was plotted and Inhibitory Concentration 50 (IC50) was determined by linear regression for $\text{GIV} = 50\%$.

Liquid culture experiments were performed in FDM medium [47]. Buffered FDM media were prepared using McIlvaine buffer solutions [48]. FDM and buffered FDM were supplemented or not with phenolic acids at 0.5 mM. For each condition, cultures were made in triplicate. Sterile Petri dishes (diameter 55 mm) containing 8 mL of liquid medium were inoculated with 100 μL of spore suspensions at 10^4 spores mL^{-1} . Fungal liquid cultures were incubated at 25°C in the dark for 10 days. Additional incubation times were included for the kinetic study (1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, and 15 days). After incubation, the cultures were centrifuged at 4°C and at 5000 g for 10 minutes. The supernatants were stored at -20°C until analysis. Fungal biomass was measured by weighing the mycelial pellet after 48 hours of freeze-drying (Cryotec®, France). For gene expression study at day 5, lyophilized mycelia were stored at -80°C before RNA extraction. Three replications and appropriate controls were carried out for each experimentation. For each trial, it was ensured that supplementation with phenolic acids did not modify the pH values of the treated cultures compared to controls.

5.3 Extraction and analysis of enniatins

Five milliliters of culture medium were extracted with 10 mL of ethyl acetate. Five milliliters of the organic phase were evaporated to dryness at 45°C under nitrogen flow. The dried samples were dissolved in 200 μL of methanol/water (1:1, v/v) and filtered on 0.2 μm filters before LC/DAD analysis. Quantification of A, A1, B and B1 enniatins was performed on a Shimadzu Prominence UPLC chain, equipped with two pumps LC-30 AD, a degasser DGU-20A5R, an auto sampler SIL-30 AC and a DAD detector SPD-M20A (Shimadzu Scientific Instruments, Noisiel, France). Separation was achieved on a Kinetex 2,6U XB-C18 – 100 Å column (150 x 4.6 mm; 2.6 μm) (Phenomenex, France) maintained at 45°C . The mobile phase consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The following gradient was used for elution: 30% B for 2.5 min, 30-99% B in 5 min, 99% B for 3.5 min, 99-30% B in 0.5 min, and 2.5 min post-run equilibration with initial conditions. The flow was kept at 0.7 mL min^{-1} . The injection volume was 5 μL . UV-visible spectra were recorded from 190 to 450 nm and peak areas were measured at 205 nm (2.5 – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Quantification was performed using external calibration with standard solutions.

5.4 Extraction and analysis of phenolic acids and their transformation products by I612

Phenolic acids in supernatants of I612 broths were directly analyzed by LC/DAD with a 1100 Series HPLC system (Agilent, France), following the procedure described by Gauthier et al. [18].

5.5 Extraction of total RNA, preparation of cDNA and Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 5-day-old mycelia of *F. avenaceum* I612 cultivated in pH 4 and pH 7 buffered FDM media supplemented or not with 0.5 mM FER. Three biological replicates were prepared for each condition. Frozen mycelia (50 mg) were grounded (Precellys Evolution & Cryolis) with glass beads in 350 μL of lysis buffer (NucleoMag RNA® 96 Kit, Macherey-Nagel). Total RNA (separated from the beads and cell debris) was extracted using a MagMAX™ automated system (Thermo Fischer Scientific) and the NucleoMagRNA® 96 kit including a DNase treatment following the instructions of the manufacturer. The quality of the prepared RNA was evaluated by agarose gel electrophoresis. The RNA was quantified by spectrometry (Nanodrop 1000/2000).

The absence of contamination with genomic DNA was verified by qPCR (Light cycler 2.0, Roche) on 1 μ L total RNA (20 ng) mixed with 9 μ L of reaction mix using the QuantiFast™ SYBR® Green PCR kit (Qiagen, Netherlands).

Reverse transcription was performed with the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen) according to the supplier's protocol. The cDNA samples were stored at -20 °C until their use for PCR analysis. qPCR analyses were performed with a QuantStudio5™ (ThermoFisher Scientific) using 1 μ L of cDNA (10 ng of reverse transcribed RNA) mixed with 9 μ L of reaction mix prepared using the Power Track SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). The forward and reverse primers used for the genes targeted in the study are reported in Table 5. Their final concentration in the reaction mix was 0.5 μ M. The PCR cycling conditions were set at 95°C for 20 sec, 40 x [95°C for 3 s, 60°C for 20 s]. The melting curves were acquired by heating the samples to 95°C for 1 sec, cooling to 60°C for 20 sec and then slowly increasing the temperature from 60°C to 95°C at the rate of 0.15°C s⁻¹, with a continuous measurement of the fluorescence. Amplification and melting curve data were generated and analyzed using the QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.1 (Applied Biosystems). For each gene, the efficiency was evaluated using serial dilutions of cDNA samples. The expression levels of the genes studied, normalized with the expression of the reference genes *ef1 α* (Elongation factor 1-alpha) and *rpb2* (RNA Polymerase II Gene), were determined using the Relative Expression Software Tool (REST®). Results were reported in the log2 value of the ratio treated condition with FER vs control condition.

Table 5. Targeted genes and associated primers used to amplify cDNA by real-time PCR.

Gene	Sequence forwards (5'-3')	Sequence reverse (5'-3')	Product (bp)	Accession No.
<i>kivv</i>	CGGAGACTAGACCACAGTAT	GCAAAGACGACAGAACTAC A	151	JPYM01000010.1
<i>esyn</i>	GAGTCCTCTCCCAAGTTC	AGTTGAAGACCACGAGAT	102	AF351597.2; AF351594.2; EF040582.1; Z18755.3;
<i>rpb2</i>	CCGAGGATCTCGAACTTTAC	CTTCCTCTTGTCTCTCTTCTC	105	MH582082.1; MK560856.1 MK185026.1; MK185027.1, MK572784.1
<i>ef1α</i>	ACTTCCCCTCCAGGATGTCT	GTTACCACGTCGGATGTCCT	232	JQGD01000010.1

5.6 Expression of results and statistical analyses

Results were presented as mean values $\pm$ standard deviation of three biological replications. Statistical analysis was performed with XLSTAT 2019 software (Addinsoft, Rennes, France). For all experimentations, differences between treatments were tested with a non-parametric Kruskal-Wallis test using Conover-Iman method. Level of significance was set at $P = 0.05$.

Author Contributions: Conceptualization, F.F., V.A., L.P. and S.C.; methodology, F.F., L.P. and V.A.; validation, V.A., L.P., F.F. and C.G.; formal analysis, V.A. and S.C.; investigation, C.G., C.D., M.B. and J.T.; resources, F.F., L.P., V.A., M.B. and C.D.; data curation, C.G., L.P., M.B., C.D. and V.A.; writing— original draft preparation F.F., C.G., V.A. and L.P.; writing—review and editing, F.F., V.A., S.C., L.P. and C.G.; visualization, V.A., F.F., L.P. and S.C.; supervision, F.F., L.P., V.A. and S.C.; project administration, F.F. and V.A.; funding acquisition, V.A. and F.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by INRAE (MICA department) and the Nouvelle Aquitaine Region, France (BioAXoM project, N°2017-1R20203) as part of a PhD grant.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Pitt, J.I.; Miller, J.D. A Concise History of Mycotoxin Research. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 7021–7033, doi:10.1021/acs.jafc.6b04494.
2. Yang, J.; Li, J.; Jiang, Y.; Duan, X.; Qu, H.; Yang, B.; Chen, F.; Sivakumar, D. Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and their Processed Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014, 54, 64–83, doi:10.1080/10408398.2011.569860.
3. Torres, A.M.; Palacios, S.A.; Yerkovich, N.; Palazzini, J.M.; Battilani, P.; Leslie, J.F.; Logrieco, A.F.; Chulze, S.N. *Fusarium* head blight and mycotoxins in wheat: prevention and control strategies across the food chain. *World Mycotoxin J.* 2019, 12, 333–355, doi:10.3920/WMJ2019.2438.
4. Agriopoulou, S.; Stamatelopoulou, E.; Varzakas, T. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods* 2020, 9, 137, doi:10.3390/foods9020137.
5. Van Egmond, H.P.; Schothorst, R. C.; Jonker, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 147–157.
6. Vaclavikova, M.; Malachova, A.; Veprikova, Z.; Dzuman, Z.; Zachariasova, M.; Hajslova, J. ‘Emerging’ mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chem.* 2013, 136, 750–757, doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.031.
7. Santini, A.; Meca, G.; Uhlig, S.; Ritieni, A. Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: occurrence in food – a review. *World Mycotoxin J.* 2012, 5, 71–81, doi:10.3920/WMJ2011.1331.
8. Lee, H.J.; Ryu, D. Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 7034–7051, doi:10.1021/acs.jafc.6b04847.
9. Gautier, C.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F. *Fusarium* Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing *Fusarium* Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests. *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 4788–4798, doi:10.1021/acs.jafc.0c00411.
10. Gruber-Dorninger, C.; Novak, B.; Nagl, V.; Berthiller, F. Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 7052–7070, doi:10.1021/acs.jafc.6b03413.
11. Jestoi, M. Emerging *Fusarium* -Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008, 48, 21–49, doi:10.1080/10408390601062021.
12. Fraeyman, S.; Croubels, S.; Devreese, M.; Antonissen, G. Emerging *Fusarium* and *Alternaria* Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics. *Toxins* 2017, 9, 228, doi:10.3390/toxins9070228.

13. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal* 2014, 12, 3802, doi:10.2903/j.efsa.2014.3802.
14. Khoshal, A.K.; Novak, B.; Martin, P.G.P.; Jenkins, T.; Neves, M.; Schatzmayr, G.; Oswald, I.P.; Pinton, P. Co-Occurrence of DON and Emerging Mycotoxins in Worldwide Finished Pig Feed and Their Combined Toxicity in Intestinal Cells. *Toxins* 2019, 11, 727, doi:10.3390/toxins11120727.
15. Mielniczuk, E.; Skwaryło-Bednarz, B. *Fusarium* Head Blight, Mycotoxins and Strategies for Their Reduction. *Agronomy* 2020, 10, 509, doi:10.3390/agronomy10040509.
16. Redondo-Blanco, S.; Fernández, J.; López-Ibáñez, S.; Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. Plant Phytochemicals in Food Preservation: Antifungal Bioactivity: A Review. *J. Food Prot.* 2020, 83, 163–171, doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-163.
17. Boutigny, A.-L.; Barreau, C.; Atanasova-Penichon, V.; Verdal-Bonnin, M.-N.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol. Res.* 2009, 113, 746–753, doi:10.1016/j.mycres.2009.02.010.
18. Gauthier, L.; Bonnin-Verdal, M.-N.; Marchegay, G.; Pinson-Gadais, L.; Ducos, C.; Richard-Forget, F.; Atanasova-Penichon, V. Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: New insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 221, 61–68, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.005.
19. Kulik, T.; Stuper-Szablewska, K.; Biliska, K.; Buśko, M.; Ostrowska-Kołodziejczak, A.; Załuski, D.; Perkowski, J. Sinapic Acid Affects Phenolic and Trichothecene Profiles of *F. culmorum* and *F. graminearum* Ssensu Stricto. *Toxins* 2017, 9, 264, doi:10.3390/toxins9090264.
20. Ferruz, E.; Atanasova-Pénichon, V.; Bonnín-Verdal, M.-N.; Marchegay, G.; Pinson-Gadais, L.; Ducos, C.; Lorán, S.; Ariño, A.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Effects of Phenolic Acids on the Growth and Production of T-2 and HT-2 Toxins by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides*. *Molecules* 2016, 21, 449.
21. Schöneberg, T.; Kibler, K.; Sulyok, M.; Musa, T.; Bucheli, T.D.; Mascher, F.; Bertossa, M.; Voegelé, R.T.; Vogelgsang, S. Can plant phenolic compounds reduce *Fusarium* growth and mycotoxin production in cereals? *Food Addit. Contam.* 2018, 35, 2455–2470, doi:10.1080/19440049.2018.1538570.
22. Samapundo, S.; De Meulenaer, B.; Osei-Nimoh, D.; Lamboni, Y.; Debevere, J.; Devlieghere, F. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiol.* 2007, 24, 465–473, doi:10.1016/j.fm.2006.10.003.

23. Atanasova-Penichon, V.; Bernillon, S.; Marchegay, G.; Lornac, A.; Pinson-Gadais, L.; Ponts, N.; Zehraoui, E.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Bioguided isolation, characterization, and biotransformation by *Fusarium verticillioides* of maize kernel compounds that inhibit fumonisin production. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2014, 27, 1148–1158, doi:10.1094/MPMI-04-14-0100-R.
24. Gauthier, L.; Atanasova-Penichon, V.; Chéreau, S.; Richard-Forget, F. Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol Accumulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 24839–24872, doi:10.3390/ijms161024839.
25. Atanasova-Penichon, V.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to *Fusarium* and Mycotoxin Accumulation. *Front. Microbiol.* 2016, 7, doi:10.3389/fmicb.2016.00566.
26. Hadjout, S.; Chéreau, S.; Atanasova-Pénichon, V.; Marchegay, G.; Mekliche, L.; Bouregghda, H.; Barreau, C.; Touati-Hattab, S.; Bouznad, Z.; Richard-Forget, F. Phenotypic and Biochemical Characterization of New Advanced Durum Wheat Breeding Lines from Algeria That Show Resistance to *Fusarium* Head Blight and to Mycotoxin Accumulation. *J. Plant Pathol.* 2017, doi:10.4454/jpp.v99i3.3954.
27. Anjorin, T.S.; Salako, E.A.; Makun, A.H. Control of Toxigenic Fungi and Mycotoxins with Phytochemicals: Potentials and Challenges. In *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*; Ed.; InTech, 2013, 181-202. <http://dx.doi.org/10.5772/53477>
28. Snini, S.P.; Mathieu, F. Biocontrol Agents and Natural Compounds against Mycotoxinogenic Fungi. *Toxins* 2020, 12, 353, doi:10.3390/toxins12060353.
29. Schöneberg, T.; Kibler, K.; Wettstein, F.E.; Bucheli, T.D.; Forrer, H.R.; Musa, T.; Mascher, F.; Bertossa, M.; Keller, B.; Vogelgsang, S. Influence of temperature, humidity duration and growth stage on the infection and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *Fusarium poae* in oats. *Plant Pathol.* 2019, 68, 173–184, doi:10.1111/ppa.12922.
30. Boutigny, A.L.; Atanasova-Penichon, V.; Benet, M.; Barreau, C.; Richard-Forget, F. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis *in vitro* by repressing *Tri* gene expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 2010, 127, 275–286, doi:10.1007/s10658-010-9592-2.
31. Wen, A.; Delaquis, P.; Stanich, K.; Toivonen, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol.* 2003, 20, 305–311, doi:10.1016/S0740-0020(02)00135-1.
32. Almajano, M.P.; Carbó, R.; Delgado, M.E.; Gordon, M.H. Effect of pH on the Antimicrobial Activity and Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions Containing Caffeic Acid. *J. Food Sci.* 2007, 72, C258–C263, doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00387.x.
33. Borges, A.; Ferreira, C.; Saavedra, M.J.; Simões, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microb. Drug Resist.* 2013, 19, 256–265, doi:10.1089/mdr.2012.0244.

34. Tsujiyama, S-I.; Ueno, M. Formation of 4-Vinyl Guaiacol as an Intermediate in Bioconversion of Ferulic Acid by *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, 72, 212–215, doi:10.1271/bbb.60606.
35. Falconnier, B.; Lapierre, C.; Lesage-Meessen, L.; Yonnet, G.; Brunerie, P.; Colonna-Ceccaldi, B.; Corrieu, G.; Asther, M. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways. *J. Biotechnol.* 1994, 37, 123–132, doi:10.1016/0168-1656(94)90003-5.
36. Motedayen, N.; Maznah, B.T.I.; Forough, N. Bioconversion of ferulic acid to vanillin by combined action of *Aspergillus niger* K8 and *Phanerochaete crysosporium* ATCC 24725. *Afr. J. Biotechnol.* 2013, 12, 6618–6624, doi:10.5897/AJB2013.12416.
37. Okai, N.; Masuda, T.; Takeshima, Y.; Tanaka, K.; Yoshida, K.; Miyamoto, M.; Ogino, C.; Kondo, A. Biotransformation of ferulic acid to protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21420 engineered to express vanillate O-demethylase. *AMB Express* 2017, 7, 130, doi:10.1186/s13568-017-0427-9.
38. Venkatesagowda, B. Enzymatic Kraft lignin demethylation and fungal O-demethylases like vanillate-O-demethylase and syringate O-demethylase catalyzed catechol-Fe³⁺ complexation method. *J. Microbiol. Meth.* 2018, 152, 126–134, doi:10.1016/j.mimet.2018.07.021.
39. Liang, D.; Xing, F.; Selvaraj, J.N.; Liu, X.; Wang, L.; Hua, H.; Zhou, L.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Liu, Y. Inhibitory Effect of Cinnamaldehyde, Citral, and Eugenol on Aflatoxin Biosynthetic Gene Expression and Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *J. Food Sci.* 2015, 80, M2917–M2924, doi:10.1111/1750-3841.13144.
40. Wang, L.; Jin, J.; Liu, X.; Wang, Y.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Xing, F. Effect of Cinnamaldehyde on Morphological Alterations of *Aspergillus ochraceus* and Expression of Key Genes Involved in Ochratoxin A Biosynthesis. *Toxins* 2018, 10, 340, doi:10.3390/toxins10090340.
41. Montibus, M.; Pinson-Gadais, L.; Richard-Forget, F.; Barreau, C.; Ponts, N. Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Crit. rev. Microbiol.* 2015, 41, 295–308, doi:10.3109/1040841x.2013.829416.
42. Gil-Serna, J.; Vázquez, C.; Patiño, B. Genetic regulation of aflatoxin, ochratoxin A, trichothecene, and fumonisin biosynthesis: A review. *Int. Microbiol.* 2020, 23, 89–96, doi:10.1007/s10123-019-00084-2.
43. Montibus, M.; Ducos, C.; Bonnin-Verdal, M.N.; Bormann, J.; Ponts, N.; Richard-Forget, F.; Barreau, C. The bZIP Transcription Factor Fgap1 Mediates Oxidative Stress Response and Trichothecene Biosynthesis But Not Virulence in *Fusarium graminearum*. *Plos One* 2013, 8, doi:10.1371/journal.pone.0083377.
44. Reverberi, M.; Gazzetti, K.; Punelli, F.; Scarpari, M.; Zjalic, S.; Ricelli, A.; Fabbri, A.A.; Fanelli, C. Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 95, 1293–1304, doi:10.1007/s00253-012-3985-4.

45. Turner, A.S.; Lees, A.K.; Rezanoor, H.N.; Nicholson, P. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathol.* 1998, 47, 278–288, doi:10.1046/j.1365-3059.1998.00250.x.
46. Elbelt, S.; Siou, D.; Gelisse, S.; Cruaud, C.; Lannou, C.; Lebrun, M-H.; Laval, V. Optimized real time QPCR assays for detection and quantification of *Fusarium* and *Microdochium* species involved in wheat head blight as defined by MIQE guidelines. *J. Mol. Biol.* 2018, 272534, doi:10.1101/272534.
47. Fanelli, F.; Ferracane, R.; Ritieni, A.; Logrieco, A.F.; Mulè, G. Transcriptional regulation of enniatins production by *Fusarium avenaceum*. *J. Appl. Microbiol.* 2014, 116, 390–399, doi:10.1111/jam.12371.
48. McIlvaine, T.C., A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 1921, 49, 183-186, <http://www.jbc.org/content/49/1/183.citation>



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Discussion et perspectives

Discussion et Perspectives

F. avenaceum est un des acteurs de la fusariose de l'épi (FHB) aux côtés d'autres espèces telles que *F. graminearum*, *F. culmorum* ou encore *F. poae* (Köhl et al., 2007). Au cours de l'infection et de son développement, *F. avenaceum* peut produire des mycotoxines émergentes dont les enniatines qui s'accumulent dans les grains. Ce champignon phytopathogène ainsi que ses toxines sont présentes dans des zones géographiques étendues (Canada, Danemark, France, Espagne, Cameroun, Australie...) et sur une large gamme d'hôtes incluant les céréales mais aussi d'autres cultures végétales (carotte, asperge, pomme de terre, pomme, noix...) (Song et al., 2008; Sørensen et al., 2009; Abia et al., 2013; Stępień et al., 2016; Le Moullec-Rieu et al., 2020). Les enniatines ne sont pas réglementées par l'EFSA : bien que les propriétés toxiques de ces molécules ont été largement documentées par des études *in vitro*, le peu d'informations issues d'études *in vivo* ne permet pas une évaluation précise du risque (EFSA, 2014). L'existence d'une toxicité chronique pour les consommateurs ne peut cependant être écartée. La question de la co-occurrence des enniatines avec d'autres mycotoxines (beauvericine, zéaralénone, trichothécènes) et la possibilité d'effets toxiques synergiques est une autre source de préoccupation (Smith et al., 2016; Stanciu et al., 2017).

L'étude bibliographique présentée en début de ce manuscrit a montré que les connaissances parcellaires sur le champignon *F. avenaceum* et la production d'enniatiens constituaient un frein à la mise en place de stratégies de prévention. Plusieurs points critiques dans cette absence de connaissances ont été identifiés et ont été résumés en Figure 13 du chapitre « Projet de thèse ». Ils concernaient (1) la caractérisation de la diversité intraspécifique, (2) les facteurs et mécanismes de régulation de la biosynthèse d'enniatiens, et d'autre part, (3) la recherche de solutions durables pour limiter l'accumulation d'enniatiens dans les productions végétales.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse était d'apporter des éléments de réponses aux questions évoquées précédemment. Ce travail a conduit aux résultats majeurs reportés en Figure 1 de ce chapitre. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives de recherches, qui seront exposées en suivant.

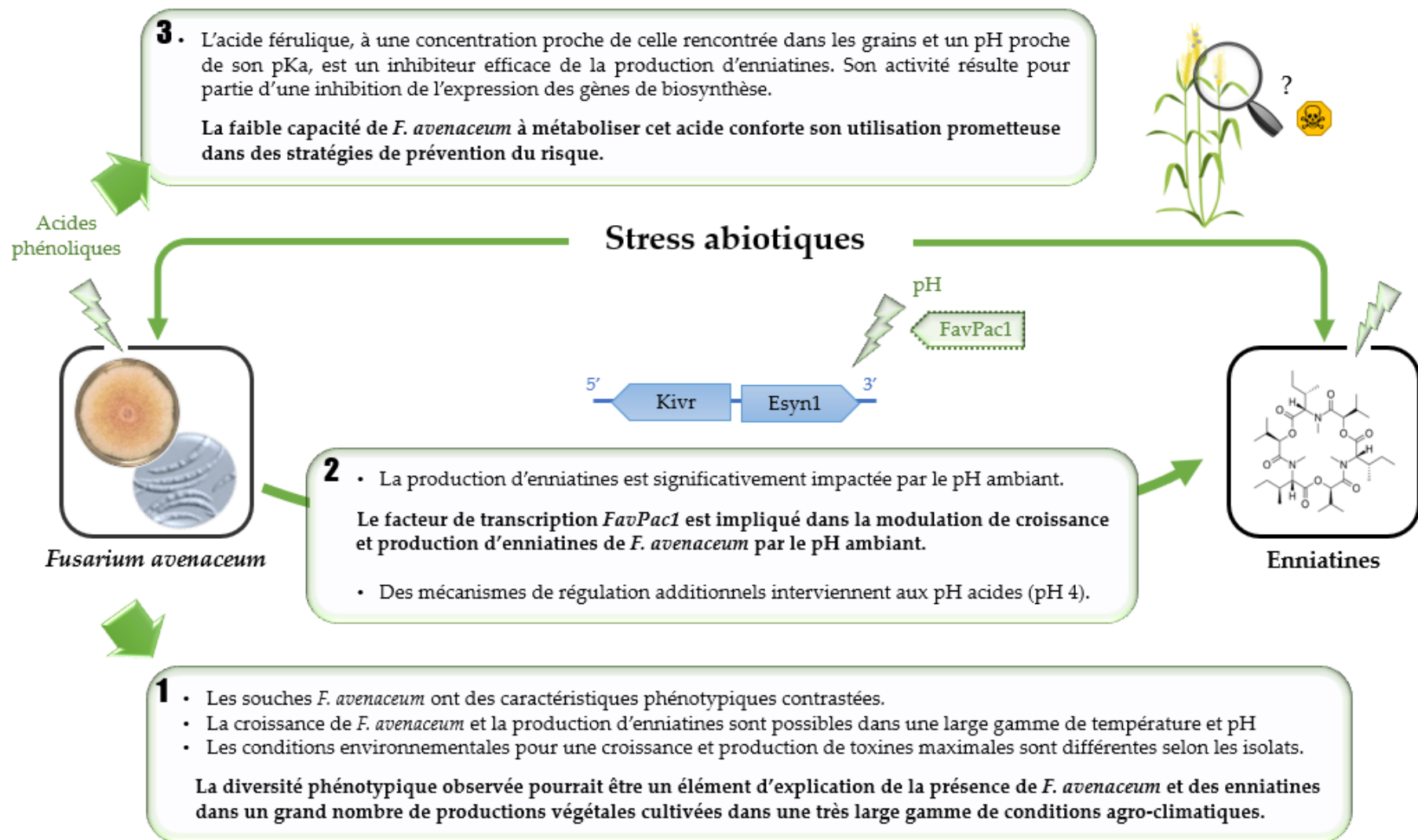


Figure 1: Récapitulatif des résultats obtenus au cours de cette thèse.

I. L'existence d'une diversité phénotypique importante chez *F. avenaceum* pourrait être un élément d'explication de sa présence très large et de la fréquence des événements de contamination par les enniatines

Les résultats de notre étude ont montré qu'il existait des caractéristiques phénotypiques contrastées entre les souches de *F. avenaceum*. En effet, au sein d'un panel de souches isolées de céréales, nous avons observé des différences importantes de capacité à se développer et à produire des toxines dans des conditions favorables à la croissance et toxinogénèse. Des différences ont aussi été observées dans les préférences des souches pour une température ou un pH testé(e) aussi bien en terme de croissance que de production d'enniatiens. Nos résultats ont montré que les variations de températures ou de pH n'affectaient pas drastiquement le comportement des souches et que la croissance et la toxinogénèse de *F. avenaceum* étaient possibles dans une large gamme de conditions environnementales. L'ensemble de ces données a suggéré une remarquable plasticité phénotypique de l'espèce *F. avenaceum*. A notre connaissance, cette étude est la première à avoir mis en évidence une telle plasticité et diversité phénotypique au sein de cette espèce impliquée dans la fusariose des céréales.

Une des limites de notre étude reposait cependant sur la taille et origine du set d'isolats considérés. Il sera important de poursuivre ce travail avec un nombre plus important de souches isolées de céréales (blé, maïs, orge, avoine...) cultivées dans différentes conditions agro-climatiques et sur plusieurs années. L'introduction de souches isolées d'autres végétaux (fruits et légumes, plantes ornementales) pourrait aussi apporter des éléments de réponse sur l'existence de différences de phénotypes et variations de phénotypes selon l'hôte d'isolement.

De nouvelles conditions de culture peuvent être envisagées à court terme pour une meilleure compréhension de la physiologie du champignon *F. avenaceum*. Ainsi une suite directe de notre travail serait de poursuivre le phénotypage sur notre panel de souches élargi avec l'étude de l'effet d'autres paramètres (seul et en combinaison) sur la croissance et la toxinogénèse : disponibilité en eau (a_w), concentration en CO₂, variation des sources de carbone et d'azote, lumière ou encore stress oxydant. Les connaissances ainsi acquises permettront de préciser les conditions les plus favorables au développement de *F. avenaceum* et à la production d'enniatiens, et ainsi d'identifier les situations à risque ; ce qui est indispensable pour définir des stratégies de prévention de la contamination des productions végétales. A plus long terme, il sera aussi important de prendre en considération les interactions entre *F. avenaceum* et les autres espèces responsables de la fusariose de l'épi (*F. graminearum* en particulier).

Ces interactions peuvent être déterminantes et moduler le développement d'une espèce fongique ainsi que sa production de toxines (Ferrigo et al., 2016).

L'origine des différences phénotypiques entre les isolats de *F. avenaceum* peut être de différente nature. Les variations observées pourraient être liées à une diversité génétique. Plusieurs études ont suggéré l'existence de variations génétiques au sein de cette espèce (Yli-Mattila et al., 2002; Feng et al., 2010; Kulik et al., 2011). Il a aussi été rapporté que les isolats de *Lisianthus* n'étaient pas phylogénétiquement distincts de ceux d'autres hôtes (gazon, osier, pomme de terre, orge...) cultivés dans différentes localités (Japon, Californie, Iran, Finlande...) (Nalim et al., 2009). Ce travail de doctorat a aussi contribué à l'obtention des séquences génomiques pour l'ensemble des souches étudiées et se poursuivra par une approche de génomique comparative. Entre autres analyses, l'étude des clusters de biosynthèse de métabolites secondaires pourra permettre d'apporter des précisions sur la capacité des isolats à produire différents pigments (des différences de couleur des mycélia ont été observées) ou différentes formes d'enniatines (les proportions d'enniatines A, A1, B et B1 variaient selon les isolats). L'origine de cette diversité phénotypique peut être aussi non génétique. Dans cette hypothèse, ce sont les mécanismes de régulation épigénétique qui sont le plus souvent évoqués.

L'ensemble de ces données permettra sur le long terme de prédire et anticiper la présence de *F. avenaceum* et de ses enniatines en fonction des conditions agro-climatiques. Une meilleure caractérisation de cette espèce est en effet essentielle pour anticiper l'évolution du risque d'infection et de contamination par les enniatines consécutivement aux changements climatiques.

II. Le pH ambiant régule la croissance et la production de toxines, cette modulation est pour partie contrôlée par *FavPac1*

Nos résultats ont montré que les isolats de *F. avenaceum* étaient capables de se développer et de produire des toxines sur une large gamme de pH (de 4 à 7). Ils ont aussi indiqué trois profils différents de réponse aux variations de pH en ce qui concerne la production d'enniatines (production maximale aux pH 4-5, production maximale aux pH 6-7, production non affectée par les variations de pH). L'effet du pH ambiant sur la croissance de *F. avenaceum* et la production d'enniatines n'avait jamais été décrit auparavant, les études publiées s'étant concentrées sur les mycotoxines dites majeures.

Chez de nombreux champignons filamenteux et levures, la littérature rapporte l'existence d'un facteur de transcription orthologue au facteur PacC/Rim101p caractérisé chez *A. nidulans* comme jouant un rôle dans la régulation par le pH (Peñalva and Arst, 2002). Le champignon perçoit les variations de pH extracellulaire (voie des *Pal*) et une transduction du signal est assurée pour activer ce facteur de transcription.

Il régule l'expression de deux familles de gènes, les gènes activés dit « gènes neutres-alcalins » et les gènes réprimés dit « gènes acides ». Nous avons identifié un orthologue potentiel du facteur de transcription PacC/Rim101p que nous avons appelé FavPac1. Afin d'étudier son mode d'action, nous avons entrepris la construction de mutants KO pour le gène *FavPac1* dans différents fonds génétiques.

Le facteur de transcription PacC d'*A. nidulans* se trouve sous une forme complète non-mature à pH acide alors que, à pH basique, il est mûr suite à deux étapes protéolytiques qui éliminent une partie de la protéine du côté C-terminal. Chez *F. graminearum*, la production de trichothécènes est exclusivement observée à pH acide (Merhej et al., 2010). La construction d'une souche modifiée exprimant constitutivement une version tronquée et active de *FgPac1* (*FgPac1^c*) a été entreprise par Merhej *et al.*, générant ainsi une protéine mature et active. Chez cette souche contenant *FgPac1^c*, l'expression des gènes *Tri* et la production de toxines sont réprimées à pH acide (Merhej et al., 2011).

Fort de ces résultats, nous souhaitons étudier le mode d'action de *FavPac1* chez *F. avenaceum*. Si l'on suppose qu'*esyn1* est un gène acide, son expression ainsi que la production de toxines devraient être induites à pH neutre-basique chez les mutants KO *FavΔPac1*. Si par contre, *esyn1* est un gène neutre-alcalin, la délétion de *FavPac1* devait empêcher l'activation de l'expression du gène *esyn1*, et la souche *FavΔPac1* ne serait donc pas capable de produire des enniatines à pH neutre-basique.

Nos premières observations ont mis en évidence une augmentation de pH dans les cultures *in vitro* et une expression des gènes *esyn1* et *kivr* à des pH compris entre 4,5 et 6,5 (« Préambule »). De plus, nos résultats ont démontré que la production de toxines était fortement réduite à pH neutre (pH 7) chez tous les mutants *FavΔPac1*. Ces résultats montrent que *FavPac1* est impliqué dans la modulation de la production d'enniatines sous l'effet du pH ambiant et suggèrent que le gène *esyn1* pourrait être un « gène neutre-alcalin ». A pH acide, la délétion n'a soit pas eu d'effet sur deux des mutants, soit elle a augmenté fortement la production d'enniatines pour les deux autres mutants *FavΔPac1*. Cette observation ainsi que l'existence d'une production d'enniatines pour une large gamme de pH indique l'existence d'autres acteurs que FavPac1 impliqués dans la modulation de cette voie de biosynthèse sous l'effet du pH.

L'expression de PacC est induite par un pH extracellulaire alcalin et il contient dans son promoteur des séquences consensus spécifiques à sa fixation. Ainsi, il est lui-même considéré comme un gène alcalin et un facteur de transcription qui autorégule son expression (Tilburn et al., 1995).

La recherche de cette séquence dans le promoteur du gène *esyn1* n'a pas permis l'identification de cette séquence spécifique bien que huit séquences aient été repérées en amont (< 1-kb) de *FavPac1*. Nous pourrions utiliser la technique de la précipitation de la chromatine avec un anticorps anti-*FavPac1* (ChIP-seq) pour identifier les promoteurs sur lesquels le facteur de transcription pourrait se fixer. Egalement une approche RNA-Seq pourrait permettre d'identifier les candidat(s) responsable(s) de l'augmentation de la production d'enniatines chez les souches sauvages lorsque *FavPac1* est inactif à pH acide ou actif à pH neutre-basique. Cette analyse transcriptomique permettrait aussi de mettre en évidence les différences de réponse du champignon vis-à-vis du pH (mécanismes de signalisation, voie métabolique...) selon les isolats.

La régulation de la production de métabolites secondaires médiée par le facteur de transcription PacC n'est qu'une des nombreuses voies potentielles de régulation. La régulation du métabolisme secondaire des champignons est complexe et opère à différents niveaux incluant la régulation par des facteurs de transcription spécifique, la régulation par des facteurs de transcription globaux et une régulation épigénétique...(Macheleidt et al., 2016). Pour aller plus loin dans nos travaux de recherche, il serait intéressant d'investiguer ces autres voies. Le rôle des régulateurs globaux liés à l'effet de la lumière, stress oxydant, sources de carbone/d'azote devra être étudié (Figure 7 de l'Introduction). A notre connaissance, l'existence de régulateurs spécifiques (tels Tri6 et Tri10 pour la production de trichothécènes) n'a pas été décrite en ce qui concerne la biosynthèse d'enniatines. De même, l'existence d'un cluster de gènes impliqué dans la synthèse de ces toxines n'est pas connue, alors que de tels clusters ont été caractérisés pour un grand nombre de métabolites secondaires. Un cluster de gènes associé à la biosynthèse de la beauvericine a été putativement identifié chez une espèce marine de *F. proliferatum* (Zhang et al., 2013). Cette mycotoxine émergente est un analogue cyclohexadepsipeptidique de l'enniatine. Dans l'article de (Zhang et al., 2013), un groupe de treize ORF (Open Reading Frame) liés à la synthèse de la beauvericine et situé sur un seul et même contig est reporté. Ces ORFs coderaient, entre autres, pour la beauvericine synthétase putative (*FpBeas*), un transporteur multidrogue de la famille ABC, une métalloprotéase, une thioestérase, une kétoisovalérate réductase (*kivr*).

Il est alors logique de penser qu'un tel cluster pourrait être présent chez *F. avenaceum*. Pourtant les données génomiques disponibles associées à *F. avenaceum* n'ont pas permis de mettre en évidence l'existence de ce cluster (Lysøe et al., 2014).

III. Les acides phénoliques, inhibiteurs efficaces de la production d'enniatiines à pH acide

Les propriétés antifongiques et « anti-mycotoxines » des acides phénoliques ont été largement décrites dans la littérature vis-à-vis de différents champignons toxigènes (Anjorin et al., 2013; Atanasova-Penichon et al., 2016). Nos résultats sont les premiers à avoir démontré le potentiel des acides hydroxycinnamiques à inhiber la croissance de *F. avenaceum* et la production d'enniatiines. La plus forte activité a été observée pour l'acide férulique, en accord avec les données obtenues vis à vis d'autres *Fusarium spp.* (Boutigny et al., 2010; Ferruz et al., 2016). Rappelons ici que l'acide férulique est l'acide phénolique présent en plus grandes concentrations dans les grains de céréales. La concentration de 0,5 mM testée dans notre étude est proche des concentrations physiologiques observées dans les grains de blé (Hadjout et al., 2017).

Nos résultats ont aussi montré l'importance des conditions de pH dans le pouvoir inhibiteur des acides phénoliques. En effet une inhibition nettement supérieure a été observée dans les milieux tamponnés à pH 4, c'est-à-dire pour des conditions de pH proches des valeurs de pKa (autour de 4-4,5) des acides phénoliques considérés. Ce résultat peut s'expliquer par la plus forte lipophilicité des formes non-dissociées qui sont ainsi plus susceptibles de pénétrer la membrane et d'induire des perturbations (déséquilibre ionique, perte d'hydrophobicité...) (Borges et al., 2013). Cette hypothèse a été corroborée par nos résultats qui ont mis en évidence une disparition plus rapide de l'acide férulique dans les milieux de culture à pH 4 comparativement à pH 7 et qui ont indiqué que, même si *F. avenaceum* était capable de métaboliser l'acide férulique (en acide vanillique et protocatéchique), cette capacité de métabolisation semblait très modérée. Nous avons aussi montré que l'inhibition de la production d'enniatiines était accompagnée d'une diminution remarquable de l'expression des gènes de biosynthèse (*esyn1* et *kivr*). Les facteurs de régulation quantifiés étaient nettement supérieures à ceux observées pour les gènes de biosynthèse des trichothécènes A et B (Ferruz et al., 2016).

Des études antérieures, utilisant de l'acide férulique marqué, ont montré la capacité de cet acide à pénétrer la membrane plasmique chez *F. graminearum* (Bily et al., 2003). Pour poursuivre notre étude, il serait intéressant de quantifier ce composé dans le mycélium mais aussi d'étudier les changements potentiels qu'il induit sur la structure membranaire fongique en utilisant, par exemple, la microscopie électronique à transmission (MET) (Alconada Magliano and Kikot, 2010; Wei et al., 2020).

Les propriétés antioxydantes des acides phénoliques sont fortement suspectées jouer un rôle dans leur effet modulateur de la mycotoxinogénèse (Atanasova-Penichon et al., 2016). Il est en effet connu qu'un stress oxydant est un facteur activateur de la biosynthèse de différentes mycotoxines (Montibus et al., 2013). Cependant, l'effet du stress oxydant sur la production d'enniatines n'a jamais été décrit jusqu'à présent. Chez *F. graminearum*, le rôle du facteur de transcription FgAP1 dans la modulation de la production de trichothécènes en présence de peroxyde d'hydrogène a été démontré (Montibus et al., 2013). Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la production d'enniatines par l'acide férulique, la suite logique de ces travaux serait : 1) de tester l'effet d'un stress peroxyde sur la production de ces toxines, 2) d'analyser l'effet de l'acide férulique sur l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydant chez *F. avenaceum*, 3) d'analyser si des souches affectées pour leur réponse au stress oxydant sont plus ou moins sensibles à l'acide férulique.

Actuellement, l'utilisation de variétés résistantes à l'accumulation de mycotoxines constitue une des voies préférentielles pour limiter la contamination des céréales par les toxines de *Fusarium*. Nos résultats pourraient suggérer que des variétés riches en acide férulique sont moins sensibles à l'infection par *F. avenaceum* et à la contamination en enniatines. Cette piste demande à être confirmée avec par exemple l'étude de la relation entre concentrations en acide férulique et résistance. L'acide férulique pourrait être ainsi un biomarqueur de résistance à l'infection par *F. avenaceum* et être très utile dans les programmes de phénotypage de variétés. L'acide férulique a aussi été décrit comme impliqué dans la résistance à *F. graminearum* de par son rôle dans la fortification des parois végétales, sa capacité à piéger les radicaux libres et son activité antifongique (Gauthier et al., 2015). De plus, la forte bioactivité de l'acide férulique en fait une molécule naturelle prometteuse pour une formulation de biofongicide.

IV. Bibliographie

- Abia, W.A., Warth, B., Sulyok, M., Krska, R., Tchana, A.N., Njobeh, P.B., Dutton, M.F., and Moundipa, P.F. (2013). Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control* 31, 438–453.
- Alconada Magliano, T.M., and Kikot, G.E. (2010). Microscopy techniques to analyse plant-pathogen interaction: *Fusarium graminearum* as pathogen of wheat. (Microscopy: Science, Technology, Applications and Education).
- Anjorin, T.S., Salako, E.A., and Makun, A.H. (2013). Control of Toxigenic Fungi and Mycotoxins with Phytochemicals: Potentials and Challenges. In *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*, (InTech), pp. 181–202.
- Atanasova-Penichon, V., Barreau, C., and Richard-Forget, F. (2016). Antioxidant Secondary Metabolites in Cereals: Potential Involvement in Resistance to *Fusarium* and Mycotoxin Accumulation. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–16.
- 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., et al. (2003). Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93, 712–719.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M.J., and Simões, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance* 19, 256–265.
- Boutigny, A.-L., Atanasova-Pénichon, V., Benet, M., Barreau, C., and Richard-Forget, F. (2010). Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis *in vitro* by repressing *Tri* gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 127, 275–286.
- EFSA (2014). Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal* 12, 174.
- Feng, J., Hwang, R., Chang, K.F., Hwang, S.F., Strelkov, S.E., Gossen, B.D., Conner, R.L., and Turnbull, G.D. (2010). Genetic variation in *Fusarium avenaceum* causing root rot on field pea. *Plant Pathology* 59, 845–852.
- Ferrigo, D., Raiola, A., and Causin, R. (2016). *Fusarium* Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules* 21, 627.
- Ferruz, E., Atanasova-Pénichon, V., Bonnin-Verdal, M., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., Lorán, S., Ariño, A., Barreau, C., and Richard-Forget, F. (2016). Effects of Phenolic Acids on the Growth and Production of T-2 and HT-2 Toxins by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides*. *Molecules* 21, 1–11.
- Gauthier, L., Atanasova-Penichon, V., Chéreau, S., and Richard-Forget, F. (2015). Metabolomics to Decipher the Chemical Defense of Cereals against *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol Accumulation. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 24839–24872.

- Hadjout, S., Chéreau, S., Atanasova-Pénichon, V., Marchegay, G., Mekliche, L., Bouregghda, H., Barreau, C., Touati-Hattab, S., Bouznad, Z., and Richard-Forget, F. (2017). Phenotypic and biochemical characterization of new advanced durum wheat breeding lines from Algeria that show resistance to *Fusarium* Head Blight and to mycotoxin accumulation. *Journal of Plant Pathology* 99, 671–680.
- Köhl, J., de Haas, B.H., Kastelein, P., Burgers, S.L.G.E., and Waalwijk, C. (2007). Population Dynamics of *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* in Crops and Crop Residues of Winter Wheat. *Phytopathology* 97, 971–978.
- Kulik, T., Pszczółkowska, A., and Lojko, M. (2011). Multilocus Phylogenetics Show High Intraspecific Variability within *Fusarium avenaceum*. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 5626–5640.
- Le Moullec-Rieu, T., Chateau, C., Pascouau, C., Bastide, F., Hamon, B., Poupard, P., Laurent, E., Gombert, J., Morel, E., Sérandat, I., et al. (2020). First Report of Root and Collar Rot Caused by *Fusarium tricinctum* and *Fusarium avenaceum* on Carrot in France. *Plant Disease* 104, 591–591.
- Lysøe, E., Harris, L.J., Walkowiak, S., Subramaniam, R., Divon, H.H., Riiser, E.S., Llorens, C., Gabaldón, T., Kistler, H.C., Jonkers, W., et al. (2014). The Genome of the Generalist Plant Pathogen *Fusarium avenaceum* Is Enriched with Genes Involved in Redox, Signaling and Secondary Metabolism. *Plos One* 9, 1–17.
- Macheleidt, J., Mattern, D.J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., and Brakhage, A.A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics* 50, 371–392.
- Merhej, J., Boutigny, A.-L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2010). An Acidic pH is a determinant factor for TRI genes expression and trichothecenes B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives and Contaminants* 27, 710–717.
- Merhej, J., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2011). Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 519–528.
- Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M.-N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2013). The bZIP Transcription Factor Fgap1 Mediates Oxidative Stress Response and Trichothecene Biosynthesis But Not Virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 8, 1–12.
- Nalim, F.A., Elmer, W.H., McGovern, R.J., and Geiser, D.M. (2009). Multilocus Phylogenetic Diversity of *Fusarium avenaceum* Pathogenic on *Lisianthus*. *Phytopathology* 99, 462–468.
- Peñalva, M.A., and Arst, H.N. (2002). Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 426–446.
- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E., and Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their *in vitro* Combined Toxicological Effects. *Toxins* 8, 36.

Song, H.-H., Lee, H.-S., Jeong, J.-H., Park, H.-S., and Lee, C. (2008). Diversity in Beauvericin and Enniatins H, I, and MK1688 by *Fusarium oxysporum* isolated from potato. *International Journal of Food Microbiology* 122, 296–301.

Sørensen, J.L., Phipps, R.K., Nielsen, K.F., Schroers, H.-J., Frank, J., and Thrane, U. (2009). Analysis of *Fusarium avenaceum* Metabolites Produced during Wet Apple Core Rot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1632–1639.

Stanciu, O., Juan, C., Miere, D., Loghin, F., and Mañes, J. (2017). Presence of Enniatins and Beauvericin in Romanian Wheat Samples: From Raw Material to Products for Direct Human Consumption. *Toxins* 9, 189.

Stępień, Ł., Waśkiewicz, A., and Urbaniak, M. (2016). Wildly Growing Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Hosts Pathogenic *Fusarium* Species and Accumulates Their Mycotoxins. *Microbial Ecology* 71, 927–937.

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., and Arst, H.N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal* 14, 779–790.

Wei, H., Wang, Y., Jin, Z., Yang, F., Hu, J., and Gao, M.-T. (2020). Utilization of straw-based phenolic acids as a biofugicide for a green agricultural production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1–8.

Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Bulat, S.A., Alekhina, I.A., and Nirenberg, H.I. (2002). Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex – a polyphasic approach. *Mycological Research* 106, 655–669.

Zhang, T., Zhuo, Y., Jia, X., Liu, J., Gao, H., Song, F., Liu, M., and Zhang, L. (2013). Cloning and characterization of the gene cluster required for beauvericin biosynthesis in *Fusarium proliferatum*. *Science China Life Sciences* 56, 628–637.

Conclusion

Conclusion

Ces travaux de thèse se sont concentrés sur les facteurs et les événements pouvant affecter la biosynthèse des enniatines par le champignon *F. avenaceum* et en conséquence, les niveaux de contamination des récoltes. Ils ont démontré que les souches de *F. avenaceum* présentent un niveau de diversité phénotypique important ce qui pourrait expliquer l'omniprésence de cette espèce. De plus, *F. avenaceum* peut être qualifié de versatile en raison de son aptitude à se développer et à produire des enniatines dans différentes conditions de stress abiotiques. Notre étude a soulevé de nombreuses questions sur la compréhension des mécanismes qui régulent l'accumulation des toxines dans les grains, étape essentielle pour l'optimisation de stratégie de contrôle du risque mycotoxique chez les céréales.

Même s'ils demandent à être complétés, les résultats importants obtenus au cours de ce projet de thèse apportent des éléments de réponses pour combler le manque de connaissances sur l'espèce *F. avenaceum*. Leur contribution à l'élaboration de plusieurs leviers pour des stratégies de prévention pourrait être envisagée. Le premier levier serait l'intégration des données dans des modèles de prédiction du risque basés sur les conditions météorologiques et/ou les pratiques culturales pour anticiper le risque de contamination par des enniatines et définir des outils d'aide à la décision. Le second correspond à leur exploitation dans la recherche de variétés de céréales résistantes au FHB qui est décrite comme une solution prometteuse et qui respecte les engagements environnementaux (Terzi et al., 2014). Enfin, le troisième levier est associé à la recherche de nouvelles solutions de biocontrôle (produits biologiques, microorganismes antagonistes du FHB...).

Il ne faut cependant pas oublier que *F. avenaceum* n'est qu'un des acteurs de la fusariose et que son développement est fortement impacté par la présence d'autres espèces fongiques du genre *Fusarium* et autres genres, par les communautés microbiennes des épis, par l'interaction avec la plante hôte ; l'ensemble de ces interactions étant sous la dépendance des conditions agro-climatiques. Il sera essentiel de repositionner nos études dans leur contexte environnemental et de prendre en compte les nombreux facteurs qui participent à ces interactions pour, à long terme, mieux gérer et anticiper la contamination des céréales par les enniatines.

I. Bibliographie

Terzi, V., Tumino, G., Stanca, A.M., and Morcia, C. (2014). Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science* 59, 284–293.

Annexes

I. Composition des milieux de culture

CM - Culture de *Fusarium* sur milieu solide (Leach et al., 1982)

Agar	20 g/L
D-Glucose	10 g/L
Extrait de levure	1 g/L
Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	1 g/L
KH ₂ PO ₄	200 mg/L
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	250 mg/L
NaCl	100 mg/L
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	5 mg/L
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6 H ₂ O	1 mg/L
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	250 µg/L
MnSO ₄ , H ₂ O	50 µg/L
H ₃ BO ₃	50 µg/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	50 µg/L
Chloroforme	2.10 ⁻⁴ % (v/v)

CMC – Production de spores de *Fusarium* en milieu liquide (Cappellini and Peterson, 1965)

Carboxyméthylcellulose	15 g/L
Extrait de levure	1 g/L
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 mg/L
NH ₄ NO ₃	1 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L

FDM - Culture de *Fusarium* en milieu liquide (Fanelli et al., 2013)

Glucose	12, 5 g/L
NaNO ₃	4,25 g/L
NaCl	5 g/L
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	2,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,36 g/L
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,01 g/L
ZnSO ₄	0,0029 g/L

PDA - Culture de *Fusarium* en milieu solide (Difco™, France)

Fécule de pomme de terre	4g/L
Dextrose	20 g/L
Agar	15 g/L

II. Article:” Evolution of *Fusarium tricinctum* and *Fusarium avenaceum* mitochondrial genomes is driven by mobility of introns and of a new type of palindromic microsatellite repeats” Ponts et al., 2020

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Evolution of *Fusarium tricinctum* and *Fusarium avenaceum* mitochondrial genomes is driven by mobility of introns and of a new type of palindromic microsatellite repeats

Nadia Ponts¹, Charlotte Gautier¹, Jérôme Gouzy², Laetitia Pinson-Gadais¹, Marie Foulongne-Oriol¹, Christine Ducos¹, Florence Richard-Forget¹, Jean-Michel Savoie¹, Chen Zhao³ and Gérard Barroso^{1,4*} 

Abstract

Background: Increased contamination of European and Asian wheat and barley crops with “emerging” mycotoxins such as enniatins or beauvericin, produced by *Fusarium avenaceum* and *Fusarium tricinctum*, suggest that these phylogenetically close species could be involved in future food-safety crises.

Results: The mitochondrial genomes of *F. tricinctum* strain INRA104 and *F. avenaceum* strain FaLH27 have been annotated. A comparative analysis was carried out then extended to a set of 25 wild strains. Results show that they constitute two distinct species, easily distinguished by their mitochondrial sequences. The mitochondrial genetic variability is mainly located within the intergenic regions. Marks of variations show they have evolved (i) by Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), (ii) by length variations mediated by insertion/deletion sequences (Indels), and (iii) by length mutations generated by DNA sliding events occurring in mononucleotide (A)_n or (T)_n microsatellite type sequences arranged in a peculiar palindromic organization. The optionality of these palindromes between both species argues for their mobility. The presence of Indels and SNPs in palindrome neighbouring regions suggests their involvement in these observed variations. Moreover, the intraspecific and interspecific variations in the presence/absence of group I introns suggest a high mobility, resulting from several events of gain and loss during short evolution periods. Phylogenetic analyses of intron orthologous sequences suggest that most introns could have originated from lateral transfers from phylogenetically close or distant species belonging to various Ascomycota genera and even to the Basidiomycota fungal division.

(Continued on next page)

* Correspondence: gerard.barroso@u-bordeaux.fr

¹INRAE, MycSA, F-33882 Villenave d'Ornon, France

⁴University of Bordeaux, INRAE, MycSA, F-33882 Villenave d'Ornon, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

Conclusions: Mitochondrial genome evolution between *F. tricinctum* and *F. avenaceum* is mostly driven by two types of mobile genetic elements, implicated in genome polymorphism. The first one is represented by group I introns. Indeed, both genomes harbour optional (inter- or intra-specifically) group I introns, all carrying putatively functional *hegs*, arguing for a high mobility of these introns during short evolution periods. The gain events were shown to involve, for most of them, lateral transfers between phylogenetically distant species. This study has also revealed a new type of mobile genetic element constituted by a palindromic arrangement of (A) n and (T) n microsatellite sequences whose presence was related to occurrence of SNPs and Indels in the neighbouring regions.

Keywords: Group I intron, Homing endonuclease, Lateral transfer, Palindrome, *Fusarium tricinctum* species complex

Background

Fusarium Head Blight (FHB) is a fungal disease of cereals caused by infection of grains by various (up to 15) *Fusarium* species [1]. Among these *Fusarium* species, five are commonly associated in cereal crops grown in Europe: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium tricinctum* and *Fusarium poae* [2]. These five species are all able to produce mycotoxins that accumulate in grains and contaminate processed food and feed products, representing both a health risk and an important economic stake. Several of these mycotoxins (e.g., deoxynivalenol and zearalenone) are targeted by European and international regulations fixing maximum admissible levels in food and feeds (regulation EC 2006/2009). Others, such as fusaproliferin, moniliformin, enniatins and beauvericin, are increasingly found as crop contaminants and considered as “emerging” [3]. Recent toxicological studies suggested enniatins could be genotoxic and hepatotoxic [4], and could be involved in future food-safety crises, especially in a context of climate and agricultural practices changes. As an example, a three-year study (2011–2013) on 11 malting barley varieties cultivated in Italy revealed changes in the *Fusarium* species constituting the FHB complex depending on the variety used and/or specific weather parameters occurring during the seasons, the enniatin-producers *F. avenaceum* and *Fusarium tricinctum* being consistently present [1]. This study confirmed previous experiments of wheat ears co-inoculation by two different *Fusarium* species [5] which have shown that an increase of wetness period and temperature led to an increase of the FHB symptoms and of the mycotoxin (trichothecene) productivity (up to 1000 times). Similarly, numerous studies reported increased frequencies of contamination of European and Asian wheat and barley crops with enniatins mainly produced by *F. avenaceum* and *F. tricinctum* [2, 6, 7]. In a recent study, Orlando et al. [8] analyzed enniatin-contents and contaminations with *Fusarium* species in 1240 samples of small grain cereals (wheat, durum wheat, spring barley, triticale and winter barley) from 2012 to 2014 French harvests, and found enniatins produced by *F. avenaceum* and *F. tricinctum* highly prevalent in French small grain cereals at levels

consistently at their highest on spring barley (mean values of 199 to 1316 µg/kg).

In the past decade, phylogenetic studies as well as fungal genetic and genomic approaches have led to an important increase in the number of species identified as belonging to the *Fusarium* monophyletic genus [9]. Among them, *F. avenaceum* (Fries) [10] and *F. tricinctum* (Corda) [11] are considered as two closely related taxa ranged in the same *F. tricinctum* species complex [12]. In this *Fusarium tricinctum* species complex (FTSC), *Fusarium acuminatum* and *Fusarium arthrosporioides* [13, 14] appear also closely related to both species, whereas *Fusarium torulosum*, *Fusarium flocciferum* and *Fusarium petersiae* are grouped in a more distant sister clade [12, 15]. In any case, the scarcity of data on both the genetic diversity of these fungal phytopathogens and the biosynthesis and regulation pathways of their associated mycotoxins limits our ability to assess the toxinogenic risk they represent, and consequently to design appropriate responses. In this context, the complete genome sequence of *F. tricinctum* strain INRA104 has recently been obtained in a whole genome shotgun project, including its full-length gapless mitochondrial genome [16]. In the present study, we investigated the modalities of molecular evolution of mitochondrial genomes in the *Fusarium* genus. We annotated the mitochondrial genome (MtDNA) of *F. tricinctum* strain INRA104 and compared its molecular organization with that of previously sequenced mitochondrial genomes of *F. avenaceum* [17] as well as of other distant *Fusarium* species [18, 19]. Then, to study the phylogenetic relationship between these closely related species and assessing the accuracy of mitochondrial sequences to discriminate *F. tricinctum* and *F. avenaceum*, the polymorphic mitochondrial regions were characterized and their intra- and inter-specific variability was studied in a set of 25 previously assigned wild strains. The mitochondrial polymorphism was compared with that of two nuclear genes *rpb1* and *rpb2*, previously reported as discriminating markers of both species [12]. The mobility and origin of all the harboured mitochondrial group I introns was also studied.

Results

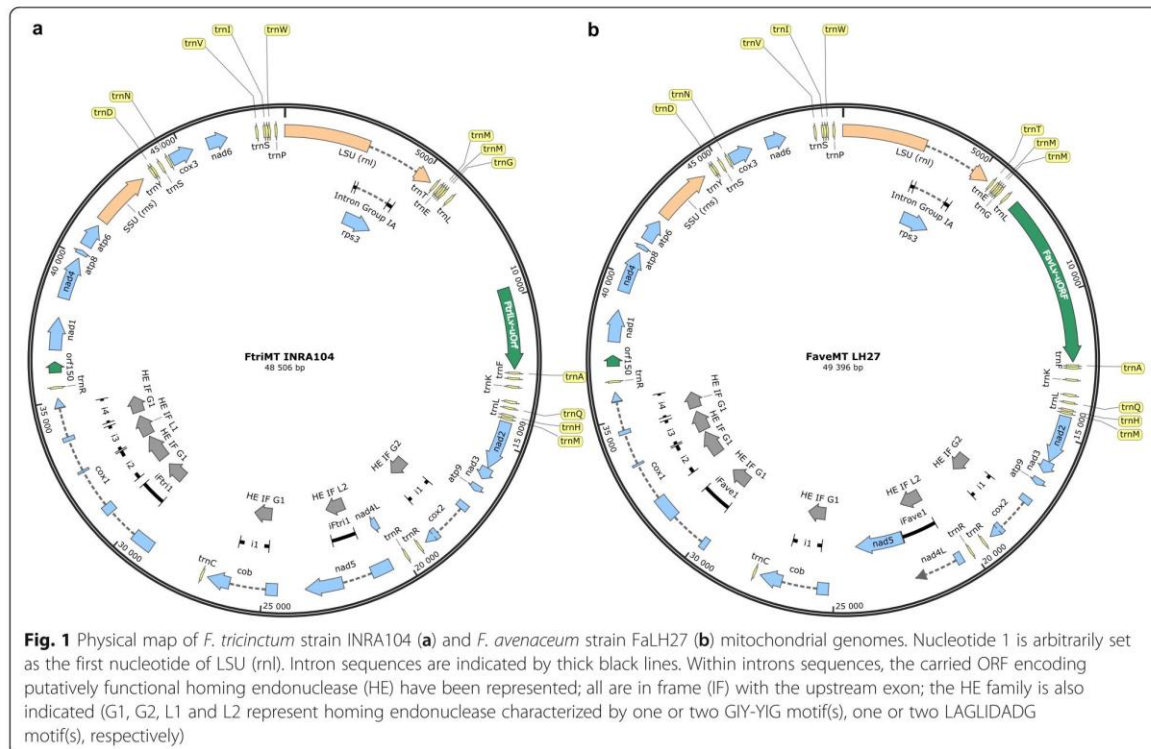
Molecular organisation and phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes

From our whole genome sequencing project (DDB/ENA/GenBank accession number QFZF00000000), the sequence of the complete mitochondrial genome (GenBank accession number CM009895) of *F. tricinctum* strain INRA104 has been retrieved and annotated (FtriMtDNA). In parallel, the mitochondrial genome of *F. avenaceum* strain FaLH27 (GenBank accession number JQGE01000002.1), a phylogenetically closely related species, was retrieved from third party sequencing data produced by Lysøe et al. [17] and also annotated for the purpose of comparison. The mitochondrial genomes of *F. avenaceum* strain FaLH27 (FaveMtDNA) and *F. tricinctum* strain INRA 104 have a size of 49,396 bp and 48,506 bp, respectively and the same average GC-content of 33%. A second *F. avenaceum* annotated mitochondrial genome sequence was also found available in the GenBank for strain FaLH03 (49,402 bp, accession number JQGD01000004.1). It differs from FaveMtDNA strain FaLH27 by only 6 bp in length, and possesses more than 99.9% of nucleotide identity. To avoid redundancy, the sequence of the MtDNA of the FaLH03 strain was not included in this study. *F. tricinctum* strain INRA104 and *F. avenaceum* strain FaLH27 MtDNAs are

close in size, FaLH27 MtDNA being 890 bp longer (representing 1.8% of variation in length scattered along the whole mitochondrial genome), and show high sequence conservation with 98.9% nucleotide identity.

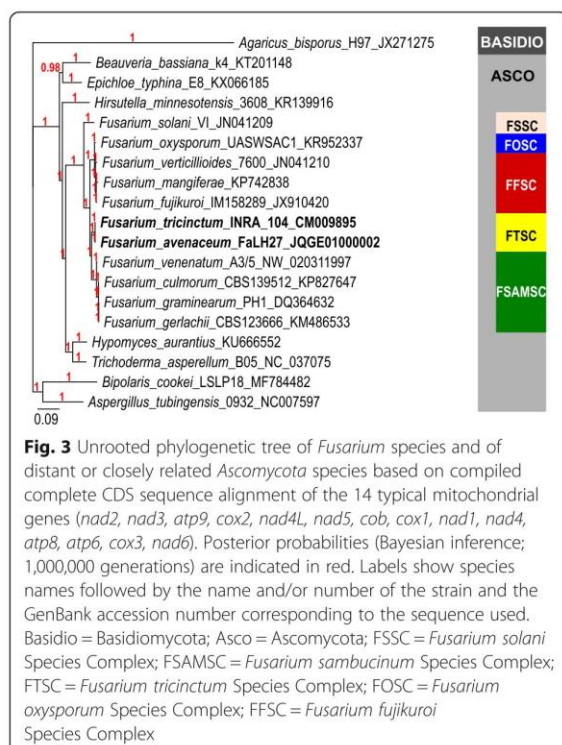
Annotation results of MtDNAs from both *F. tricinctum* strain INRA104 and *F. avenaceum* strain FaLH27 are displayed in Fig. 1, Additional file 1 (GenBank formatted annotated sequence of the *F. tricinctum* strain INRA104 MtDNA) and Additional file 2 (GenBank formatted annotated sequence of the *F. avenaceum* strain FaLH27 MtDNA). For easier comparison of the molecular organization of the *F. tricinctum* and *F. avenaceum* MtDNAs with others previously annotated MtDNAs in the fungal kingdom [20] and especially in the *Fusarium* genus, including those reported by Al-Reedy et al. [18], both sequences were annotated by arbitrarily fixing the first nucleotide as the 5' end of the *rnl* gene encoding the large ribosomal subunit RNA. This first nucleotide corresponds to positions 40,818 bp in *F. tricinctum* INRA 104 MtDNA and 21,516 bp in *F. avenaceum* FaLH27 one (GenBank accessions CM009895 and JQGE01000002, respectively).

F. tricinctum and *F. avenaceum* MtDNAs possess the same set of mitochondrial structural genes than all the *Fusarium* mitochondrial genomes reported to date [18]. Fourteen typical mitochondrial genes encode subunits of



grouped by phylogenetic relationship was inferred from the 14 mitochondrial CDS sequences (all mitochondrial structural genes *nad1* to 6, *cob*, *cox1* to 3, *atp6*, 8 and 9), concatenated, between 11 *Fusarium* species belonging to five species complexes (FSSC, FSAMSC, FTSC, FOSC, FFSC), seven distant Ascomycota and one Basidiomycota (Fig. 3). The size of the compiled sequences varied from 11,721 bp (for the Basidiomycota *Agaricus bisporus*) to 14,769 bp (for the Ascomycota *Epichloe typhina*); from 12,878 bp (*F. mangiferae*) and 13,144 bp (*F. fujikuroi*) for species of the *Fusarium* genus. This tree is fully congruent with those reported in previous phylogenetic studies based on the nuclear markers *rpb1* and *rpb2* [12]. In this mitochondrial CDS-based tree, the FTSC appears distant from the *Fusarium sambucinum* Species Complex (FSAMSC) as well as the related *Fusarium oxysporum* (FOSC) and *Fusarium fujikuroi* (FFSC) Species Complexes. As previously reported [12], the *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) ranges in an outgroup position in regard of the other *Fusarium* species complexes. For comparison, a phylogenetic tree based on the *cox1* CDS (from 1587 bp to 1593 bp in all the available *Fusarium* species) has also been built (Additional file 3: Fig. S1). This gene has been chosen because it is known to possess the highest number of group I introns in the fungal kingdom and in the *Fusarium* genus [22], and consequently can also be used to evidence conflict in phylogenetic trees based on orthologous intronic sequences of mitochondrial genes. Both trees based on the 14 compiled CDS and on the *cox1* CDS are fully congruent, showing the lack of gene conflict between *cox1* exonic sequences and all other mitochondrial CDS from a phylogenetic point of view.





Location of polymorphic versus conserved features

The analysis of the overall molecular organisation of *F. tricinatum* and *F. avenaceum* MtDNAs allowed distinguishing two remarkable regions: (i) a large region constituted by a long unidentified open reading frame flanked by two tRNAs clusters, previously named as Lv-uORF (for large variable unidentified ORF) in other *Fusaria* by Al-Reedy et al. [18]; (ii) the rest of the genome containing all conserved typical mitochondrial genes (39,586 bp and 40,439 bp in length in *F. tricinatum* and *F. avenaceum*, respectively). In *F. avenaceum*, the uORF included in this 8956 bp-long region (from nt 5290 to nt 14,245) is 5865 bp in size (from nt 6503 to nt 12,367). This ORF is reduced in *F. tricinatum* strain INRA104 which harbours an eroded uORF of only 2748 bp corresponding to the 3'-end of the *F. avenaceum* one (for a total variable region of 8919 bp in length in *F. tricinatum*, spanning from 5261 bp to 14,179 bp).

CDS encoding mitochondrial proteins of both *F. tricinatum* and *F. avenaceum* were found highly conserved in sequence and length. For example, COX1 CDS sequences (1593 bp) of both species differ by only three SNPs (99.8% of identity). When comparing with other species of the *Fusarium* genus, percentages of identity with *F. tricinatum* COX1 CDS varied between 92.5% for the distant *F. solani*, and 94–96% for members of the FOsc, FFSC or FSAMSC which includes *F. graminearum*.

As a whole, comparison of the mitochondrial genome of *F. tricinatum* (48,506 bp) with that of *F. avenaceum* (49,396 bp) revealed a global mutation frequency of 7.83 events/kb explained by 314 SNPs (6.47 SNP/kb) and 66 Indels (1.36 Indel/kb). The total size of these Indel sequences represented 1713 bp, i.e., 3.5% of the *F. tricinatum* genome size (see Additional file 3: Table S1 and Table S2 for details). Although coding sequences (rDNA, tRNA, and protein-coding CDS) represent 43.8% of the total *F. tricinatum* mitochondrial genome, they contain less than 8% of all 380 mutations events (30 SNPs, or 1.41 SNP/kb). With 1.63 SNP/kb and 2.21 Indels/kb, the introns found in these structural genes are only slightly more polymorphic, mostly due to the presence of Indels (absent from coding sequences). Most of the genetic variability (mainly composed of SNPs) is found in intergenic regions and in the large variable uORF-including region, which concentrate 47.9 and 39.2% of the mutation events in 22.1 and 16.4% of the genome, respectively (or 16.95 and 18.76 total mutation events/kb, respectively).

Strikingly, seven intergenic regions (N°18, 19, 20, 23, 25, 26 and 31) were shown to be affected by length variations occurring in microsatellites regions with a palindromic type organization (Fig. 4). Indeed, these regions are composed of (A)_{7–12}-TATA (or TGTA or TACA or TA)-(T)_{9–11} sequences. Beside these polymorphic regions, this peculiar palindromic organization of mononucleotide microsatellites was found 14 and 16 times in *F. avenaceum* and *F. tricinatum* MtDNA sequences, respectively. In the details, palindromes were found in the polymorphic regions listed above, and also in both tRNAs clusters flanking the Lv-uORF as well as in the intergenic regions N°22 and 28 (Fig. 4). When comparing both species, three palindromes were absent from FaveMtDNA (in the Lv-uORF and the intergenic regions 23 and 28) and one from FtriMtDNA (in the intergenic region 7). Moreover, these palindromes were frequently found associated with large deletions or sequences variations in the neighbouring regions (Fig. 4, lv-uORF, and intergenic regions 5, 7, 8, 19, 26 and 28).

Characterisation of mitochondrial introns and lv-uORF of *F. tricinatum* strain INRA104 and *F. avenaceum* strain FaLH27

MtDNAs of *F. tricinatum* strain INRA104 and *F. avenaceum* strain FaLH27 were shown to each harbour eight group I introns. Among them, the LSU-rDNA intron (group IA) containing the ribosomal protein *rps3* gene is present in both *F. tricinatum* and *F. avenaceum*, as it is the case for all the mitochondrial genomes described to date in *Fusarium* species [18] and in most of the Ascomycota filamentous species [20, 21]. Regarding mitochondrial protein structural genes, five introns were present in both species: one in *cox2* (*cox2 i1*), one in *cob*

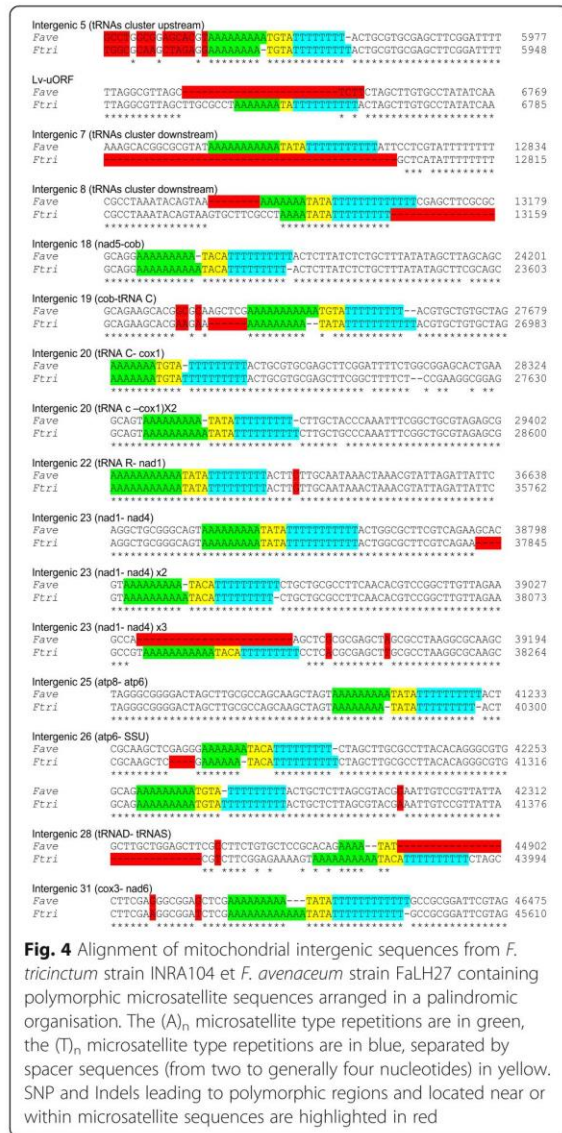


Fig. 4 Alignment of mitochondrial intergenic sequences from *F. tricinctum* strain INRA104 et *F. avenaceum* strain FaLH27 containing polymorphic microsatellite sequences arranged in a palindromic organisation. The (A)_n microsatellite type repetitions are in green, the (T)_n microsatellite type repetitions are in blue, separated by spacer sequences (from two to generally four nucleotides) in yellow. SNP and Indels leading to polymorphic regions and located near or within microsatellite sequences are highlighted in red

(*cob i1*), and three in *cox1* (*cox1 i2*, *cox1 i3* and *cox1 i4*). Each of these five introns was assumed to represent orthologous sequences on the basis of a shared insertion site in the CDS of the gene as well as a high nucleotide sequence identity (> 99%). In addition to these five conserved introns, *F. tricinctum* possesses one intron in *nad5* (*nad5 iFtri1*) and one intron in the 5' part of *cox1* (*cox1 iFtri1*) that are not present in *F. avenaceum*; in the same way, *F. avenaceum* MtDNA harbours an intron in *nad4L* (*nad4L iFave1*) that is not present in *F. tricinctum* as well as an intron located in the 5' part of *cox1* (*cox1 iFave1*) but different from *cox1 iFtri1* in sequence (only 49.3% of nucleotide sequence identity) and in its

insertion site. All these group I introns have a size between 1018 bp (*cox1 i4*) and 1481 bp (*nad4L iFave1*), and all carry an intact ORF in frame with the upstream exon which encodes a potentially functional homing endonuclease (HE) acting in the homing (site-specific integration) of the intron in the corresponding CDS after lateral transfer [23].

For each of these nine group I introns, their optionality (presence/absence pattern) was investigated in a panel of 25 strains constituted by 14 *F. tricinctum* and 11 *F. avenaceum* strains (Table 1 and Additional file 3: Table S3) by a fragment-length PCR approach that uses primers defined in exons flanking the investigated intron (Additional file 3: Table S4). Results, expressed by the presence or absence of each intron, were obtained for the 14 *F. tricinctum* and 11 *F. avenaceum* studied strains and compiled in Table 1. Among the five introns shared by *F. tricinctum* strain INRA104 and *F. avenaceum* strain FaLH27 – i.e., *cox2 i1*, *cob i1*, *cox1 i2*, *cox1 i3*, and *cox1 i4* – the three introns located in the 3' part of the *cox1* gene (*cox1 i2*, *i3* and *i4*) were the only ones present in all the 25 studied strains. The intron *cox2 i1* was found in all but one strain, *F. avenaceum* INRA612. The intron *cob i1* was missing in 9 out of 14 of the *F. tricinctum* strains. Considering the two introns found in *F. tricinctum* INRA104 and not in *F. avenaceum* FaLH27 – i.e., *cox1 iFtri1* and *nad5 iFtri1* – *cox1 iFtri1* was indeed present in all investigated *F. tricinctum* strains while absent from all *F. avenaceum* ones whereas *nad5 iFtri1* was not exclusive to *F. tricinctum* but also found in two out of 11 *F. avenaceum* strains (*F. avenaceum* INRA6 and *F. avenaceum* INRA612). Sequencing of corresponding PCR products showed high nucleotide identity (99.5%, i.e., five SNP on the whole 1.025 kb-long intron sequence). Regarding the two introns found in *F. avenaceum* FaLH27 but not in *F. tricinctum* INRA104 – i.e., *nad4L iFave1* and *cox1 iFave1*, *nad4L iFave1* was found in all *F. avenaceum* strains but not in any of the investigated *F. tricinctum* strains, whereas *cox1 iFave1* was present in all *F. avenaceum* strains but also in one *F. tricinctum* strain (INRA86). As a whole, 9 out of 11 of the *F. avenaceum* studied strains have identical intronic pattern. Two strains, *F. avenaceum* INRA6 and *F. avenaceum* INRA612, nonetheless differ by the presence of the *nad5 iFtri1*, and the lack of *cox2 i1* for strain INRA612. In the 14 *F. tricinctum* studied strains, two groups can be distinguished based on the absence or presence of *cob i1*, herein referred to as group A (nine strains) and group B (five strains), respectively. In group B, only strain INRA86 shows a specific intronic profile characterized by the additional presence of *cox1 iFave1*.

For comparison purposes, we categorize the 25 strains of this study using as marker the partial sequences of PCR products derived from *rpb1* (798 bp), *rpb2* (762 bp)

Table 1 Optionality of *F. tricinctum* and *F. avenaceum* mitochondrial introns

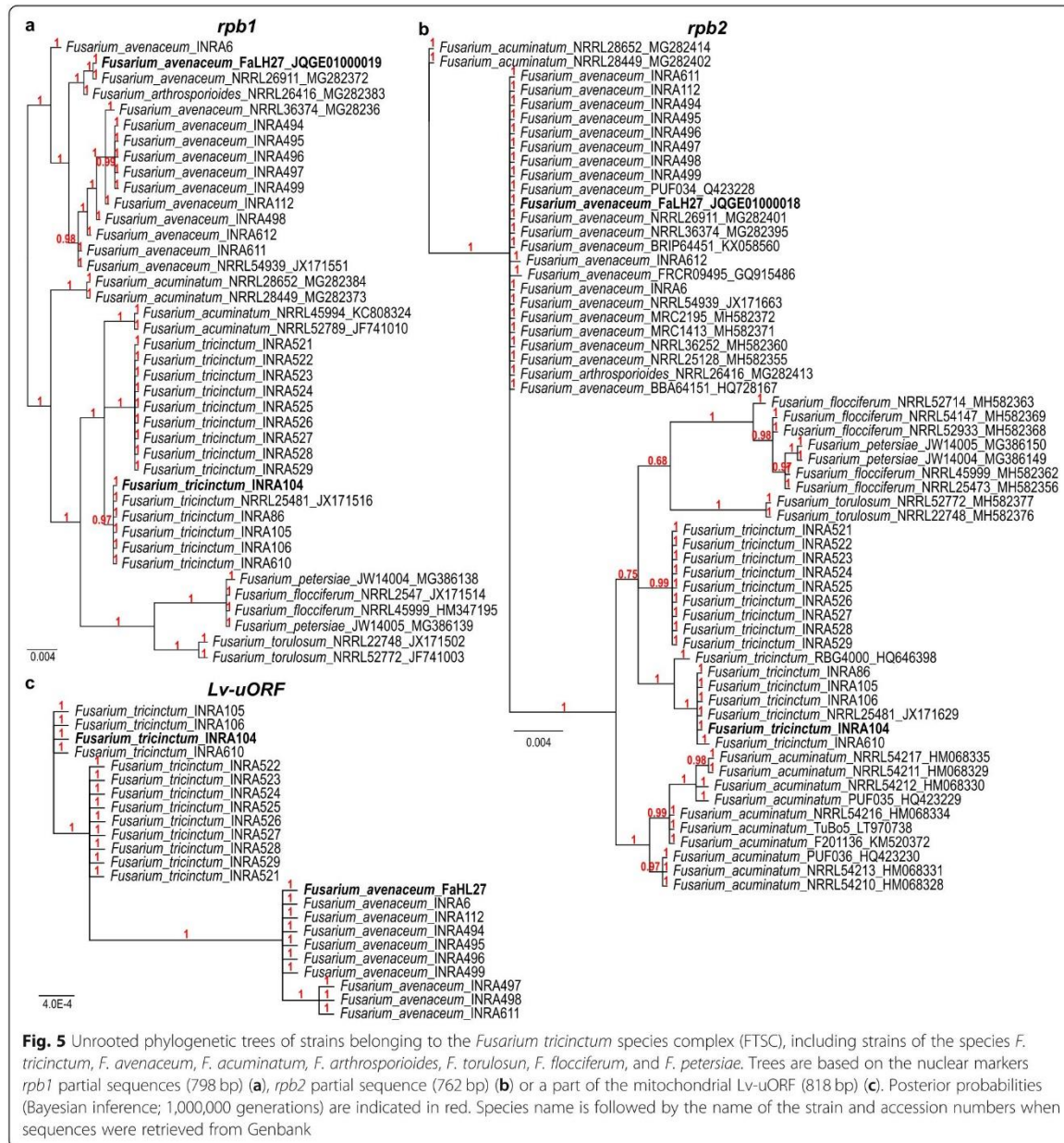
Species	Strain	cox2 i1	nad4L iFave1	nad5 iFtri1	cob i1	cox1 iFave1	cox1 iFtri1	cox1 i2	cox1 i3	cox1 i4
<i>F. tricinctum</i>	INRA104	P ^a	Exon	P	P	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 105	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 106	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 610	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 521	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 522	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 523	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 524	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 525	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 526	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 527	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 528	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 529	P	Exon	P	Exon	Exon	P	P	P	P
<i>F. tricinctum</i>	INRA 86	P	Exon	P	P	P	P	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	FaLH27	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 112	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 494	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 495	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 496	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 497	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 498	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 499	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 611	P	P	Exon	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 6	P	P	P	P	P	Exon	P	P	P
<i>F. avenaceum</i>	INRA 612	Exon	P	P	P	P	Exon	P	P	P

^aPresent

and a part of the mitochondrial Lv-uORF (818 bp) (Fig. 5a, b and c, respectively). For each marker, all orthologous sequences of strains and species belonging to the FTSC and available in the GenBank (see Additional file 4 Table S6 for accession numbers) have been added to the analyses (i.e., 40 *rpb1* sequences and 60 *rpb2* sequences in total; see Fig. 5a and b). The trees obtained with nuclear sequences are highly congruent, showing that *F. tricinctum* and *F. avenaceum* strains separate well from each other as well as from the other species included in this analysis, with the exception of *F. arthrosporioides* NRRL26416 that clusters with *F. avenaceum* strains. All other species were separated in a phylogenetically distant clade. Regarding *F. acuminatum*, the studied strains seem to cluster in a sister group of the *F. tricinctum* clade except for *F. acuminatum* NRRL28652 and NRRL28449 that regroup with *F. avenaceum* strains. These results suggest that *F. acuminatum* may be more closely related to *F. tricinctum* than *F. avenaceum*, strains NRRL28652 and NRRL28449 being exceptions possibly belonging to the *F. avenaceum* or a new undescribed species. Strikingly, the

two clades separated on the base of the presence/absence of *cob i1* described earlier, match the clear separation of *F. tricinctum* strains in two groups in the *rpb1* and *rpb2*-based trees (Fig. 5a and b, respectively).

A similar analysis was performed using the mitochondrial sequences of the large variable intergenic region carrying the uORF only (Fig. 5c). The obtained tree clearly separated *F. tricinctum* and *F. avenaceum* into two clades but fails to discriminate most strains of the same species. Indeed, nucleotide identities vary from 99.9 to 100% between strains of the same species, and less than 97.6% between strains of both species. On the sequence alignment (Additional file 3: Fig. S2), two insertion/deletion events can be observed: a deletion of three nucleotides in *F. tricinctum* vs. *F. avenaceum* at the beginning of the alignment, and an insertion of 39 to 45 nucleotides. These events are responsible for the erosion of the uORF in the *F. tricinctum* strains. These Indels are accompanied by several flanking interspecific SNPs. Strikingly, the large *F. tricinctum* inserted sequence is bordered by a copy of a polymorphic



microsatellite region with the peculiar organization described earlier, i.e., (A)₇–TA-(T)_{9–10}.

Phylogenetic analyses of *F. tricinctum* and *F. avenaceum* mitochondrial group I introns

To explore the origin and evolution history of each of these mitochondrial introns, orthologous sequences available in the GenBank have been compiled (see Additional file 4 Table S6 for accession numbers). Intron sequences were

considered orthologous when they were members of the same Position class (PCI), as previously defined [22]: each PCI contains intron sequences possessing both the highest percentage of nucleotide identity and the same location in the exonic sequence (CDS). Results are summarized in Table 2.

Among the nine introns reported in *F. tricinctum* and *F. avenaceum* mitochondrial genes, only *nad5 iFtr1* did not possess any orthologous sequences in other *Fusarium*

Table 2 Summary of mitochondrial intron distribution, and origin and mobility hypotheses

A Mitochondrial intron distribution in fungal strains and percentage of nucleotide identity between orthologous sequences

Intron	Presence	In <i>F. tricinctum</i> clade ^a	In <i>F. avenaceum</i> clade ^a	In FTSC	In FSAMSC	In FOSC	In FFSC	In FSSC	In distant Ascomycota
<i>cox2 i1</i>	all	all but INRA 612	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> , <i>Fgra</i> (95.7–96.2%)	optional	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> , <i>Fgra</i> (91.7–96.9%)	0	0	0	<i>N. cinnabarina</i> (84.2%)
<i>nad4L iFave1</i>	0	all	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> (91.7–96.9%)	optional	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> (91.7–96.9%)	0	0	0	<i>T. asperellum</i> (97.7%); <i>H. minnesotensis</i> (81.7%)
<i>nad5 iFtri1</i>	all	2 (INRA6, INRA 612)	optional	0	0	0	0	0	Pleosporineae sub-order (84.1–85.6%)
<i>cob i1</i>	5 strains (clade B)	all	optional	<i>Fven</i> (97.9%), <i>Fgra</i> , <i>Fger</i> (89.7%)	several <i>Foxy f.sp.</i>	0	0	0	<i>B. bassiana</i> (81.9%)
<i>cox1 iFave1</i>	only INRA86	all	optional	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> , <i>Fgra</i> , <i>Fger</i> (94.5%)	0	<i>Fman</i> (95.1%), <i>Ftem</i> (93, 7%)	0	0	<i>E. typhina</i> (84.2%)
<i>cox1 iFtri1</i>	all	0	optional	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> , <i>Fgra</i> , <i>Fger</i> (80.6%)	0	0	<i>Fsol</i> (94.4%)	<i>A. aegerita</i> (85.4%); Basidiomycota	
<i>cox1 i2</i>	all	all	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> , <i>Fgra</i> , <i>Fger</i> (77.7%)	0	<i>Fver</i> , <i>Ftem</i> , <i>Fcir</i> (77.2%)	<i>Fsol</i> (93.0%)	0	0	
<i>cox1 i3</i>	all	all	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> , <i>Fgra</i> , <i>Fger</i> (66.5%)	0	<i>Ftem</i> , <i>Fcir</i> (66.5%)	<i>Fsol</i> (96.0%)	0	0	
<i>cox1 i4</i>	all	all	<i>Fcul</i> , <i>Fven</i> , <i>Fgra</i> , <i>Fger</i> (96.5%)	0	<i>Ftem</i> , <i>Fcir</i> (74.5%)	0	0	0	
<i>B</i> Origin and mobility hypotheses for mitochondrial introns									
Intron	Mobility (presence in <i>Fusarium</i> genus)		Origin hypothesis		Lateral transfer				
<i>cox2 i1</i>	Yes (lost in INRA 612)		ancestral (in <i>Fusarium</i> genus)		unknown				
<i>nad4L iFave1</i>	Yes (frequent loss)		ancestral (in <i>Fusarium</i> genus)		Yes (recent transfer with <i>Tasp</i>)				
<i>nad5 iFtri1</i>	yes (rare intron; frequent loss)		ancestral (in FTSC)		unknown				
<i>cob i1</i>	Yes (loss in one <i>Ftri</i> clade)		ancestral (in <i>Fusarium</i> genus)		Yes (recent transfer with <i>Fven</i>)				
<i>cox1 iFave1</i>	Yes (loss and gain)		ancestral (in <i>Fusarium</i> genus)		Yes (recent transfer with <i>Fman</i>)				
<i>cox1 iFtri1</i>	Yes (loss in <i>Fave</i>)		ancestral (in <i>Fusarium</i> genus)		Yes (recent transfer with <i>Fsol</i>)				
<i>cox1 i2</i>	Yes (loss and gain in <i>Fusarium</i> genus)		ancestral (in <i>Fusarium</i> genus)		Yes (recent transfer with <i>Fsol</i>)				
<i>cox1 i3</i>	Yes (loss and gain in <i>Fusarium</i> genus)		ancestral (in <i>Fusarium</i> genus)		Yes (recent transfer with <i>Atub</i>)				
<i>cox1 i4</i>	Yes (loss and gain in <i>Fusarium</i> genus)		ancestral (in <i>Fusarium</i> genus)		unknown				

^aPresence of the introns in the 14 *F. tricinatum* and 11 *F. avenaceum* studied strains; when applicable, ranges of percentage of nucleotide identity with species outside of *F. tricinatum* and *F. avenaceum* are given in parenthesis; *Fcul* *F. culmorum*, *Fven* *F. venenatum*, *Fgra* *F. graminearum*, *Fger* *F. gerlachii*, *Foxy* *F. oxysporum*, *Fman* *F. mangiferae*, *Ftem* *F. temperatum*, *Fcir* *F. circinatum*, *Fsol* *F. solani*, *Atub* *Aspergillus tubigenis*, *Tasp* *Trichoderma asperellum*

species. For this intron, only few orthologous sequences were found, all belonging to the Pleosporinae suborder, with 84.1 to 85.6% nucleotide identity: *Bipolaris cookei* and *Bipolaris maydis*, *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae', *Leptosphaeria maculans* 'lepidii', and *Coniothyrium glycines*.

Orthologous sequences of the eight remaining introns were found in other *Fusarium* species complexes, mainly in members of the FSAMSC. The *cob i1* intron was shown to also possess orthologous sequences in members of the FOOSC, whereas the five introns carried by *cox1* had orthologous sequences in members of the FFSC with the exception of *cox1 iFtri1*. Orthologous sequences of *cox1 iFtri1* as well as *cox1 i2* and *cox1 i3* were found in members of the FSSC. Notably, percentages of nucleotide identity between the various orthologous sequences included in this study were highly variable, arguing for different origins and evolution of the intronic sequences.

Phylogenetic trees were built based on the alignments of the orthologous sequences of each intron (Fig. 6). Whilst

species of the FSAMSC, FTSC, and FFSC are well separated from each other and from other Ascomycota in the trees built from *cox2 i1* and *cox1 i4* orthologous sequences (Fig. 6a and h, respectively), the Ascomycota *Trichoderma asperellum* is inserted among *Fusarium* species of the FSAMSC when *nad4L iFave1* is considered (Fig. 6b), with 97% nucleotide identity, suggesting a lateral transfer event. Similarly, at least five other lateral transfer events can be observed regarding *cob i1* (involving *Fusarium venenatum*, Fig. 6c), *cox1 iFave1* (involving *Fusarium mangiferae*, Fig. 6d), *cox1 iFtri1* (involving the distant Basidiomycota *Agrocybe aegerita*, Fig. 6e), *cox i3* (involving *Aspergillus tubingensis*, Fig. 6g), as well as three introns of *cox1* (*cox1 iFtri1*, *cox1 i2* and *cox1 i3*) and involving *F. solani* (Fig. 6e, f and g).

Discussion

The mitochondrial genomes of *F. tricinctum* strain INRA104 (48.5 kb) and *F. avenaceum* strain FaLH27 (49.4 kb) were found highly similar in size and sequence

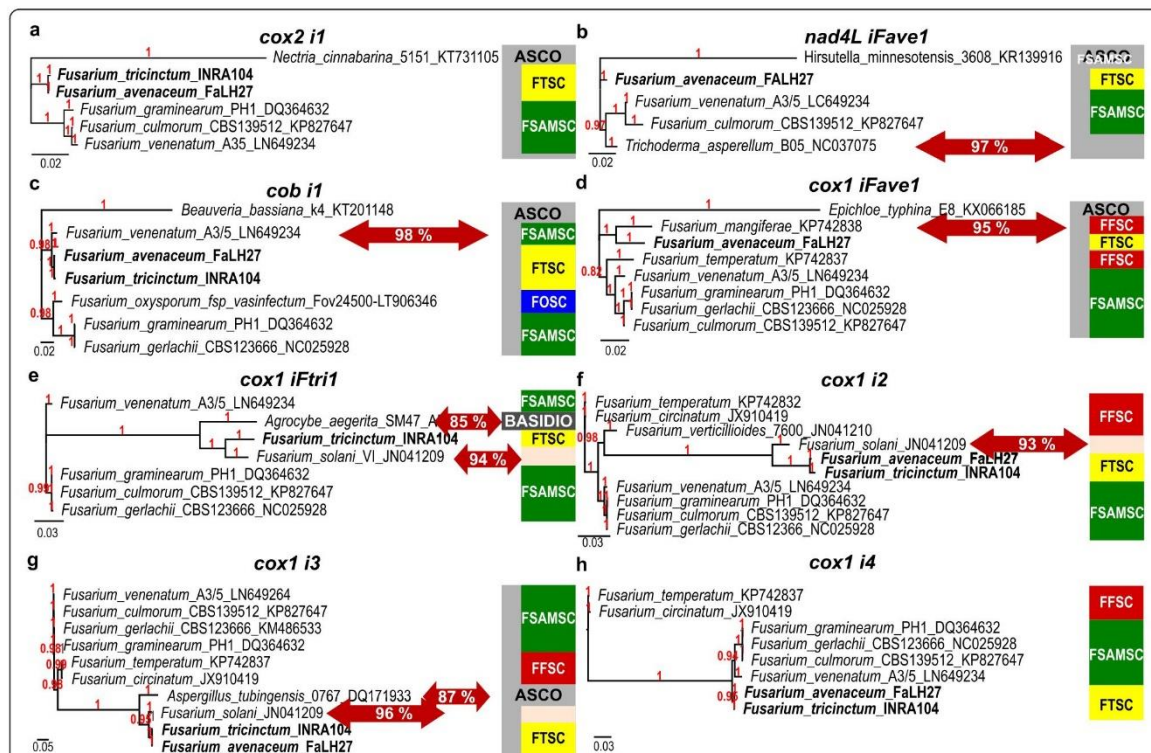


Fig. 6 Unrooted phylogenetic trees of *Fusarium* spp. strains based on the sequences of orthologous mitochondrial introns of *F. tricinctum* and/or *F. avenaceum* *cox2 i1* (a), *nad4L iFave1* (b), *cob i1* (c), *cox1 iFave1* (d), *cox1 iFtri1* (e), *cox1 i2* (f), *cox1 i3* (g), *cox1 i4* (h). Posterior probabilities (Bayesian inference; 1,000,000 generations) are indicated in red. Labels show species names followed by the name and/or number of the strain and the GenBank accession number corresponding to the sequence used. Basidio = Basidiomycota; Asco = Ascomycota; FSSC = *Fusarium solani* Species Complex; FSAMSC = *Fusarium sambucinum* Species Complex; FTSC = *Fusarium tricinctum* Species Complex; FOSC = *Fusarium oxysporum* Species Complex; FFSC = *Fusarium fujikuroi* Species Complex. Red arrows indicate species involved in a lateral transfer with one member or ancestor of the FTSC; percentages of nucleotide identity between the corresponding orthologous sequences are indicated on the arrows

(98.3% nucleotide identity), with an identical GC content (33%). The comparative analysis of their molecular organization identified a variable region with high inter-specific polymorphism, comprising an ORF with cryptic function (uORF of 5865 nt, 1955 aa) flanked by two clusters of tRNAs, the ORF being eroded (2748 nt, 916 aa) in *F. tricinctum* strain INRA104 by comparison with the very large one found in *F. avenaceum* FaLH27. This region was previously defined by Al-Reedy et al. [18] as an “exceptionally large ORF” in *F. verticillioides* (2572 aa), *F. solani* (2013 aa) and *F. graminearum* (1931 aa). In a recent report based on the analysis of 61 mitochondrial genomes of the FOSC, Brankovics et al. [19] described a large uORF of 2284 aa in some strains or eroded smaller ORFs (less than 740 aa) in other strains, similarly to our observations in *F. tricinctum* and *F. avenaceum*. Here, we found that both the large variable uORF-including regions and intergenic regions exhibit similar patterns of frequent mutation events, thus arguing for the optionality of this large uORF. Searching nuclear genomes of uORF-devoid species/strains for the presence of paralogous sequences may provide elements towards understanding the evolution history of this optional ORF of cryptic function.

Surprisingly, we found that Lv-uORFs identified in *F. tricinctum* strain INRA104 and *F. avenaceum* FaLH27 as well as their flanking tRNAs clusters (in the intergenic regions 5 and 7) harboured microsatellite sequences (A)_n and (T)_n arranged in a palindrome-type organisation, and were also affected by large Indels and/or important sequence variations. Such association between this peculiar palindromic organisation and Indels was also found in several other intergenic regions of *F. tricinctum* and *F. avenaceum* mitochondrial genomes. The optionality of these palindromes between *F. tricinctum* and *F. avenaceum* argues for their mobility, as previously described for mitochondrial double-hairpin elements of *Allomyces* fungi [24]. Moreover, the frequent presence of large Indels and/or important sequence variations in the neighbouring regions of the palindromes of *F. tricinctum* and *F. avenaceum* suggests the involvement of this new type of putative mobile genetic elements in the observed deletions, and sequence evolution. Such repetitive palindromic repeats were found up to 19 times in the genome of the green microalga *Lobosphaera incisa* [25] and have been proposed to act as substrates for large-scale genomic rearrangements or as sites of transcript processing. In the same way, hairpin and tandem repeat-containing genetic elements, and also tRNAs with associated palindromic sequences have been described in cryptophyte algae, which possess a clear phylogenetic relationship to heterotrophic eukaryotes [26]. In these algae species, these sequences are believed to be involved in the observed gene shuffling affecting mitochondrial genes by promoting recombination events.

In fungal MtDNAs, dispersed repeated sequences have already been reported in filamentous or yeast Ascomycota, such as *Pst1* (GC-rich) palindromes in *Neurospora crassa* [27, 28], the mitochondrial ultra-short element MUSE1 (11 bp in size, more than 100 copies per genome) in *Podospira anserina* [29], or GC clusters in *Saccharomyces cerevisiae* and 28 other yeast species [30]. Various roles have been proposed for such fungal interspersed elements, such as sites of initiation for replication or transcription, or processing of transcripts, but most of them are considered as mobile genetic elements, invasive and highly recombinogenic, and involved in mitochondrial polymorphism by generation of length mutations (excision, insertion, DNA slippage) [27–30].

To the best of our knowledge, the palindromic organisation of (A)_n and (T)_n microsatellites sequences described in the *F. tricinctum* and *F. avenaceum* MtDNA constitute the first report of such putatively mobile (AT-rich) genetic elements. To date, nothing is known about their putative role (e.g., in the molecular evolution of mitochondrial genomes, the MtDNA replication or the regulation of the expression of genes). However, our results by showing a frequent link between these palindromes and the occurrence of SNP and/or Indels in their neighbouring regions (see Fig. 4), suggest a putative role of these mobile elements in the generation of mitochondrial polymorphism. Notably, despite the high number (14 to 16) of these palindromic sequences in FtriMtDNA and FaveMtDNA, no evidence of gene shuffling or recombination event was recovered.

When compared with other mitochondrial genomes available in the whole monophyletic genus *Fusarium*, the sizes of *F. tricinctum* and *F. avenaceum* MtDNAs are close to the sizes reported for 61 strains of the FOSC, ranging between 38.7 kb in *F. oxysporum* f. sp. *melonis* and 53.4 kb in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* [19], as well as for *F. verticillioides* (53.7 kb) of the FFSC [18]. Other species have larger MtDNAs, such as *F. solani* (63 kb, [18]) a member of the FSSC located at the base of the phylogenetic tree of the *Fusarium* genus [12]. Species of the FSAMSC have considerably larger MtDNAs [31, 32], in the range of 93.4 kb for *Fusarium gerlachii* (GenBank accession number KM486533) to 103.8 kb for *F. culmorum* (GenBank Accession number KP827647). As previously reported in numerous fungal genera [22], the mitochondrial genome size variations observed in the *Fusarium* genus does not involve the highly conserved set of mitochondrial genes and is not related to the phylogenetic distances separating these *Fusarium* species. Here, size variation would be mainly due to variations in the group I intron content of these genomes. For a still unknown reason, some species seem to behave as large intron reservoirs whereas other closely related ones show few or none introns [22].

Group I introns are mobile genetic elements that can be gained (after lateral transfers, even between phylogenetically distant species) or lost, during short evolution periods [22, 33]. The identification of putatively functional Homing Endonucleases genes (*hegs*) in all introns of *F. tricinctum* and *F. avenaceum* mitochondrial genomes supports that the concerned introns are independent functional mobile genetic elements with homing specificity. Comparing the molecular organization of MtDNAs of *F. tricinctum* and *F. avenaceum*, we found significant polymorphisms between these closely related species in relation with intron mobility. This inter- or intra-specific optionality can be explained by two divergent hypotheses [22, 33–35]: (i) a gain of the mobile genetic element after a lateral transfer between a phylogenetically close or distant species [35, 36] or (ii) the loss of an ancestrally inherited genetic element [34, 36]. We explored the origin and evolution history of the introns found in *F. tricinctum* and *F. avenaceum*, and searched, for each intron, its available orthologous sequences to compare their phylogenetic relationships to the one established using the compiled typical mitochondrial protein genes in close and distant Ascomycota species (Fig. 3 and Table 2). Among the nine introns characterized in the *F. tricinctum* and/or *F. avenaceum* studied strains, eight were found widely distributed in the *Fusarium* genus, including in members of other *Fusarium* species complexes. Only the intron *nad5 iFtri1* was found solely in strains belonging to the FTSC, precisely in all the 14 studied *F. tricinctum* strains plus 2 *F. avenaceum* strains out of 11 studied, suggesting that this intron is a rare intron ancestrally inherited in the FTSC. This specificity suggests that its evolution history in the Ascomycota phylum would be intron loss rather than gain and spreading.

The patchy distribution of the eight other introns in the *Fusarium* genus as well as their optionality in the 25 studied strains of the FTSC clearly argue in favor of their ancestral origin in the *Fusarium* genus, accompanied by frequent events of gain and loss occurring during short evolution periods. Among the nine different introns characterized in the *F. tricinctum* and *F. avenaceum* mitochondrial genomes, three were present in all the 25 studied strains, and the other six were found optional. Among the latter, this optionality was inter-specific for *nad4L iFave1* (present in all *F. avenaceum* strains and absent from all *F. tricinctum* strains) and *cox1 iFtri1* (present in all *F. tricinctum* strains and absent from all *F. avenaceum* strains). The presence/absence of these introns thus provide a clear discrimination of *F. tricinctum* and *F. avenaceum* species, among the 25 studied strains. The observed high percentages of nucleotide identity between orthologous intron sequences from phylogenetically distant species supports the hypothesis of intron gains after lateral transfers. Here, up to eight lateral transfers have been evidenced and concern the introns *nad4L iFave1*, *cob i1*, *cox1 iFave1*, *cox1 iFtri1*, *cox1 i2*, and *cox1 i3* (Table 2).

In most of the species of the fungal kingdom, the mitochondrial *cox1* gene is the richest in group I introns [22], sometimes leading to astonishing “long” genes containing up to 18 introns in the Basidiomycota *Agaricus bisporus*. In Ascomycota, “long genes” have also been described, especially in species belonging to the *Fusarium* genus [18] in the FSAMSC (up to 13 introns in *F. graminearum*) or in the basal FSSC (eight introns reported in *F. solani*). On the contrary, species of the FOSC do not possess any intron in their *cox1* gene [19]. These reports argue for a high mobility of the group I introns of the *cox1* gene, with frequent events of gain and loss during the evolution of the *Fusarium* genus. Our results support this high mobility of the *cox1* mitochondrial introns in the *Fusarium* genus, with evidences of lateral transfers between introns described in the FTSC and *F. mangiferae* (FFSC) for *cox1 iFave1*, and three introns of *F. solani* (FSSC) for *cox1 iFtri1*, *cox1 i2* and *cox1 i3*. The co-location of these three introns in the same 3' region of *cox1* and the percentages of nt identity between orthologous sequences suggest that they could have been transferred at the same time in a single event. Moreover, for *cox1 iFtri1* and *cox1 i3*, a second horizontal transfer may also have occurred involving highly distant species, an ancestor of the Basidiomycota *Agrocybe aegerita* and of the Ascomycota *A. tubigensis*, respectively. Such lateral transfers between an Ascomycota and *A. aegerita* has previously been reported [37]. Considering the *nad4L iFave1*, our results suggest two hypotheses: (i) this *Fusarium* ancestral mobile genetic element may have been lost (as in *F. tricinctum*) then recently re-gained by an event of lateral transfer involving *F. avenaceum* and a species phylogenetically related to *T. asperellum*, or (ii) the ancestral *nad4L iFave1* intron may have been maintained and recently transferred to *T. asperellum* by a lateral transfer. In the absence of other Ascomycota orthologous sequence with high nucleotide identity with the *T. asperellum* intron sequence, the second hypothesis seems more likely. Similarly, the incongruent relationship between the *cob i1* intron sequences of *F. tricinctum* and *F. avenaceum* strains with the orthologous sequence reported in *F. venenatum* suggests that a lateral transfer of this mobile genetic element may have occurred between *F. venenatum* and an ancestor of *F. tricinctum* and *F. avenaceum*. Notably, since *cob i1* is present in all *F. avenaceum* studied strains but not in all *F. tricinctum* ones, this intron may have been lost during the most recent evolution leading to the clade here referred as group A of the *F. tricinctum* species.

Comparing intron sequence polymorphism between *F. tricinctum* INRA104 and *F. avenaceum* FaLH27, little variability was detected, i.e., at levels comparable to those found in mitochondrial CDS sequences. Moreover, all the nine introns carried an intact *heg* encoding a

potentially functional enzyme. Twenty years ago, Goddard and Burt [36], studying the behavior of the mitochondrial ω -*heg* and its host intron in 20 yeast species, established a cyclic model with three steps: invasion, erosion and finally loss, followed by re-invasion. Their data led to the estimation that each step is achieved in about two million years, and that a long-term maintenance of an intact *heg* requires frequent lateral transmission events. This model [36] was later confirmed and extended by Koufopanou et al. [38] who reported a high adaptation of a *heg* to its lateral transmission. The frequency of these lateral transmission events appears, consequently, to play a major role in the wide-spreading of mitochondrial group I introns and *heg*. According to this cyclic model of intron evolution, maintenance of a functional HE is required only during the invasion phase of these self-splicing mobile genetic elements. When the parasitic element is fixed in a population, the HE activity becomes unnecessary, submitted to neutral selection and can be randomly lost [36, 39]. However, numerous putatively functional HEs were also reported to be maintained over long evolutionary periods in populations of species considered as mostly asexual. Such findings and implications have been extensively discussed by Gogarten et al. [39]. In this paper, they list several hypotheses to explain the maintenance of a functional HE, such as, for example, (i) an unsuspected level of intra-specific (sexual) and/or inter-specific matings, (ii) a complex population structure where the mobile element is not fixed, or (iii) an unknown role of the HE which will be selected because increasing the fitness of its host. Here, all these hypotheses could also explain the high conservation and putative functionality observed with all the nine *hegs* and group I introns described in the *F. tricinctum* and *F. avenaceum* mitochondrial genomes, independently from the fact that these mobile genetic elements were found involved in lateral transfers (as it is the case for most of them) or not.

Conclusions

Fusarium tricinctum and *Fusarium avenaceum* are two phylogenetically close phytopathogenic species, producers of “emerging” mycotoxins including enniatins and, thus, potentially involved in future food-safety crises. In this paper, a comparative analysis of the molecular organization of their mitochondrial genome has been carried out in a set of 25 wild strains representing both species. This analysis shows that both species can easily be differentiated by polymorphic mitochondrial sequences, such as Indels occurring in the Lv-uORF region.

Moreover, both genomes were shown to harbour optional (inter- or intra-specifically) group I introns, all carrying putatively functional *hegs*, arguing for a high mobility of these introns occurring during short evolution periods. The gain events of these selfish (parasitic) mobile elements were shown to involve, for most of

them, lateral transfers between phylogenetically distant species, suggesting an important role of sexual but also interspecific mating in the populations of these phytopathogens.

This study has also revealed a new type of mobile genetic element constituted by a palindromic arrangement of single nucleotide (A) _n and (T) _n microsatellite sequences whose presence was related to occurrence of SNPs and Indels in the neighbouring regions. Such mobile elements could represent an important driving force of mitochondrial genome evolution in *Fusarium* species but also in a broader range of fungal species.

Methods

Fusarium spp. strains and culture conditions, sequences used for taxonomic identification and phylogenetic studies

All the *F. tricinctum* and *F. avenaceum* strains used in this study (Additional file 3: Table S3) were issued from sub-cultures and monospore (conidial) isolation of strains harvested from the wild (from maize or cereal crops with various geographical origins but mostly from various French regions) and are conserved in the INRA UR1264 MycSA laboratory or in the Fungal Culture Collection of the International Centre of Microbial Resources (CIRM-CF), curated (Marseille, France). Mycelia were cultured on solid PDA medium (Difco). All strains were previously assigned to the *F. tricinctum* or *F. avenaceum* species by, first, a morphological characterization of the mycelial hyphae and their produced asexual (macroconidia) and/or vegetative (chlamydospores) mitospores (according to [40]), then by using, qPCR, with species-specific primers [41, 42]. The Accession numbers of the sequences obtained in this study and used to build phylogenetic trees are also indicated in Additional file 3: Table S3.

Mitochondrial genome annotation

The complete mitochondrial genome sequences of *F. tricinctum* strain INRA104 and *F. avenaceum* strain FaLH27 were previously obtained [16, 17]. Their full annotation was performed and manually curated after comparison with sequences in GenBank and EMBL databases using BLASTn and BLASTp [43]. To identify protein coding genes, MtDNA sequences were searched for open reading frames (ORF) using the ORFfinder software (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). GeSeq [44] was further used for the annotation of *F. tricinctum* INRA104 and *F. avenaceum* FaLH27 guided by the mitochondrial genomes of *F. verticillioides*, *F. solani*, and *F. graminearum* as annotated in MiToFun (<http://mitofun.biol.uoa.gr/index.html>). Predictions were then crossed and confirmed by multi-alignments of nucleic acids and predicted protein sequences performed using Clustal Omega [45] and MUSCLE [46]. Mitochondrial transfer RNA genes (tRNAs) were located using the tRNA Scan-SE [47]. Mitochondrial maps and corresponding

Genbank files were generated using ApE (<http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>) and SnapGene software (from GSL Biotech; available at snapgene.com). Introns were first identified by Blast analysis. For each intron, its borders (5' and 3' ends) were established after deletion of the highly conserved exonic sequences of each mitochondrial CDS then confirmed by alignment with orthologous sequences. In the same way, the assignment to group I and subgroup were deduced from those given to their orthologous sequences, mainly in Al-Reedy et al. [18] or Ferandon et al. [22] for *cox1* introns.

DNA extraction and PCR

Whole genomic DNA was extracted according to the N-cethyl-NNN-trimethyl ammonium bromide (CTAB) procedure described in Barroso et al. [48].

Primers were designed to amplify and sequence nuclear and mitochondrial regions used as taxonomic and phylogenetic markers (Additional file 3: Table S4). These couples were defined from the alignment of the *F. tricinctum* and *F. avenaceum* nuclear gene sequences *rpb1*, *rpb2*, and of a part of the mitochondrial Lv-uORF. Primers were also designed to amplify each intron found in the mitochondrial sequences of *F. tricinctum* strain INRA104 or *F. avenaceum* strain FaLH27 (Additional file 3: Table S4). PCR mixes contained between 10 to 100 ng of fungal DNA, 1 µM of both primers, 100 µM of each dNTP, 2 units of GoTaq DNA polymerase (Promega Corp., Madison, Wis, USA) in a final volume of 50 µL buffer. PCR conditions were: 95 °C for 5 min; 35 x (95 °C for 30 s; primer hybridization at the indicated temperature (Additional file 3: Table S4) for 30 s; elongation at 72 °C for 90 to 120 s); 72 °C for 5 min.

DNA sequencing and sequence analysis

PCR products were sequenced, according to the Sanger method, on both strands by Genewiz (UK), with both forward and reverse primers used to obtain each PCR product.

GenBank Accession numbers of the sequenced PCR products are indicated in Additional file 3: Table S3. Sequence comparisons with GenBank and EMBL databases were performed with BLAST [43]. Multi-alignments of nucleic acids were performed with MUSCLE 3.8.31 [46] and subsequently cleaned with Gblocks 0.91b [49]. Phylogenetic trees were computed using MrBayes 3.2.7a [50, 51] and parameters (Additional file 3, Table S5) estimated with MEGA X [52]. Tree rendering was performed with FigTree 1.4.4, displaying posterior probabilities as branch supports obtained after 1,000,000 generations.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6770-2>.

Additional file 1: GenBank formatted annotated sequence of the *F. tricinctum* strain INRA104 MtDNA.

Additional file 2: GenBank formatted annotated sequence of the *F. avenaceum* strain FaLH27 MtDNA.

Additional file 3: Table S1. SNP and indel occurrence in *F. tricinctum* vs. *F. avenaceum* mitochondrial genomes. **Table S2.** Details of SNPs and Indels between *F. tricinctum* vs. *F. avenaceum* mitochondrial genomes.

Table S3. *F. tricinctum* and *F. avenaceum* strains and sequences (GenBank Accession N°) used in this study. **Table S4.** Primers and PCR conditions used in this study. **Table S5.** MrBayes input parameters estimated with MEGA X. **Figure S1.** Unrooted phylogenetic tree of *Fusarium* species and of distant or closely related Ascomycota species based on *cox1* complete CDS sequence alignment. Posterior probabilities (Bayesian inference; 1,000,000 generations) are indicated in red. Labels show species names followed by the name and/or number of the strain and the GenBank accession number corresponding to the sequence used. Basidio = Basidiomycota; Asco = Ascomycota; FSSC = *Fusarium solani* Species Complex; FSAMSC = *Fusarium sambucinum* Species Complex; FTSC = *Fusarium tricinctum* Species Complex; FOSC = *Fusarium oxysporum* Species Complex; FFSC = *Fusarium fujikuroi* Species Complex.

Figure S2. Nucleotide alignments of the interspecific polymorphic region between *F. tricinctum* and *F. avenaceum* of the mitochondrial large variable region containing the uORF for studied *F. tricinctum* and *F. avenaceum* strains.

Additional file 4: Table S6. Strains and sequences (GenBank Accession N°) used in this study

Abbreviations

Fave: *Fusarium avenaceum*; FFSC: *Fusarium fujikuroi* Species Complex; FHB: *Fusarium* Head Blight; FOSC: *Fusarium oxysporum* Species Complex; FSAMSC: *Fusarium sambucinum* Species Complex; FSSC: *Fusarium solani* Species Complex; Ftri: *Fusarium tricinctum*; FTSC: *Fusarium tricinctum* Species Complex; Indel: Insertion/deletion sequence; *hcg*: homing endonuclease gene; LSU-rDNA: Large subunit ribosomal DNA; MtDNA: Mitochondrial genome; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; SSU-rDNA: Small subunit rDNA; uORF: unidentified Open Reading Frame

Acknowledgements

The authors thank Manon Lecouffe and Solenne Reverbel for technical assistance.

Authors' contributions

All authors contributed to the study conception and design. NP, CG, LP-G, CD, CZ and GB prepared the material, performed the experiments and collected the data. Data analyses were performed by NP, JG, MF-O, FR-F, J-MS, CZ and GB. The first draft of the manuscript was written by NP and GB and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the National key research and development program of China (Program number 2016YFD0501207) and the Department of Microbiology of the Food Chain (MICA) of the French National Institute for Agricultural Research (INRA). CG PhD fellowship is funded by Region Nouvelle-Aquitaine and the INRAE Department SPE. These funding had no role in the design of the study, collection, analysis and interpretation of data or in writing the manuscript.

Availability of data and materials

All the sequences determined in this study have been deposited at GenBank (see text and Additional file 3 Table S3 for Accession numbers). All the sequences used for phylogenetic analyses have been retrieved from the GenBank. Their accession numbers are listed in additional file 4, Table S6.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Author details

¹INRAE, MycSA, F-33882 Villenave d'Ornon, France. ²LIPM, Université de Toulouse, INRAE, CNRS, Castanet-Tolosan, France. ³Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing, China. ⁴University of Bordeaux, INRAE, MycSA, F-33882 Villenave d'Ornon, France.

Received: 17 February 2020 Accepted: 4 May 2020

Published online: 12 May 2020

References

- Beccari G, Prodi A, Tini F, Bonciarelli U, Onofri A, Oueslati S, Limayma M, Covarelli L. Changes in the *Fusarium* Head Blight complex of malting barley in a three-year field experiment in Italy. *Toxins* (Basel). 2017;9(4):E120.
- Beccari G, Senatore MT, Tini F, Sulyok M, Covarelli L. Fungal community, *Fusarium* head blight complex and secondary metabolites associated with malting barley grains harvested in Umbria, Central Italy. *Int J Food Microbiol*. 2018;20(273):33–42.
- Jestoi M. Emerging *Fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008;48(1):21–49.
- Svingen T, Lund Hansen N, Taxvig C, Vinggaard AM, Jensen U, Have RP, Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high-content imaging platform. *Environ Toxicol*. 2017;32(5):1658–64.
- Xu XM, Monger W, Ritieni A, Nicholson P. Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of *Fusarium* species. *Plant Pathol*. 2007;56:943–56.
- Shi W, Tan Y, Wang S, Gardiner DM, De Saeger S, Liao Y, Wang C, Fan Y, Wang Z, Wu A. Mycotoxigenic potentials of *Fusarium* species in various culture matrices revealed by mycotoxin profiling. *Toxins* (Basel). 2016;9(1):E6.
- Fraeyman S, Croubels S, Devreese M, Antonissen G. Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: occurrence, toxicity and toxicokinetics. *Toxins* (Basel). 2017;9(7):E228.
- Orlando B, Grignon G, Vitry C, Kasheffard K, Valade R. *Fusarium* species and enniatin mycotoxins in wheat, durum wheat, triticale and barley harvested in France. *Mycotoxin Res*. 2019;35(4):369–80.
- Summerell B, Leslie JF. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? *Fungal Divers*. 2011;50:135–44.
- Saccardo M. F. *avenaceum*. *Sylloge fungorum* (Abellini). 1886;4:713.
- Saccardo M. F. *tricinatum*. *Sylloge fungorum* (Abellini). 1886;4:700.
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJN, Lysoe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S, Geiser DM. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important *Fusaria*. *Fungal Genet Biol*. 2013;52:20–31.
- Wang H, Xiao M, Kong F, Chen S, Dou HT, Sorrell T, Li RY, Xu YC. Accurate and practical identification of 20 *Fusarium* species by seven-locus sequence analysis and reverse line blot hybridization, and an in vitro antifungal susceptibility study. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1890–8.
- Waalwijk C, Taga M, Zheng SL, Proctor RH, Vaughan MM, O'Donnell K. Karyotype evolution in *Fusarium*. *IMA Fungus*. 2018;9(1):13–26.
- O'Donnell K, McCormick SP, Busman M, Proctor RH, Ward TJ, Doehring G, Geiser DM, Alberts JF, Rheeder JP. 2018. Marasas et al. "toxicogenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology" revisited. *Mycologia*. 1984;110(6):1058–80.
- Ponts N, Richard-Forget F, Zhang H, Barroso G, Zhao C. Genome sequence of the emerging mycotoxin-producing filamentous fungus *Fusarium tricinctum* strain INRA104. *Genome Announc*. 2018;6(25):e00509–18.
- Lysoe E, Harris LJ, Walkowiak S, Subramaniam R, Divon HH, Riiser ES, Llorens C, Gabaldón T, Kistler HC, Jonkers W, Kolseth AK, Nielsen KF, Thrane U, Frandsen RJ. The genome of the generalist plant pathogen *Fusarium avenaceum* is enriched with genes involved in redox, signaling and secondary metabolism. *PLoS One*. 2014;9(11):e112703.
- Al-Reedy RM, Malireddy R, Dillman CB, Kennell JC. Comparative analysis of *Fusarium* mitochondrial genomes reveals a highly variable region that encodes an exceptionally large open reading frame. *Fungal Genet Biol*. 2012;49(1):2–14.
- Brankovics B, van Dam P, Rep M, de Hoog GS, van der Lee TA J, Waalwijk C, van Diepeningen AD. Mitochondrial genomes reveal recombination in the presumed asexual *Fusarium oxysporum* species complex. *BMC Genomics*. 2017;18(1):735.
- Aguileta G, de Vienne DM, Ross ON, Hood ME, Giraud T, Petit E, Gabaldón T. High variability of mitochondrial gene order among fungi. *Genome Biol Evol*. 2014;6(2):451–65.
- Bullerwell CE, Burger G, Lang BF. A novel motif for identifying rps3 homologs in fungal mitochondrial genomes. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(8):363–5.
- Ferandon C, Moukha S, Callac P, Benedetto JP, Castroviejo M, Barroso G. The *Agaricus bisporus* *cox1* gene: the longest mitochondrial gene and the largest reservoir of mitochondrial group 1 introns. *PLoS One*. 2010;5(11):e14048.
- Pellenz S, Harington A, Dujon B, Wolf K, Schafer B. Characterization of the I-Spm1 endonuclease from fission yeast: insights into the evolution of a group I intron-encoded homing endonuclease. *J Mol Evol*. 2002;55(3):302–13.
- Paquin B, Laforest MJ, Lang BF. Double-hairpin elements in the mitochondrial DNA of Allomyces: evidence for mobility. *Mol Biol Evol*. 2000;17(11):1760–8.
- Tourasse NJ, Shtaida N, Khozin-Goldberg I, Boussiba S, Vallon O. The complete mitochondrial genome of the green microalga *Lobosphaera (Parietochloris) incisa* reveals a new type of palindromic repetitive repeat. *BMC Genomics*. 2015;16:580.
- Kim JI, Yoon HS, Yi G, Shin W, Archibald JM. Comparative mitochondrial genomics of cryptophyte algae: gene shuffling and dynamic mobile genetic elements. *BMC Genomics*. 2018;19:275.
- Nargang FE, Bell JB, Stohl LL, Lambowitz AM. A family of repetitive palindromic sequences found in *Neurospora* mitochondrial DNA is also found in a mitochondrial plasmid DNA. *J Biol Chem*. 1983;258(7):4257–60.
- Yin S, Heckman J, RajBhandary UL. Highly conserved GC-rich palindromic DNA sequences flank tRNA genes in *Neurospora crassa* mitochondria. *Cell*. 1981;26(3 Pt 1):325–32.
- Koll F, Boulay J, Belcour L, D'Aubenton-Carafa Y. Contribution of ultra-short invasive elements to the evolution of the mitochondrial genome in the genus *Podospora*. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(9):1734–41.
- Wu B, Hao W. A Dynamic Mobile DNA Family in the Yeast Mitochondrial Genome. *G3 (Bethesda)*. 2015;5(6):1273–82.
- Kulik T, Brankovics B, Sawicki J, van Diepeningen A. The complete mitogenome of *Fusarium gerlachii*. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 2016;27(3):1895–6.
- Kulik T, Brankovics B, Sawicki J, van Diepeningen A. The complete mitogenome of *Fusarium culmorum*. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*. 2016;27(4):2425–6.
- Ferandon C, Xu JP, Barroso G. The 135 kbp mitochondrial genome of *Agaricus bisporus* is the largest known eukaryotic reservoir of group I introns and plasmid-related sequences. *Fungal Genet Biol*. 2013;55:85–91.
- Cusimano N, Zhang LB, Renner SS. Reevaluation of the *cox1* group I intron in Araceae and angiosperms indicates a history dominated by loss rather than horizontal transfer. *Mol Biol Evol*. 2008;25(2):265–76.
- Sanchez-Puerta MV, Cho Y, Mower JP, Alverson AJ, Palmer JD. Frequent, phylogenetically local horizontal transfer of the *cox1* group I intron in flowering plant mitochondria. *Mol Biol Evol*. 2008;25(8):1762–77.
- Goddard MR, Burt A. Recurrent invasion and extinction of a selfish gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):13880–5.
- Gonzalez P, Barroso G, Labarère J. Molecular analysis of the split *cox1* gene from the Basidiomycota *Agarocybe aegerita*: relationship of its introns with homologous Ascomycota introns and divergence levels from common ancestral copies. *Gene*. 1998;220(1–2):45–53.
- Koufopanou V, Goddard MR, Burt A. Adaptation for horizontal transfer in ahoming endonuclease. *Mol Biol Evol*. 2002;19(3):239–46.
- Gogarten JP, Hilario E. Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC Evol Biol*. 2006;6:94.

40. Leslie JF, Summerell BA. Fusarium laboratory workshops-a recent history. *Mycotoxin Res.* 2006;22(2):73–4.
41. Turner S, Lees AK, Rezanoor HN, Nicholson P. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathol.* 1998;47:278–88.
42. Sonia E, Siou D, Gélisse S, Cruaud C, Lannou C, Lebrun MH, Laval V. Optimized real time QPCR assays for detection and quantification of Fusarium and Microdochium species involved in wheat head blight as defined by MIQE guidelines. *bioRxiv.* 2018. <https://doi.org/10.1101/272534>.
43. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403–10.
44. Tillich M, Lehwark P, Pellizzer T, Ulbricht-Jones ES, Fischer A, Bock R, Greiner S. GeSeq - versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:W6–W11.
45. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011;11(7):539.
46. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792–7.
47. Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(5):955–64.
48. Barroso G, Blesa S, Labarere J. Wide distribution of mitochondrial genome rearrangements in wild strains of the cultivated Basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:1187–93.
49. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 2000;17:540–52.
50. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001;17:754–5.
51. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19:1572–4.
52. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547–9.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Décrypter la modulation de la biosynthèse d'enniatines par *Fusarium avenaceum* sous l'effet de stress abiotiques

Fusarium avenaceum est un champignon filamenteux pathogène de nombreuses plantes et est un des acteurs majeurs de la fusariose de l'épi chez le blé et l'orge. Durant l'infection, des métabolites secondaires toxiques pour l'homme et les animaux (mycotoxines) telles que les enniatines sont produites par ce champignon. Les enniatines appartiennent au groupe de mycotoxines dites « émergentes » : même si connues depuis 1950, leur présence en quantités importantes et croissantes dans les aliments n'a été mise en évidence que depuis une vingtaine d'année. Actuellement la présence d'enniatines n'est pas surveillée de manière systématique dans les récoltes céréalières, les enniatines ne sont pas soumises à réglementation alors qu'elles sont omniprésentes dans les récoltes et parfois à des concentrations élevées. La diversité des souches productrices ainsi que les mécanismes par lesquels la biosynthèse d'enniatines peut être modulée au cours de l'infection de la plante et/ou en réponse aux conditions environnementales sont mal connus. Ce manque de connaissances constitue un frein à la mise au point d'outils de contrôle et de gestion de l'état sanitaire des récoltes. C'est pourquoi cette étude s'est attachée à apporter de premiers éléments de réponse sur la diversité phénotypique au sein de l'espèce *F. avenaceum*. Un des facteurs étudiés a concerné la réponse aux variations de pH en termes de croissance et de toxogénèse et a mis en évidence des comportements très différents entre les isolats. Pour aller plus loin, le rôle de *FavPac1*, l'homologue de *pacC/RIM101* codant un facteur de régulation de l'homéostasie du pH chez les champignons, a été étudié. Des mutants délétés pour ce gène, mutants *FavΔPac1*, ont été construits pour quatre souches de *F. avenaceum* et ont permis de suggérer l'implication de ce facteur de transcription non seulement dans la régulation de l'expression des gènes de biosynthèse, mais aussi dans la modulation de la production d'enniatines en réponse au pH. Enfin, dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs naturels pouvant se substituer aux fongicides de synthèse, nos travaux ont démontré la capacité de certains composés phénoliques à inhiber la production d'enniatines associée à un contrôle transcriptionnel des gènes de biosynthèse et ont mis en évidence l'efficacité élevée de l'acide férulique.

Mots-clés : *Fusarium avenaceum*, enniatines, diversité intraspécifique, pH, *FavPac1*, régulation, composés phénoliques.

Deciphering the modulation of enniatins biosynthesis by *Fusarium avenaceum* under the effect of abiotic stress

Fusarium avenaceum is a filamentous fungus infecting many plants and is one of the causal agents of the *Fusarium* Head Blight disease in wheat and barley. During plant infection, the fungus can produce secondary metabolites that are toxic for human and livestock (mycotoxins), among which the enniatins. Enniatins belong to the group of "emerging mycotoxins": first identified as early as 1950, the increasing occurrence of enniatins has only been documented over the last twenty years. Currently, enniatins are neither routinely analysed in grain harvests nor legislatively regulated, even though they are widespread and can be encountered in high concentrations. Diversity of enniatin-producing strains as well as the mechanisms by which their biosynthesis can be modulated during plant infection and/or in response to environmental conditions are poorly known. These gaps of knowledge hinder the development of tools for controlling and mitigating their presence in crops. In the present study, a comprehensive characterisation of the phenotypic diversity within the *F. avenaceum* species has been carried out. One of the studied phenotypic traits was the effect of pH variations on the fungal growth and toxin production, which has led to evidence various response profiles between strains. To go further, the role of *FavPac1*, the homologue of *pacC/RIM101* encoding a transcriptional factor involved in the response to ambient pH in fungi, has been studied. Construction and phenotyping of deleted mutants, *FavΔPac1*, for four different *F. avenaceum* isolates have allowed suggesting an involvement of *FavPac1* in the modulation of enniatin production and of the expression of biosynthetic genes induced by pH variations. Lastly, with the aim to identify alternatives to synthetic fungicides, the capacity of plant phenolic compounds to inhibit the yield of enniatins has been investigated. The antifungal and anti-mycotoxin properties of hydroxycinnamic acids has been shown; ferulic acid has been highlighted as the most potent compound.

Keywords: *Fusarium avenaceum*, enniatins, intraspecific diversity, pH, *FavPac1*, regulation, phenolic compounds.