

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Laboratoire : Institut de Biologie des Plantes

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 21/11/2014

par

Jean-Claude Pasquet

Détoxification des mycotoxines par les plantes :
analyse de l'interaction entre *Brachypodium*
distachyon et *Fusarium graminearum*

Composition du jury :

<i>Président :</i>	Graham NOCTOR	PR, Université Paris-Sud - IBP - Orsay
<i>Directrice de thèse :</i>	Marie DUFRESNE	MC, Université Paris-Sud - IBP - Orsay
<i>Rapporteurs :</i>	Christian BARREAU	CR, INRA - MycSA - Villenave d'Ornon
	Philippe POTIN	DR, CNRS - Station Biologique de Roscoff - Roscoff
	Thierry LANGIN	DR, CNRS - GDEC - Clermont-Ferrand
<i>Examineurs :</i>	Marc-Henri LEBRUN	DR, CNRS - BIOGER - Versailles/Grignon

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci à Christian Barreau, Philippe Potin, Thierry Langin, Marc-Henri Lebrun et Graham Noctor pour le temps que vous allez consacrer à lire et à examiner ce manuscrit.

Je pense que la décision de faire une thèse est dépendante des différents conseils reçus et des expériences vécues. C'est pourquoi je voudrais commencer par remercier trois personnes qui ont énormément contribué à ce choix. Muriel Bonnet pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer mon stage d'IUT. Merci de m'avoir fait découvrir la science à travers ta gentillesse, ta bonne humeur et de m'avoir enseigné une partie de cette rigueur nécessaire. Benoit Alunni : que de bons souvenirs pendant les TP de M1... Merci pour nos discussions sur les parcours recherche et professionnel en M2 ! Sans toi mon choix aurait été tout autre. C'est un plaisir de t'avoir rencontré et de pouvoir continuer à parler de tout et de rien avec toi. Marie, comment ne pas t'associer à ce choix de faire de la recherche ? Tu as été déterminante.

Marie, je pense que cette partie ne sera pas suffisante pour te remercier comme il se doit. Merci d'avoir accepté d'être « ma chef », en commençant par ce stage de 6 mois, de m'avoir donné l'opportunité à mon échelle de participer au projet scientifique que tu développais et d'avoir accepté de me présenter au concours au risque de devoir me supporter 3 ans de plus (4 maintenant !). Je veux te remercier de m'avoir accompagné, pendant tout ce travail, scientifiquement par nos échanges, par la liberté que tu m'as laissée et par la confiance que tu m'as accordée tout en laissant libre cours à mes idées, humainement ta gentillesse et ta disponibilité pour parler d'autres choses que de science étaient également nécessaires au bon déroulement de cette thèse. C'est donc avec un grand MERCI que je conclus ce petit paragraphe, sûr que cette nouvelle année à tes côtés, avec un peu d'enseignement, sera aussi agréable et enrichissante que les précédentes.

Merci à Michel Dron de m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Biologie des plantes.

Merci Patrick de m'avoir accueilli au sein de l'équipe pendant tout ce temps, d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions (il risque d'y en avoir encore beaucoup

d'autres d'ici peu). J'espère que nous continuerons en d'autres occasions à échanger nos points de vue.

Un grand merci à toute l'équipe d'avoir participé de près ou de loin à ce travail. Catherine, merci pour ton aide et ta gentillesse parce que Brachy c'est bien gentil mais heureusement que tu étais là sinon je ne m'en serais pas sorti tout seul. Les anciens : Laure, Kamal, ce fut un plaisir de vous côtoyer pendant le début de cette thèse. Jean-Marc merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et surtout pour les petits pains au chocolat le matin (ne t'inquiètes pas Albert arrive !).

Je tiens également à remercier les différents stagiaires qui ont travaillé à mes cotés pendant 3 ans : Julie, Rémy, Valentin ce fut une expérience enrichissante et un plaisir de vous encadrer. Audrey, merci d'avoir partagé avec moi le bureau ces derniers temps et c'est promis, je ne pesterai/râlerai plus après l'ordinateur maintenant que la rédaction se termine !

Séjir ce fut un plaisir de travailler à tes côtés pendant ton post-doc. Merci de m'avoir initié à la métabolomique malgré une HPLC parfois capricieuse, sauf avec toi !

Edouard, merci pour tout ! Les discussions de sciences ou non, les « nocturnes » avec une petite mousse ou camomille et ta grande aide dans mon apprentissage de la biochimie qui reste à parfaire.

2011, fut une « bonne » année pour les nouvelles thèses à l'IBP du moins de mon point de vue... Linda, Quentin, Manon, le M2 fut agréable à vos côtés, la thèse encore plus et c'est un plaisir d'avoir fait ce chemin en votre compagnie, Manon tu as maintenant le privilège d'être la dernière thésarde de cet institut. Merci à vous trois.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu interagir pendant ces 3 ans et qui ont contribué de différentes manières à ce travail. La liste n'est probablement pas exhaustive et, par avance, je présente mes excuses aux personnes que je pourrais oublier de nommer. Merci à tous. Les services communs : Jean-Paul, Eric, Sophie M, Gilles et l'équipe de la laverie, sans vous rien ne serait possible. Sylviane (les M&M's c'est fini !), Teddy (oui je ressors de mon bureau), Séverine (heureusement que tu étais là pour la cytologie encore merci pour ta patience), Vincent (Monsieur primers !), Marie G, Maryelle, Elodie, Chouaib, Anso, Thomas, Sam, Younès (futur pongiste ?), Cécile, Caroline, Laure A et Cyril merci à tous pour les différents moments partagés avec chacun d'entre vous.

Je tiens également à remercier les membres de mes comités de thèse pour leurs précieux conseils dans l'orientation de ce travail : Jean-Benoit Morel, Thierry Langin et Marc-Henri Lebrun merci à vous trois.

Je voudrais également remercier Vessela-Atanasova Penichon sans qui les dosages de mycotoxines n'auraient pas pu être faits. Merci pour ton accueil à Bordeaux, sans toi je n'aurais jamais su qu'un simple sucre peut rendre une plante résistante !

Enfin un grand merci aux personnes qui m'ont soutenu pendant ces 3 ans : mes amis, ma famille, merci à tous, une mention spéciale au petit tas ; merci d'être toi même ne change rien.

ABREVIATIONS

3-ADON : 3-acétyldéoxynivalénol

3,15-diANIV : 3,15-diacétylnivalénol

4-ANIV : 4-acétylnivalénol

4,15-diANIV : 4,15-diacétylnivalénol

15-ADON : 15-acétyldéoxynivalénol

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

BOA : benzoxazolin-2(3*H*)-one

CYP : cytochrome P450 monooxygénase

DIBOA : 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one

DIMBOA : 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-1,4-benzoxazin-3-one

DON : déoxynivalénol

DON-GSH : déoxynivalénol-glutathion

D3G : DON-3-*O*-glucoside

eQTL : expression Quantitative Trait Locus (locus à effet quantitatif sur l'expression d'un gène)

ET : éthylène

FHB : Fusarium Head Blight

GST : glutathion-*S*-transférase

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDA : kilo Dalton

LB : Luria-Bertani

min : minute

ml : millilitre

mM : milliMolaire

Mb : mégabases

Mt : million de tonnes

ng : nanogramme

pb : paire de bases

PCD : Programmed Cell Death (mort cellulaire programmée)

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PDA : Potato Dextrose Agar

ppb : partie par milliard

ppm : partie par million

PSPG : Plant Secondary Product Glycosyltransferase

p/v : poids/volume

NIV : nivalénol

qPCR : quantitative PCR (PCR quantitative)

QTL : Quantitative Trait Locus (locus à effet quantitatif)

s : seconde

TCT : trichothécène

t/ha : tonne/hectare

TILLING : Targeting Induced Local Lesions in Genomes (ciblage de mutations ponctuelles induites dans les génomes)

tr/min : tour par minute

UDP : uridine diphosphate

µg : microgramme

UGT : UDP-glycosyltransférase

µl : microlitre

µM : microMolaire

v/v : volume/volume

ZEA : zéaralénone

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

- Figure 1 :** Répartition et estimation de la production mondiale de blé pour 2014/2015.
- Figure 2 :** Cycle de développement du blé tendre.
- Figure 3 :** Cycle infectieux de *Fusarium graminearum*.
- Figure 4 :** Symptômes de fusariose sur épis et grains de blé.
- Figure 5 :** Structure chimique des trichothécènes de type B produits par *F. graminearum*.
- Figure 6 :** Organisation et fonctionnalité des gènes *Tri* chez *F. graminearum* en fonction du chémotype.
- Figure 7 :** Voie de biosynthèse des trichothécènes de type B.
- Figure 8 :** Représentation de la progression des symptômes et de l'expression du gène *Tri5* dans des épillets de blé infectés par *F. graminearum*.
- Figure 9 :** Grille d'aide à la décision pour un traitement fongicide contre la fusariose des épis.
- Figure 10 :** Sensibilité de différentes variétés françaises de blé tendre à la fusariose des épis.
- Figure 11 :** Processus de détoxification des xénobiotiques chez les plantes.
- Figure 12 :** Nomenclature des UGTs de la famille 1 chez les plantes.
- Figure 13 :** Séquence protéique consensus définissant le motif « plant secondary product glycosyltransferase » (PSPG).
- Figure 14 :** Arbre phylogénétique d'UGTs de la famille 1.
- Figure 15 :** Voie de biosynthèse des benzoxazinoïdes chez le maïs (*Zea mays*).
- Figure 16 :** Relations phylogénétiques dans la famille des *Poaceae*.
- Figure 17 :** Structure de l'appareil racinaire chez le blé (gauche) et chez *B. distachyon* (droite).

CHAPITRE 1

- Figure 18 :** Diagramme de Venn montrant l'accumulation différente de transcrits après application de DON ou dans la comparaison des infections par les souches *FgDON*⁺ et *FgDON*⁻.
- Figure 19 :** Transcrits codant des protéines impliquées dans la biosynthèse de l'éthylène (ET) ou dans la réponse à l'ET.
- Figure 20 :** Transcrits codant des protéines impliquées dans la répression de la mort cellulaire programmée.

CHAPITRE 3

Figure 21 : Formes conjuguées des TCT A et B actuellement connues.

Figure 22 : Production et purification de la protéine Bradi5g03300.

Figure 23 : Révélation de l'activité enzymatique de Bradi5g03300.

Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de la croissance racinaire sur un milieu contenant des mycotoxines.

Figure 25 : Croissance racinaire sur un milieu contenant du 15-ADON.

Figure 26 : Symptômes de FHB après inoculation par pulvérisation des souches INRA162 (NIV) et *Fg3ADON* (3-ADON).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Figure 27 : Voie de biosynthèse de l'éthylène.

Figure 28 : Diagrammes de Venn indiquant l'abondance relative des transcrits induits codant des UGTs (A) et des GSTs (B) en fonction des conditions.

Figure 29 : Réactions enzymatiques catalysées par les CYP76C1, C2 et C4 chez *Arabidopsis*.

Figure 30 : Substrats connus des UGTs du groupe L chez *A. thaliana*.

Figure 31 : Impact du DON sur la cellule végétale.

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1 : Production mondiale de céréales en 2014.

Tableau 2 : Principales maladies fongiques et virales du blé.

Tableau 3 : *Fusarium* spp. associés à la FHB et leurs mycotoxines.

Tableau 4 : Expression du gène *Tri5* en fonction du stade d'avancée de la maladie.

Tableau 5 : Classification des types de résistance à la FHB chez les céréales.

Tableau 6 : Liste des agents pathogènes testés sur la plante modèle *B. distachyon*.

Tableau 7 : Espèces pathogènes utilisées dans l'étude Sandoya and Buanaфина (2014).

CHAPITRE 1

Tableau 8 : Proportions relatives des catégories fonctionnelles représentées par les transcrits différentiellement accumulés selon les différentes conditions (en %).

CHAPITRE 2

Tableau 9 : Pourcentage d'identité/similarité des séquences protéiques de *Brachypodium distachyon* orthologues d'HvUGT13248.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Tableau 10 : UGTs impliquées dans la glucosylation de mycotoxines en système hétérologue levure.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	4
A. Le blé tendre.....	5
B. La fusariose des épis	6
C. Les mycotoxines produites par <i>F. graminearum</i>	8
1. Voie de biosynthèse des trichothécènes de type B chez <i>F. graminearum</i>	9
2. Toxicité des trichothécènes de type B.....	10
a. Toxicité animale	11
b. Phytotoxicité.....	11
3. Régulation de la production de TCT B <i>in vitro</i> et <i>in planta</i>	12
D. Stratégies de contrôle de la fusariose des épis	14
1. Les pratiques culturales.....	14
2. La lutte chimique	14
3. La résistance génétique et les caractères associés	15
E. Les approches « -omiques » pour la compréhension de la résistance à la FHB.....	18
F. Les UGTs des acteurs majeurs dans les processus de détoxification	19
1. Les processus de détoxification chez les plantes	19
2. Les glycosyltransférases du métabolisme secondaire	21
a. Spécificité de substrats des UDP-glycosyltransférases.....	22
b. Implication des UGTs dans la biosynthèse et/ou la protection contre des métabolites secondaires endogènes.....	23
3. UGTs et détoxification de fusariotoxines.....	25
G. <i>Brachypodium distachyon</i> un modèle végétal pour les graminées.....	26
1. Un modèle pour l'organisation des génomes	27
2. Analyses fonctionnelles <i>in planta</i> : quels outils disponibles ?	27
3. Processus biologiques étudiés	28
a. La saccharification un élément majeur pour la production de bioéthanol	28
b. Etude des stress abiotiques et biotiques.....	29
H. Objectifs de la thèse	30
CHAPITRE 1 : Caractérisation macroscopique, transcriptomique et métabolomique de l'interaction entre <i>B. distachyon</i> et <i>F. graminearum</i>	32
Introduction	33
Article 1 : Differential gene expression and metabolomic analyses of <i>Brachypodium distachyon</i> infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of <i>Fusarium graminearum</i>.....	35
Résultats complémentaires	36
Conclusion.....	37
CHAPITRE 2 : Analyse phylogénétique des UGTs de <i>B. distachyon</i> et recherche de candidats conjuguant le DON en D3G	39
Introduction	40
Article 2 : Functional Characterization of Two Clusters of <i>Brachypodium distachyon</i> UDP-Glycosyltransferases Encoding Putative Deoxynivalenol Detoxification Genes	43

Conclusion.....	44
CHAPITRE 3 : Analyse fonctionnelle du gène <i>Bradi5g03300</i>	46
Introduction	47
Article 3 : The UDP-glucosyltransferase <i>Bradi5g03300</i> confers root tolerance to deoxynivalenol and resistance to <i>Fusarium graminearum</i> in <i>Brachypodium distachyon</i>.....	49
Résultats complémentaires	50
Analyse de la protéine recombinante <i>Bradi5g03300</i>	50
Phytotoxicité du nivalénol, du 3-acétyldéoxynivalénol et du 15- acétyldéoxynivalénol.....	50
Tests d'infection par des souches de <i>F. graminearum</i> de différents chémotypes (NIV/4-ANIV et DON/3-ADON).....	51
Conclusion.....	53
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	55
A. L'interaction entre <i>B. distachyon</i> et <i>F. graminearum</i>	56
1. Symptômes macroscopiques et cycle infectieux	56
2. Impact de la production de DON sur le potentiel infectieux de <i>F. graminearum</i> sur les épis.....	56
3. Impact du DON sur les mécanismes de défense de la plante	57
B. UDP-glucosyltransférases et détoxification des fusariotoxines	62
1. Analyse phylogénique des UGTs de <i>B. distachyon</i> et recherche de candidats conjuguant le DON en D3G	62
2. Impact de l'altération de <i>Bradi5g03300</i> sur le développement de la FHB chez <i>B. distachyon</i>	64
3. <i>Bradi5g03300</i> est-elle impliquée vis-à-vis d'autres TCT B ? Possède-t-elle un substrat endogène ? 66	
MATERIELS ET METHODES	71
A. Matériel végétal.....	72
1. Lignées sauvages et conditions de culture	72
2. Obtention de lignées altérées dans la protéine <i>Bradi5g03300</i>	72
3. Obtention de lignées surexprimant le gène <i>Bradi5g03300</i>	72
B. Agents pathogènes.....	73
1. Maintenance des souches de <i>F. graminearum</i>	73
2. Production de conidies	74
C. Traitements	74
1. Inoculation par <i>F. graminearum</i>	74
2. Application de déoxynivalénol.....	74
3. Evaluation de la phytotoxicité des mycotoxines	75
4. Traitement à la sérotonine de <i>F. graminearum in vitro</i>	75
D. Manipulations des acides nucléiques.....	76
1. Extraction d'ADN	76
2. Extraction d'ARN	76
3. RT-PCR quantitative.....	77
4. Analyse des résultats de qPCR.....	77
E. Test de résistance aux agents pathogènes	78
1. Quantification de l'ADN fongique dans des tissus infectés	78
2. Quantification des spores sur tissus infectés.	78

3.	Détection de la colonisation fongique du rachis	78
4.	Evaluation des symptômes	78
5.	Analyses microscopiques	79
F.	Analyses métabolomiques	79
1.	Extraction et quantification de mycotoxines <i>in planta</i>	79
2.	Extraction et analyse de métabolites secondaires.....	80
G.	Protéine récombinante	81
1.	Construction du vecteur d'expression de la protéine Bradi5g03300.....	81
2.	Production de la protéine recombinante Bradi5g03300	81
3.	Purification de la protéine Bradi5g03300	81
4.	Vérification de la qualité de la protéine purifiée	82
4.1.	Electrophorèse sur gel	82
4.2.	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	82
4.3.	Immunodétection des protéines	83
5.	Test d'activité enzymatique UDP-glucosyltransférase	83
6.	Révélation de l'activité UDP-glucosyltransférase.....	83
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	84
	ANNEXES.....	104

INTRODUCTION

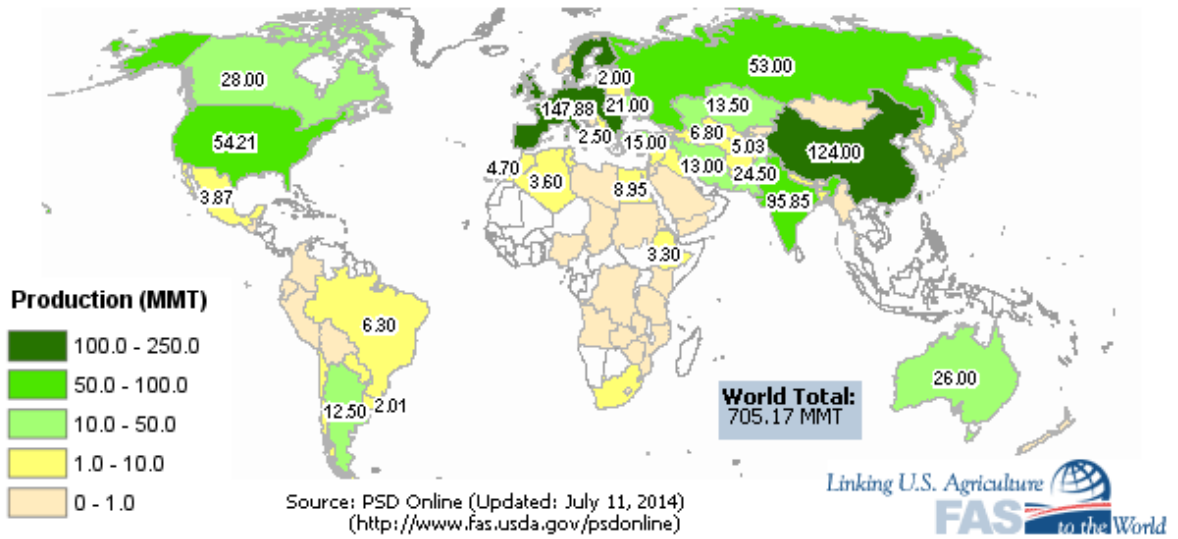


Figure 1 : Répartition et estimation de la production mondiale de blé pour 2014/2015.
 MMT : Million metric tons = millions de tonnes (<http://www.pecad.fas.usda.gov>).

Tableau 1 : Production mondiale de céréales en 2012 (source : International Grains Council).

Céréales	Production (millions de tonnes)
Maïs	877
Blé	695
Riz	467
Orge	134

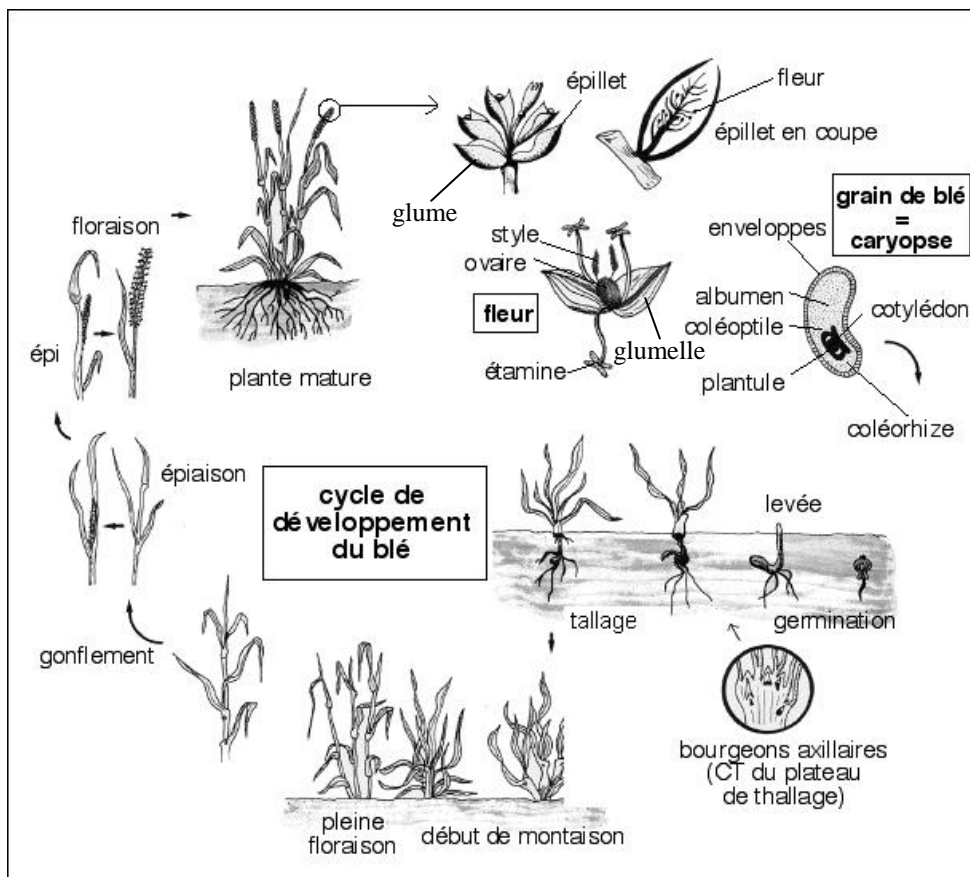


Figure 2 : Cycle de développement du blé tendre (<http://acces.ens-lyon.fr/>).

A. Le blé tendre

Les céréales sont une source de nourriture pour l'homme depuis des milliers d'années. Le riz (*Oryza sativa*) a été domestiqué il y a environ 10 000 ans en Chine. Le maïs (*Zea mays*) et le blé (*Triticum spp*) l'ont également été à la même période, respectivement au sud du Mexique en Amérique centrale et dans le Croissant Fertile au Moyen Orient (Awika, 2011). Mais le 21^{ème} siècle met l'agriculture face à de nouveaux enjeux. En effet, la production mondiale de céréales devra augmenter de 50% pour atteindre 3 milliards de tonnes en 2050 afin de nourrir les 9,1 milliards d'êtres humains (FAO, 2014). D'autre part, l'évolution des connaissances et de la société imposent une production agricole garantissant la qualité nutritionnelle, le respect de l'environnement ainsi que la sécurité sanitaire.

Le blé est l'une des quatre grandes céréales d'importance mondiale avec le maïs, l'orge (*Hordeum vulgare*) et le riz. La production de blé a atteint 710 millions de tonnes (Mt) en 2013. Le blé est surtout produit dans des pays de l'hémisphère nord (**Figure 1**), c'est la seconde production mondiale de céréales derrière le maïs (**Tableau 1**) et elle a triplé en 50 ans (222 Mt en 1961) (IGC, 2012). La Chine et l'Inde sont les principaux pays producteurs de blé dans le monde (près de 30% de la production mondiale en 2010 à eux deux). La production de blé en France a atteint 36,7 Mt en 2014 soit de 25% de la production européenne (environ 135 Mt). La France possède la plus forte productivité avec 7,5 tonnes/hectare (t/ha) alors que des pays comme la Russie ou l'Inde ont une productivité inférieure à 3 t/ha (Awika, 2011).

En France, le blé tendre d'hiver ou « blé d'hiver » se sème durant le mois d'octobre. Son développement (**Figure 2**) commence par la germination de la graine, la formation d'une racine et d'une feuille. La jeune plantule va continuer de croître pour atteindre le stade « 3 feuilles », qui est un stade repère dans le développement. A partir de ce stade, le blé entre en vernalisation. Du début de l'hiver jusqu'au printemps, le blé va être dans un développement végétatif et former des talles. Le tallage est caractérisé par l'apparition d'une ou plusieurs tiges secondaires qui, lors de la floraison, donneront des épis. En France, vers le mois de mai ou juin se produit l'épiaison qui correspond au moment où l'épi formé dans la gaine provoque son éclatement. Par la suite, l'épi va atteindre un stade dit de mi-anthèse correspondant à 50% des fleurs de l'épi ayant atteint la floraison. La floraison s'observe chez le blé par l'apparition d'anthères extrusives qui vont entre-ouvrir les épillets en écartant les glumelles, parties stériles, et ainsi être exposées à l'air libre. Le blé tendre est majoritairement autogame : il y a 8 à 9% d'allogamie naturelle par le vent. Environ deux semaines après la floraison le blé

Tableau 2 : Principales maladies fongiques et virales du blé.

(d'après W H E AT - Global Alliance for Improving Food Security and the Livelihoods of the Resource-poor in the Developing World)

Maladie / agent pathogène	Asie de l'Est	Asie du Sud	Asie de l'Ouest	Asie centrale / Caucase	Afrique Centrale, de l'Est et du Nord	Afrique Sub-Saharienne	Amérique latine / Mexique	Pays développés*
Rouille brune / <i>Puccinia triticina</i>	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
Rouille de la tige / <i>Puccinia graminis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Rouille jaune / <i>Puccinia striiformis</i>	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++
Fusariose des épis / complexe de la fusariose	+++	0	+	0	0	0	++	+++
Septorioses / <i>Zymoseptoria tritici</i> et <i>Phaeosphaeria nodorum</i>	+	0	++	++	+++	++	++	+++
Taches helminthosporiennes / <i>Cochliobolus sativus</i>	+	++	0	0	0	+	+	0
Taches helminthosporiennes / <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	0	+	0	+++	+	0	++	++
Charbon et caries / <i>Tilletia tritici</i> et <i>T. laevis</i>	+	+	++	+	++	+	+	0
Pyriculariose du blé / <i>Magnaporthe grisea</i>	0	0	0	0	0	0	+	0
Oïdium / <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	++	+	0	0	0	0	+	++
Virus de la jaunisse nanisante de l'orge	+	+	+	+	+	+	+	+

Les symboles "+" représentent l'importance économique des maladies

+ important mais uniquement localement

++ important

+++ très important

0 aucune importance

*Amérique du Nord, Europe et Australie

commence à changer de couleur ; le vert disparaît pour tendre vers le jaune - doré. La maturation des grains se poursuit pendant environ 45 jours après la floraison. Pendant cette maturation, le grain passe par différents stades : laiteux, puis pâteux au cours desquels la teneur en amidon augmente et le taux d'humidité diminue.

Les principales maladies du blé sont causées par des agents pathogènes d'origine fongique ou virale et n'ont pas toutes la même importance en fonction des régions géographiques (**Tableau 2**). Celles-ci peuvent se développer sur différents organes de la plante comme les feuilles ou les épis. Les principales maladies foliaires sont : les septorioses causées par *Phaeosphaeria nodorum* et *Mycosphaerella graminicola* et les rouilles causées par *Puccinia striiformis* et *P. triticina*. La fusariose est une des maladies majeures des épis des céréales provoquée par un complexe d'espèces fongiques.

B. La fusariose des épis

La fusariose des épis (Fusarium head blight ou FHB) peut être associée à différentes céréales telles que le blé tendre (*Triticum aestivum*), l'orge (*Hordeum vulgare*), le maïs (*Zea mays*), le triticale (*Triticosecale* spp.), l'avoine (*Avena sativa*), le seigle (*Secale cereale*) et le riz (*Oryza sativa*) (Bottalico and Perrone, 2002; He et al., 2007; Lee et al., 2009; Xu and Nicholson, 2009).

La fusariose de l'épi est l'une des principales sources de dégâts sur les céréales à paille dans le monde. Elle a été décrite pour la première fois en Angleterre en 1884 sous la dénomination de « wheat scab » et n'a depuis cessé de progresser à l'échelle mondiale. Des épidémies ont été rapportées en Asie, au Canada, en Europe et en Amérique du Nord (Goswami and Kistler, 2004). En Europe du Nord et aux Etats-Unis, les pertes peuvent atteindre 40% de la récolte (McMullen et al., 1997; Goswami and Kistler, 2004; Kazan et al., 2012). Les pertes directes (avortement précoce des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains, altération de la qualité nutritive des grains (Pirgozliev et al., 2003)) et indirectes dues à la fusariose sur blé et orge sont difficilement estimables au niveau mondial. Les pertes directes ont été chiffrées à 2,5 milliards de dollars entre 1993 et 2001 aux Etats-Unis tandis que les pertes indirectes ont été estimées à 5,2 milliards de dollars pour cette même période (Nganje et al., 2004).

La fusariose des épis est due à un complexe d'une vingtaine d'espèces fongiques des genres *Fusarium* et *Microdochium*. *Fusarium graminearum* est considérée comme l'espèce responsable de la majorité des dégâts imputés à cette maladie en Europe et en Amérique du

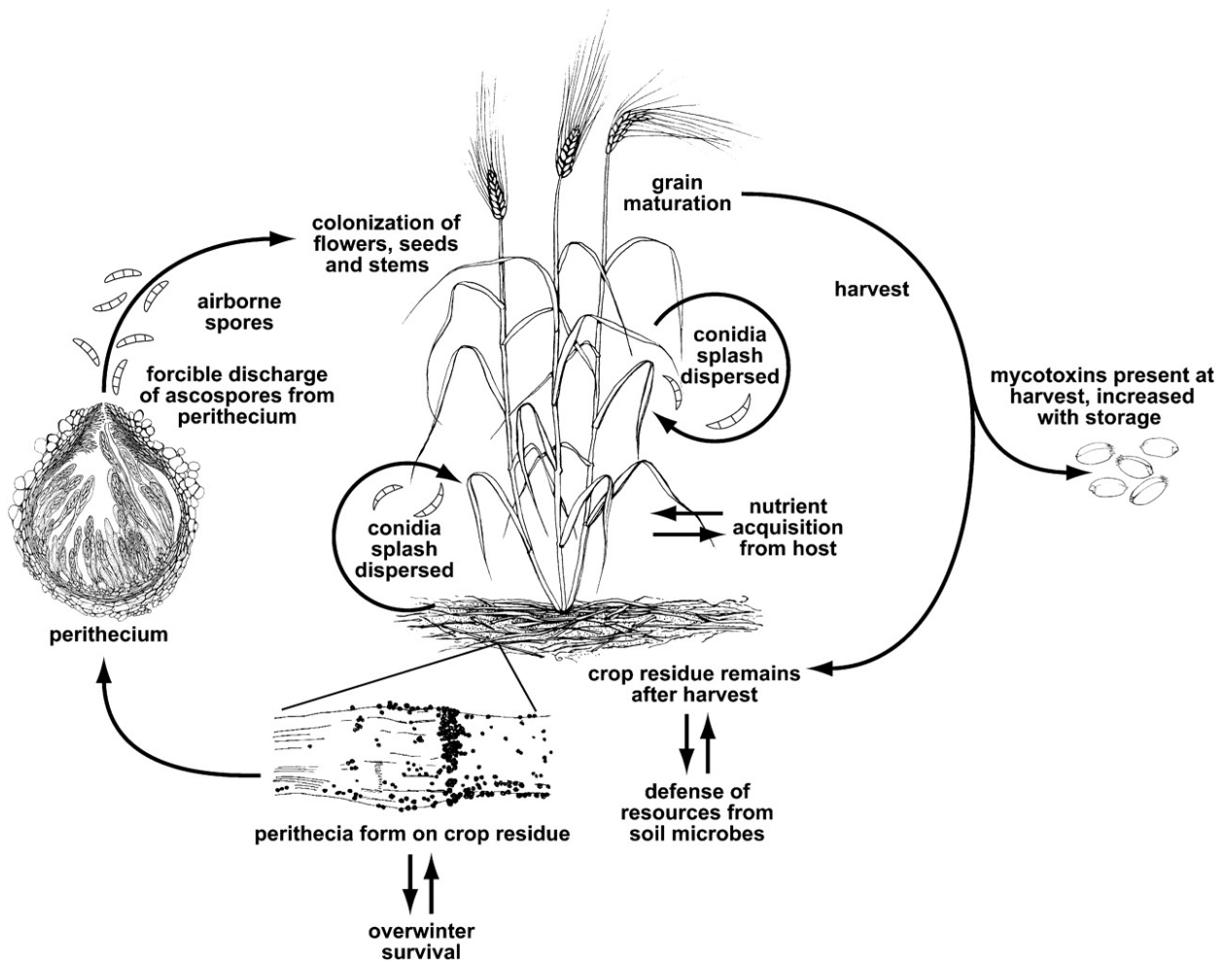


Figure 3 : Cycle infectieux de *Fusarium graminearum* (Trail, 2009).

Nord (Walter et al., 2010). Les espèces *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*, (Logrieco et al., 2002; Xu and Nicholson, 2009), *M. nivale* et *M. majus* (Xu et al., 2008) sont également fréquemment associées à la FHB. Contrairement aux espèces du genre *Microdochium*, celles du genre *Fusarium* sont capables de produire des métabolites toxiques, les mycotoxines, qui vont augmenter l'impact de la maladie.

Le cycle de développement des agents pathogènes responsables de la fusariose des épis est illustré dans la **Figure 3** par le cycle de *F. graminearum*. Le champignon *F. graminearum* (forme sexuée : *Gibberella zeae*) appartient au phylum des *Ascomycota* et à la classe des Sordariomycètes. L'agent pathogène se conserve d'une saison culturale à l'autre sur les débris végétaux avec un développement saprophytique en hiver. Lorsque les conditions sont optimales (généralement au printemps), des périthèces (fructifications sexuées caractéristiques des Sordariomycètes) produisent des ascospores qui sont éjectées et constituent l'inoculum primaire (Paulitz, 1996). Il peut également y avoir formation de macroconidies (cycle asexué). La dissémination des ascospores se fait principalement par le vent et permet une dissémination à longue distance alors que les macroconidies sont dispersées par les pluies éclaboussantes à faibles distances (Goswami and Kistler, 2004). Les deux types de spores vont infecter les épis des céréales lors de la floraison de celles-ci, au stade de « mi-anthèse », qui correspond au stade de sensibilité maximale de la plante. Après dissémination, si les conditions climatiques le permettent (forte humidité > 90% et température entre 15 et 30°C), les spores (sexuées ou non) vont germer sur les différents tissus sur lesquels elles se sont déposées, telles que les glumes, les glumelles, parties stériles des épillets et des fleurs, respectivement, et les anthères dans le cas où ces dernières sont extrusives. Les anthères constituent une porte d'entrée majeure pour l'agent pathogène sur le blé tendre (Jansen et al., 2005; Brown et al., 2010). Les hyphes fongiques vont pouvoir pénétrer les glumes et glumelles par les stomates ou blessures et atteindre l'ovaire en colonisant les anthères. Une fois la cavité de l'épillet atteinte, les hyphes vont coloniser le grain en formation en pénétrant l'épicarpe, les téguments de la graine et se développer dans ces derniers ainsi que dans l'endosperme du grain (Jansen et al., 2005). Chez le blé, le rachis est considéré comme un élément important pour la colonisation des épillets adjacents à partir d'un point d'inoculation (Brown et al., 2010). Le développement des hyphes ne va pas, dans un premier temps, induire de symptômes visibles (croissance intercellulaire au niveau du front de colonisation). Au bout de 2 à 4 jours après infection, les tissus colonisés à l'arrière du front de colonisation présentent des symptômes de nécroses et de blanchiment (Bottalico and



B



Figure 4 : Symptômes de fusariose sur épis et grains de blé. A. Symptômes de FHB sur épis de blé (<http://extension.udel.edu/kentagextension/tag/fusarium-head-blight>) ; B. Symptômes de fusariose sur grains de blé, de gauche à droite d'un grain totalement contaminé à un grain sain. (<http://www.grainscanada.gc.ca/str-rst/fusarium/fhbwc-foc-eng.htm>).

Tableau 3 : *Fusarium* spp. associés à la FHB et leurs mycotoxines (Logrieco et al., 2002).

<i>Fusarium</i> spp.	Mycotoxines
<i>F. graminearum</i>	Déoxynivalénol* (DON), Nivalénol* (NIV), Zéaralénone (ZEA)
<i>F. culmorum</i>	DON, NIV, ZEA
<i>F. avenaceum</i>	Moniliformine** (MON), Enniatines** (ENN)
<i>F. tricinctum</i>	MON
<i>F. poae</i>	NIV, ENN, Diacétoxyscirpinol* (DAS) toxine HT-2*, toxine T-2*
<i>F. langsethiae</i>	toxine HT-2, toxine T-2, ENN, DAS
<i>F. sporotrichioides</i>	toxine HT-2, toxine T-2, ENN, DAS
<i>F. equiseti</i>	ZEA, DAS

*Dérivés terpéniques et **polyacétates

Perrone, 2002). L'extension de la maladie au rachis et à d'autres épillets va se traduire par un dessèchement précoce de la partie supérieure de l'épi accompagné de symptômes de blanchiment plus ou moins étendus équivalents à un échaudage de l'épi (**Figure 4A**). Les grains issus d'épis infectés sont blanchâtres, atrophiés, ridés et potentiellement mal remplis comparativement aux grains sains (**Figure 4B**). L'épi peut présenter une coloration rose/brunâtre due au développement mycélien en surface et à la production d'un pigment par le champignon, l'aurofusarine, dans des conditions humides. Les symptômes de fusariose ne permettent pas de distinguer quelles sont les espèces présentes au sein du complexe fusarien (Xu et al., 2008) mais elles restent identifiables par caractérisation morphologique classique ou par méthodes de biologie moléculaire comme l'amplification puis le séquençage de la région génomique correspondant au gène *EF1 α* par exemple. Le semis de grains contaminés par *F. graminearum* lors d'une saison culturale antérieure conduit à la dissémination de l'agent pathogène qui entraîne alors d'importantes fontes de semis dues à une nécrose du système racinaire induisant une incapacité de la plante à se développer normalement.

Outre les dégâts directs provoqués par le développement *in planta* de l'agent pathogène, cette maladie s'accompagne de problèmes de santé publique dus à la production de mycotoxines par les espèces du genre *Fusarium* (Yazar and Omurtag, 2008).

C. Les mycotoxines produites par *F. graminearum*

Certaines espèces du genre *Fusarium* sont capables de produire différents types de mycotoxines classées en deux catégories : les dérivés terpéniques et les polyacétates (**Tableau 3**). Ces mycotoxines sont des métabolites secondaires stables même à haute température ($> 170^{\circ}\text{C}$) et non dégradables lors de la transformation alimentaire (Sobrova et al., 2010). Celles-ci ont un impact extrêmement important sur l'alimentation humaine et animale. Il a été rapporté que, pendant la seconde guerre mondiale en Russie, la mort de milliers de personnes avait été causée par une aleucie toxique alimentaire (ou mycotoxicose), attribuée ultérieurement à la présence de toxines HT-2 et T-2 dans les céréales (Bennett and Klich, 2003). Les trichothécènes de type A et B, la zéaralénone (ZEA) et les fumonisines sont considérées comme les principales mycotoxines produites par le genre *Fusarium*. En effet, ces mycotoxines posent de nombreux problèmes de santé publique (D'Mello et al., 1999; Yazar and Omurtag, 2008) en raison de leur forte toxicité lorsqu'elles sont ingérées par l'homme ou les animaux. Par exemple la zéaralénone, une lactone d'acide resorcylique est un mycoœstrogène non stéroïdien (Hueza et al., 2014). Les perturbations endocriniennes liées à

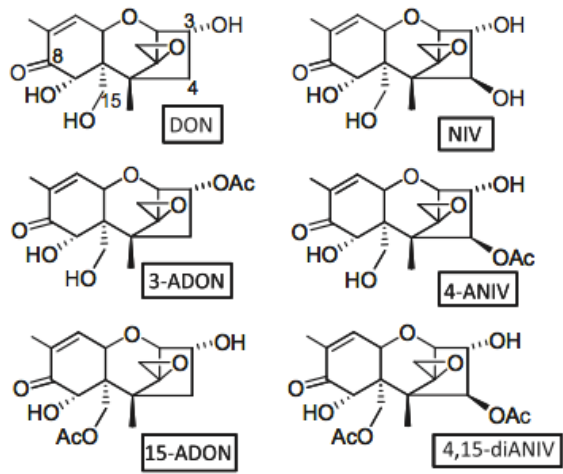


Figure 5 : Structure chimique des trichothécènes de type B produits par *F. graminearum* (Alexander et al., 2011).

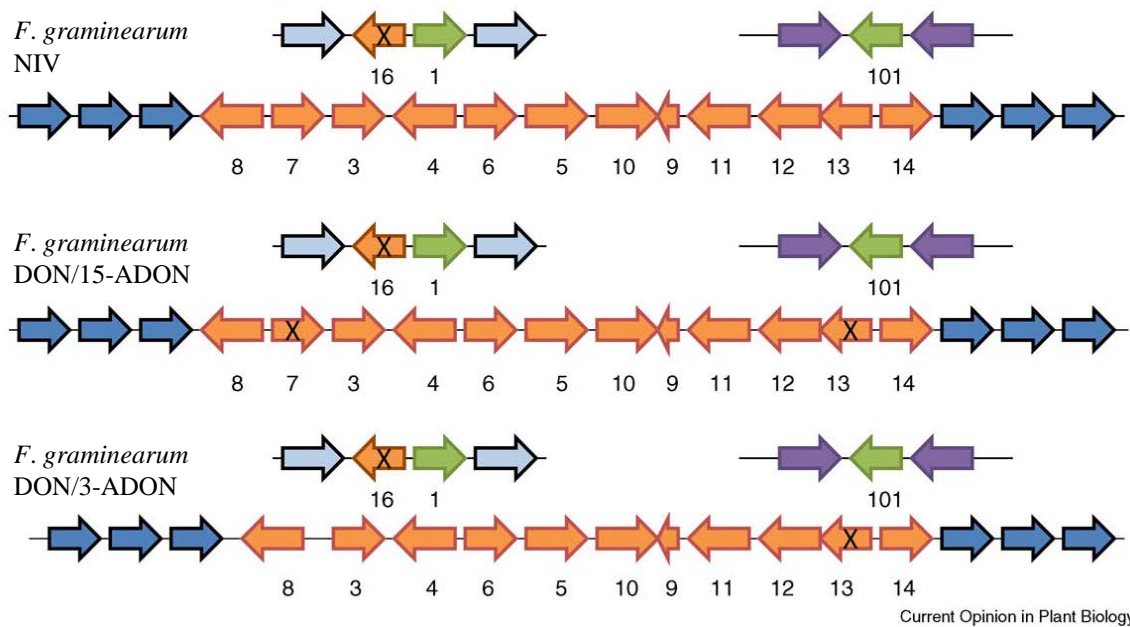
l'ingestion de ZEA sont dues à sa forte activité oestrogénique et à celle de ses métabolites dérivés. L'activité de perturbateur endocrinien est due à l'affinité pour les récepteurs des œstrogènes. Ils sont aussi puissants que le coumestrol et la génistéine, deux phytoestrogènes perturbant le système endocrinien (Metzler et al., 2010). Par la suite, nous nous concentrerons sur les trichothécènes et en particulier ceux de type B produits par l'espèce prédominante, *F. graminearum*.

Les trichothécènes (TCT) sont classés en quatre groupes, les types A, B, C et D. Ce sont des métabolites secondaires de nature sesquiterpénique. Ils partagent tous le même squelette tricyclique de 15 carbones avec une double liaison entre le carbone 9 et 10 et une fonction époxyde entre le carbone 12 et 13 qui joue un rôle majeur dans leur toxicité (Desjardins et al., 1993) et diffèrent par la présence de motifs d'oxygénation, d'acétylation ou d'acylation de ce squelette. Les TCT A (toxines HT-2, T-2) sont définis par la présence d'une fonction isovalérate en C8. Les TCT B (nivalénol (NIV), déoxynivalénol (DON)) sont définis par la présence d'une fonction cétone en C8 ainsi que par la présence d'un groupement hydroxyle en C7 (Alexander et al., 2011). Les TCT C et D, non produits par les espèces du genre *Fusarium*, sont respectivement définis par un second groupement époxyde (C7,8) ou une liaison ester macrocyclique en C4,15 (Kimura et al., 2007). Les TCT C et D ne sont pas associés à la FHB (Sudakin, 2003; Kimura et al., 2007).

F. graminearum peut produire du DON ou du NIV ainsi qu'une des formes acétylées suivantes : 3-acétyldéoxynivalénol (3-ADON), 15-acétyldéoxynivalénol (15-ADON), 4-acétylnivalénol (4-ANIV) ou 4,15-diacétylnivalénol (4,15-diANIV) résultant de l'ajout d'un groupement acétyle sur différents carbones de la molécule originale (**Figure 5**). Le NIV et le DON diffèrent par la présence d'un groupement hydroxyle en C4. La toxicité du DON, en particulier pour l'homme et les animaux, a été fortement étudiée dans la littérature (voir **Introduction**, partie **C.2.b.**). Son ancien nom de vomitoxine résume parfaitement l'effet majeur provoqué par son ingestion. Il est donc important de comprendre comment se déroule la biosynthèse et la régulation de la production des TCT de type B chez *F. graminearum*.

1. Voie de biosynthèse des trichothécènes de type B chez *F. graminearum*

Chez les champignons filamenteux, les gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires sont souvent organisés en clusters génomiques (Keller et al., 2005). Ces clusters incluent des gènes codant des synthétases, des transférases, des transporteurs ainsi que des facteurs de transcription jouant un rôle régulateur dans la biosynthèse *via* la régulation des autres gènes des clusters. Dans le cas de la biosynthèse des TCT B, il apparaît



Current Opinion in Plant Biology

Figure 6 : Organisation et fonctionnalité des gènes *Tri* chez *F. graminearum* en fonction du chémotype. Les gènes marqués d'une croix sont considérés comme inactifs (pseudogènes) (d'après Rep and Kistler 2010).

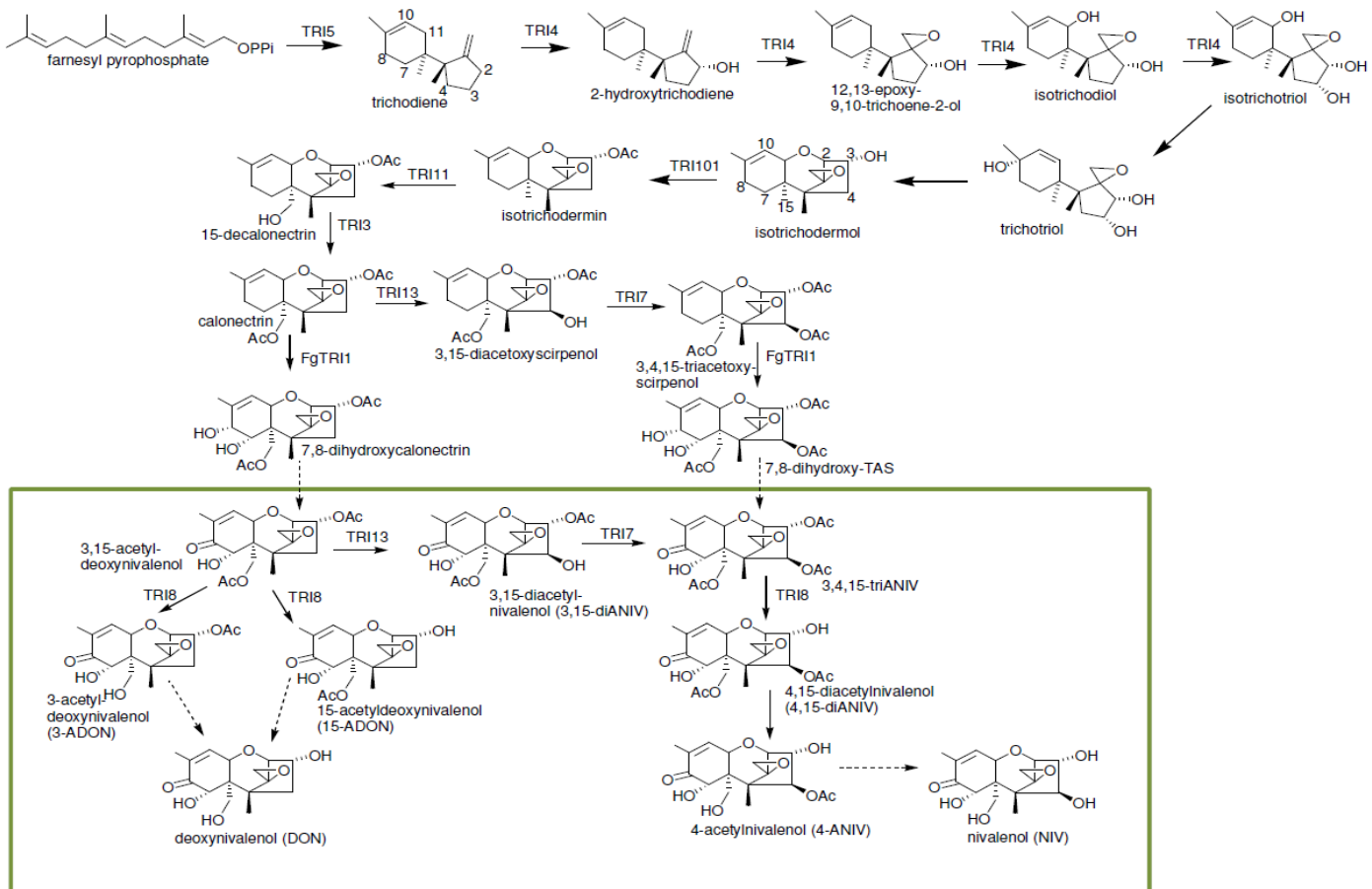


Figure 7 : Voie de biosynthèse des trichothécènes de type B. Les gènes nommés TRIx correspondent aux gènes qui sont nécessaires à la formation du métabolite suivant dans la voie de biosynthèse. L'encadré vert correspond aux trichothécènes de type B (McCormick et al., 2011).

dès 1993 la notion de cluster (Desjardins et al., 1993). A l'heure actuelle, la voie de biosynthèse des TCT a été bien élucidée et comporte 15 gènes répartis en trois loci génomiques (Kimura et al., 2007; Foroud and Eudes, 2009). Il a été identifié un cluster, nommé *Tri5*, d'environ 26 kb, localisé sur le chromosome 2 (Kimura et al., 2003; Wong et al., 2011), contenant 12 gènes : *Tri8*, *Tri7*, *Tri3*, *Tri4*, *Tri6*, *Tri5*, *Tri10*, *Tri9*, *Tri11*, *Tri12*, *Tri13*, *Tri14*. Trois gènes (*Tri1*, *Tri101* et *Tri16*) impliqués dans la biosynthèse des TCT se trouvent à l'extérieur du cluster *Tri5* (Kimura et al., 2007; Proctor et al., 2009; Rep and Kistler, 2010). Le second « cluster » est nommé *Tri1-Tri16* pour la présence des gènes *Tri1* et *Tri16* et enfin le gène *Tri101* n'est lié à aucun autre gène *Tri* (**Figure 6**).

La biosynthèse des TCT B fait intervenir en premier lieu la trichodiène synthase (*Tri5*, sesquiterpène cyclase) qui, par cyclisation du farnésyl pyrophosphate, aboutit à la formation de trichodiène. Le trichodiène est pris en charge par un cytochrome P450 (*Tri4*) qui catalyse quatre oxygénations successives (Tokai et al., 2007) formant ainsi de l'isotrichotriol (**Figure 7**). L'isotrichotriol subit une isomérisation et cyclisation non enzymatique aboutissant à l'isotrichodermol. L'isotrichodermol est converti en isotrichodermine par une acétyltransférase (*Tri101*). *Tri11* ajoute alors un groupement hydroxyle sur le carbone 15 puis celui-ci est acétylé par *Tri3*. *Tri13* va hydroxyler la calonectrine en C4 qui est ensuite acétylée par *Tri7* formant du 3,4,15-triacétoxyscirpénol. Le 3,4,15-triacétoxyscirpénol et la calonectrine sont pris en charge par *Tri1* qui hydroxyle les positions C7 et C8 (McCormick et al., 2004), l'hydroxyle en C8 se transforme en fonction cétone de manière inconnue. Enfin l'action d'une estérase (*Tri8*) aboutit à la formation de 3-ADON ou 15-ADON. Chez *F. graminearum*, la capacité à produire du NIV ou du DON d'une souche est déterminée par les gènes *Tri7* et *Tri13* actifs dans le premier cas ou inactifs (pseudogènes) dans le second (Brown et al., 2001, 2002; Lee et al., 2002). Ces gènes permettent de définir le chémotype d'une souche, c'est-à-dire sa capacité à produire un trichothécène de type B majeur (NIV ou DON ; **Figure 6**). *Tri16* est un pseudogène chez *F. graminearum*, il est impliqué dans la biosynthèse des TCT A chez *F. sporotrichioides* (McCormick et al., 2004). Enfin *Tri12* code pour un transporteur impliqué dans l'efflux des trichothécènes (Alexander et al., 1999).

2. Toxicité des trichothécènes de type B

L'ingestion d'aliments contaminés par des trichothécènes provoque un large éventail de symptômes chez les animaux. Chez les plantes, ces molécules sont également toxiques ; il s'agit alors de phytotoxicité.

Les trichothécènes de type B peuvent interagir au niveau cellulaire avec la protéine L3 de la sous unité 60S des ribosomes eucaryotes (Fried and Warner, 1981). Cette interaction, rendue possible grâce au groupement époxyde, va perturber l'activité peptidyl transférase des ribosomes et inhiber la synthèse protéique *de novo*.

a. Toxicité animale

Les trichothécènes de type B provoquent chez les animaux des diarrhées, des vomissements, des refus de s'alimenter, des nécroses ou irritations gastro-intestinales et des nécroses de la peau (D'Mello et al., 1999).

Au niveau cellulaire les TCT B ont des effets multiples chez les animaux tels que l'inhibition de la synthèse protéique, l'inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN, l'altération de la structure membranaire, la perturbation des fonctions mitochondriales, l'apoptose, l'activation de la mort cellulaire programmée (PCD) et l'induction de la signalisation issue des voies MAP kinase (Pestka et al., 2004; Rocha et al., 2005). La détermination *in vitro* de la concentration en mycotoxine causant une inhibition de 50% de la prolifération cellulaire sur différentes lignées cellulaires animales montre une toxicité différente des TCT B (Abbas et al., 2013). Ils peuvent être classés du plus toxique au moins toxique selon l'ordre suivant : 4-ANIV \approx 4,15-diANIV > NIV > DON > 15-ADON > 3-ADON. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres études sur la toxicité *in vitro* des TCT B (Alassane-Kpembé et al., 2013).

En raison de la toxicité animale des mycotoxines produites par *F. graminearum*, la commission européenne a réglementé la teneur en DON (mais également en zéaralénone et fumonisines) dans l'alimentation humaine (règlement N°1881/2006 du 19/12/2006 modifié par le N°1126/2007 du 28/09/2007). La concentration maximale en DON est variable en fonction de l'utilisation des céréales. Par exemple la teneur maximale en DON tolérée est de 1250 parties par milliard (ppb) dans le blé tendre brut et de seulement 200 ppb dans le blé destiné à l'alimentation des nourrissons. Ces valeurs maximales correspondent aux seuils au-delà desquels il y a un risque pour la santé humaine.

b. Phytotoxicité

Chez les plantes, le DON présent à forte concentration (\geq 100 parties par million (ppm)) induit la production de peroxyde d'hydrogène, la PCD et une dégradation de l'ADN (Desmond et al., 2008; Diamond et al., 2013). Il faut noter que le DON a des effets inverses en fonction de sa concentration : à faible concentration (10 ppm), celui-ci est capable de

protéger des cellules végétales contre la PCD induite par des chocs thermiques ou l'éthanol (Diamond et al., 2013). Les symptômes de blanchiment observés sur épis infectés ne sont probablement pas uniquement dus au dessèchement précoce de celui-ci mais probablement aussi à la toxicité du DON. Il semble également, à nouveau, y avoir un effet contraire en fonction des concentrations. En effet, des tests sur l'effet du DON à une concentration toxique (90 ppm) sur des fragments détachés de feuilles d'orge montrent que celui-ci induit un blanchiment (diminution de la teneur en chlorophylles a et b et en pigments caroténoïdiens) alors qu'à faible concentration (10 ppm) le DON retarde la sénescence des feuilles (Bushnell et al., 2010). Le DON est également connu pour sa capacité à inhiber la croissance racinaire du blé sur milieu gélosé (Masuda et al., 2007).

Chez *Arabidopsis* (Desjardins et al., 2007), l'évaluation de la toxicité des TCT B sur feuilles aboutit au classement suivant, du plus toxique au moins toxique : 15-ADON \approx 3,15-diacétylnivalénol (3,15-diANIV) > 3-ADON > DON > 4-ANIV > NIV. En fonction du modèle d'étude, la toxicité relative des TCT B peut varier. Dans le cas de l'utilisation du modèle *Chlamydomonas reinhardtii*, le NIV est extrêmement toxique. Il faut plus de 100 heures pour que le nombre de cellules de *C. reinhardtii* double en présence de NIV alors qu'il ne faut que 27 ou 26 heures avec du DON ou du 3,15-diANIV (McCormick, 2009; Suzuki and Iwahashi, 2014). Le modèle *Lemna paucicostata* (ou lentille d'eau) montre également une sensibilité plus importante au NIV qu'au DON (Abbas et al., 2013). Ces deux modèles se rapprochent des résultats obtenus en modèles animaux avec une toxicité plus importante du NIV comparé au DON.

3. Régulation de la production de TCT B *in vitro* et *in planta*

La production de trichothécènes est régulée aussi bien par des facteurs de transcription généraux répondant à des signaux environnementaux que par des facteurs de transcription spécifiques. *In vitro* la biosynthèse des trichothécènes peut être induite par différents paramètres comme le pH (Gardiner et al., 2009; Merhej et al., 2010), la température (Marin et al., 2010), la disponibilité de l'eau (Marin et al., 2010) et l'ajout de polyamines (Gardiner et al., 2009), la nature de la source de carbone (sucre) (Jiao et al., 2008) ou de peroxyde d'hydrogène (Ponts et al., 2007).

Les gènes *Tri6* et *Tri10* codent pour deux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des autres gènes *Tri*. Il existe un motif spécifique localisé en 5'UTR des gènes régulés par *Tri6* (Hohn et al., 1999). Récemment, en 2009, il a été découvert que *Tri6* et *Tri10* étaient des régulateurs globaux chez *F. graminearum*, ne régulant pas

Tableau 4 : Expression du gène *Tri5* en fonction du stade d'avancée de la maladie (d'après Boenisch and Schafer, 2011).

	Stade I	Stade II	Stade III
Stade d'infection	Infection primaire	Colonisation	Sporulation
Induction du gène <i>Tri5</i>	non	oui	non
Nécroses	absentes	peu présentes	très présentes

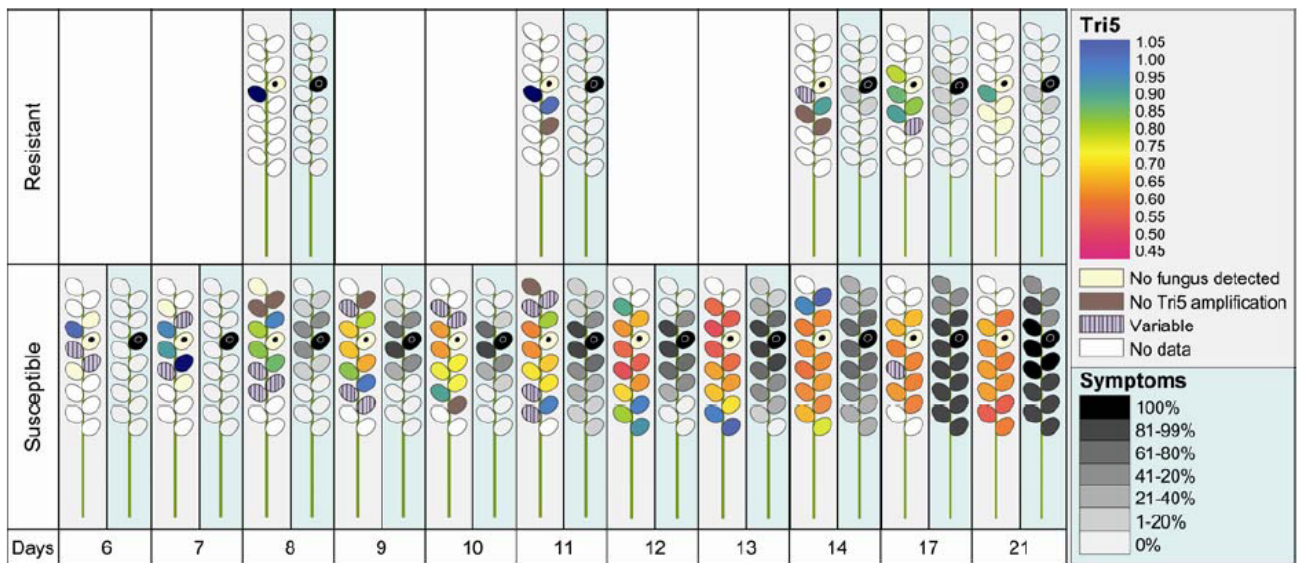


Figure 8 : Représentation de la progression des symptômes et de l'expression du gène *Tri5* dans des épis de blé infectés par *F. graminearum*. Deux variétés de blé, l'une résistante (Resistant) et l'autre sensible (Susceptible), sont inoculées par *F. graminearum* dans un épis (marqué par un point noir ou un cercle blanc). L'abondance des transcrits *Tri5* est quantifiée relativement à celle des transcrits du gène de référence *GAPDH* (gène codant la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase exprimée constitutivement). Elle est mesurée dans les épis adjacents à l'épis inoculé et représentée par les couleurs de rouge à bleu de 6 à 21 jours (Days) après inoculation. Les symptômes sur les épis adjacents à l'épis inoculé sont représentés par une gamme de gris de 6 à 21 jours après inoculation (Hallen-Adams et al., 2011).

uniquement les gènes *Tri*. En effet l'expression de 200 gènes fongiques est dérégulée *in planta* après infection par les mutants *tri6* et *tri10* par comparaison à la souche sauvage correspondante (Seong et al., 2009). Des résultats similaires ont pu être obtenus lors d'analyses par ChiP-Seq des cibles potentielles de Tri6 (Nasmith et al., 2011). Les gènes *Tri9* et *Tri14* codent des protéines régulant la biosynthèse des trichothécènes et sont induits lors de l'infection *in planta* mais leur fonction n'est pour le moment pas décrite (Dyer et al., 2005).

Le profil d'expression des gènes *Tri* au cours de l'infection a été étudié de différentes manières : par la création de souches modifiées portant une fusion transcriptionnelle avec un gène rapporteur codant une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur du gène *Tri5* (Jansen et al., 2005; Ilgen et al., 2009; Boenisch and Schafer, 2011) ou par approche de transcriptomique globale des gènes *Tri* (Hallen-Adams et al., 2011; Lysoe et al., 2011). Le suivi cytologique d'une souche marquée du pathogène montre que le gène *Tri5* est exprimé dans le nœud du rachis et le rachis. Ilgen et collaborateurs (2009) ont constaté que le gène *Tri5* n'était pas exprimé lors de la pénétration du champignon par les anthères suggérant que le DON n'est pas nécessaire à ce stade. L'expression du gène *Tri5* sert fréquemment de marqueur indirect de la biosynthèse de toxine par le champignon. L'expression de ce gène est induite dès la colonisation des glumes, des glumelles et du grain. Des différences d'expression du gène *Tri5* sont observées en fonction du stade de développement de l'infection (**Tableau 4**) (Boenisch and Schafer, 2011). Les auteurs définissent en effet l'infection selon trois stades, l'infection primaire, la colonisation et la sporulation, l'induction du gène *Tri5* étant uniquement observée pendant le stade de colonisation. Les analyses plus globales montrent un différentiel d'expression important dans le temps : les gènes *Tri* sont fortement induits 24 h après inoculation (hai) jusqu'à 96 hai et leur expression décroît 144 hai (Hallen-Adams et al., 2011; Lysoe et al., 2011). L'expression de l'ensemble de ces gènes suit donc le profil précédemment observé pour *Tri5*. Hallen-Adams et collaborateurs (2011) ont démontré de façon très intéressante que l'expression du gène *Tri5* et de l'ensemble des gènes *Tri* (et donc la production de toxine) est associée au front de colonisation du champignon dans des zones macroscopiquement asymptomatiques. En effet à partir d'un épillet inoculé, ils ont suivi l'expression du gène *Tri5* dans les épillets adjacents mais également la présence de symptômes de 6 jours à 21 jours après inoculation. Ils montrent de façon très claire que le gène *Tri5* s'exprime de façon plus importante dans les zones que le champignon est en train de coloniser que dans celles déjà infectées et où des symptômes de nécroses / blanchiments sont observables (**Figure 8**).

Gestion des résidus*		Sensibilité variétale	Risque	Pluie (mm) autour de la floraison (+/- 7 jours)		
				< 10	10-40	> 40
Céréales à paille, colza, lin, pois, féverole, tournesol	Labour ou résidus enfouis	Peu sensibles	1			
		Moyennement sensibles	2			
		Sensibles	3			T
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles	2			
		Moyennement sensibles	3			
		Sensibles	3			T
Betteraves, pomme de terre, soja, autres	Labour ou résidus enfouis	Peu sensibles	2			
		Moyennement sensibles	3			
		Sensibles	3			T
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles	2			
		Moyennement sensibles	4			
		Sensibles	4		T	T
Maïs et sorgho fourrages	Labour ou résidus enfouis	Peu sensibles	2			
		Moyennement sensibles	3			
		Sensibles	4			
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles	4		T	T
		Moyennement sensibles	5		T	T
		Sensibles	6	T	T	T
Maïs et sorgho grains	Labour ou résidus enfouis	Peu sensibles	2			
		Moyennement sensibles	3			T
		Sensibles	4			T
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles	5		T	T
		Moyennement sensibles	6	T	T	T
		Sensibles	6	T	T	T
		Sensibles	7	T	T	T

Figure 9 : Grille d'aide à la décision pour un traitement fongicide contre la fusariose des épis. T signifie qu'un traitement fongicide est conseillé. Le risque de la maladie est défini par une note allant de 1 à 7 : 1, risque de maladie très faible ; 7, risque de maladie important (<http://www.arvalis-infos.fr>).

L'impact de la production de toxine sur le développement *in planta* du pathogène a fait l'objet de nombreuses études. L'inactivation du gène *Tri5* (premier enzyme de la voie de biosynthèse des TCT B) bloque totalement la production de toxine chez le champignon (Proctor et al., 1995; Jansen et al., 2005; Maier et al., 2006). Sur blé tendre, le comportement *in planta* du mutant *tri5* de *F. graminearum* (chénotype DON) se caractérise par l'absence totale de colonisation des épillets adjacents à partir d'un point d'inoculation (Bai et al., 2002; Jansen et al., 2005; Maier et al., 2006). Ce mutant est incapable de franchir la barrière physique constituée par le rachis chez le blé (Jansen et al., 2005).

En conclusion la production de TCT B joue un rôle majeur chez le blé dans la capacité du champignon à coloniser l'ensemble de l'épi.

D. Stratégies de contrôle de la fusariose des épis

A l'heure actuelle, la lutte contre la FHB fait intervenir un ensemble de pratiques et d'interventions (prophylaxie, lutte chimique, lutte génétique) aboutissant à une conduite raisonnée des cultures. Dans ce cadre, Arvalis Institut du Végétal a développé des grilles d'intervention (**Figure 9**) permettant de choisir au mieux les techniques de travail du sol, les variétés et l'application de traitements fongicides.

1. Les pratiques culturales

La rotation culturale permet de réduire significativement les risques de fusariose (McMullen et al., 1997). Elle consiste à éviter de cultiver deux espèces hôtes (blé, maïs, orge) de *Fusarium* deux années consécutives et à alterner avec des espèces non hôtes en particulier après une culture de maïs qui laisse de nombreux débris végétaux en surface du sol. Le labour va permettre de réduire la formation d'inoculum primaire en limitant par enfouissement les débris végétaux disponibles pour le développement saprophytique de *Fusarium* et la formation d'ascospores au printemps (Dill-Macky and Jones, 2000).

2. La lutte chimique

La lutte fongicide est considérée comme peu efficace en vis-à-vis de la FHB (McMullen et al., 1997). Elle est peu utilisée en raison de son coût élevé (Yuen and Schoneweis, 2007) et du faible laps de temps propice à la réalisation des traitements lors de la floraison des céréales. Il a cependant été montré que le tébuconazole (de la famille des triazoles) et le bénomyl (de la famille des carbamates) diminuent l'incidence de la maladie et

Tableau 5 : Classification des types de résistance à la FHB chez les céréales.

Résistance	Description	Références
Type I	Résistance à l'infection initiale des épillets	Schroeder and Christensen, 1963; Bai and Shaner, 2004
Type II	Résistance à la colonisation des épillets adjacents à l'infection primaire	Schroeder and Christensen, 1963; Bai and Shaner, 2004
Type III	Résistance des grains à l'infection	Bai and Shaner, 2004
Type IV	Tolérance à la fusariose des épis	Bai and Shaner, 2004
Type V-1	Capacité de la plante à modifier chimiquement les trichothécènes	Boutigny et al., 2008
Type V-2	Capacité de la plante à inhiber la synthèse des trichothécènes	Boutigny et al., 2008

la concentration en toxines (Jones, 2000). *F. graminearum* peut devenir résistant à ces deux familles de fongicides (Chen and Zhou, 2009; Yin et al., 2009). Les fongicides tels que le tébuconazole peuvent certes limiter le développement fongique mais le champignon peut s'adapter spontanément lors de croissance *in vitro* sur un milieu contenant le fongicide (Becher et al., 2010). Les auteurs ont observé l'apparition de deux phénotypes : le premier se caractérise par la présence d'hyphes aériens alors que le second croît de manière très rase avec très peu d'hyphes aériens. Après infection *in planta* et traitement au tébuconazole, les isolats issus de ces phénotypes montrent une plus forte quantité de mycotoxine produite par μg d'ADN fongique en comparaison avec la souche sauvage (Becher et al., 2010). De façon similaire, une étude montre une réduction des symptômes macroscopiques de la FHB et de la biomasse fongique après des traitements par l'azoxystrobine (famille des strobilurines) et par le carbendazime (famille des benzimidazoles et carbamates) mais qui s'accompagne d'une forte augmentation de la teneur en déoxynivalénol dans les grains (Zhang et al., 2009). *In vitro*, la croissance de *F. graminearum* sur un milieu contenant du tébuconazole va être accompagnée d'une forte expression du gène *Tri5* et de production de toxine (Ochiai et al., 2007; Kulik et al., 2012).

3. La résistance génétique et les caractères associés

Actuellement, aucune résistance spécifique de type gène à gène (modèle de Flor) n'a été mise en évidence vis-à-vis de la fusariose des épis (Foroud and Eudes, 2009). La résistance est de nature quantitative, portée par des QTLs (Quantitative Trait Loci ou loci à effet quantitatif). Cinq types de résistance ont pu être identifiés, nommés de I à V (**Tableau 5**). Ces résistances peuvent interagir entre elles et se cumuler.

La résistance de type I correspond à une résistance à l'infection initiale des épillets par l'agent pathogène (Schroeder and Christensen, 1963; Bai and Shaner, 2004). Elle peut être estimée en dénombrant le pourcentage d'épillets symptomatiques après apport de l'agent pathogène par pulvérisation de spores. L'évaluation de la résistance de type I au sens strict est difficile car un autre type de résistance, la résistance de type II va être évalué en même temps (Rudd et al., 2001; Bai and Shaner, 2004). La résistance de type II a été définie comme la capacité de la plante à limiter l'expansion de la maladie à partir d'un site d'infection initial (Schroeder and Christensen, 1963; Bai and Shaner, 2004). Elle peut être suivie relativement facilement après injection d'une quantité d'inoculum connue dans une fleur d'épillet par la quantification des fleurs et épillets adjacents symptomatiques (Rudd et al., 2001). Les

Résistance variétale au risque DON * (fusariose graminearum) – échelle 2012/2013

Références				Variétés récentes	
Variétés peu sensibles				Variétés peu sensibles	
MANAGER	ILLICO	GRAINDOR	APACHE	7	TULIP
		RENAN		6.5	
EPHOROS	CHEVALIER	BAROK	ALIGATOR	6	FLUOR SOKAL
OXEBO	NOGAL	HYSUN	GALIBIER		
Variétés moyennement sensibles					
		AS DE CŒUR	ALIXAN	5.5	BRENTANO CROISADE
	SPONSOR	HYSTAR	ARLEQUIN	5	ADHOC HYBERY
			SOLEHIO		PAKITO SCENARIO
LEAR	MERCATO	ISTABRAQ	AREZZO	4.5	ARKEOS KARILLON ROCHFORT
		PALEDOR	SOISSONS		SWEET SY MATTIS
EUCLIDE	CHEVRON	AUBUSSON	ALTIGO	4	
	SOLLARIO	SELEKT	KORELI		
Variétés sensibles					
	EXPERT	DINOSOR	BOREGAR	3.5	ALLEZ Y
	SCOR	ROSARIO	GONCOURT		
COMPIL	BOISSEAU	BERMUDE	ACCROC	3	
	TRAPEZ	PREMIO	CAPHORN		
			AZZERTI	2.5	MUSIK
		PR22R58	ROYSSAC	2	
				Variétés sensibles	

* : déoxynivalénol

Source : essais pluriannuels ARVALIS, dont 4 essais 2012

Figure 10 : Sensibilité de différentes variétés françaises de blé tendre à la fusariose des épis. Plus la note (encadrée) est haute plus la variété est tolérante à la fusariose des épis : 1, variété très sensible; 7, variété résistante (<http://www.arvalis-infos.fr>).

résistances de type III, IV et V correspondent respectivement à une résistance des grains à l'infection, à une tolérance à la fusariose des épis (qualité et rendement maintenus malgré la présence de maladie) et aux trichothécènes ainsi qu'à une résistance à l'accumulation des trichothécènes (Bai and Shaner, 2004). La résistance de type V a, depuis 2008, été redéfinie en V-1 et V-2 qui correspondent, respectivement, à la capacité de la plante à modifier chimiquement les trichothécènes (détoxication ou dégradation) ou à inhiber leur synthèse (Boutigny et al., 2008).

Cartographie des sources de résistance chez l'orge et le blé tendre

L'orge possède naturellement une résistance de type II élevée. La propagation de la maladie aux épillets adjacents à partir d'un épillet infecté est empêchée par le nœud du rachis et le rachillet bien que la colonisation soit possible par le phloème et la surface du rachis (Jansen et al., 2005). Des QTLs de résistance à la fusariose ont été identifiés sur les 7 chromosomes de l'orge (Zhu et al., 1999; Ma et al., 2000; Mesfin et al., 2003). Ces QTLs peuvent coïncider avec des QTLs associés à des traits agronomiques comme la date de floraison, la hauteur des plantes, la densité de l'inflorescence et le niveau de décoloration des grains (de la Pena et al., 1999; Zhu et al., 1999; Ma et al., 2000; Mesfin et al., 2003). Des QTLs associés à l'accumulation du DON ont été identifiés dans l'orge à deux ou six rangs. Ces QTLs coïncident avec des QTLs de résistance à la fusariose et à des traits agronomiques (Mesfin et al., 2003; Smith et al., 2004). Le locus *Vrs1* est le principal déterminant du type des épillets chez l'orge (orges à deux *versus* six rangs). Les orges à deux rangs sont généralement plus résistantes que ceux à six. Un QTL (sur le chromosome 2) de résistance à la fusariose est par exemple associé au locus *Vrs1* et à la date de floraison de l'orge (Mesfin et al., 2003). Cependant, la précision de la cartographie de ce QTL ne permet pas avec certitude de déterminer si la résistance est liée à la présence du locus *Vrs1* ou s'il s'agit d'un effet pléiotrope.

Une grande variabilité génétique pour la résistance à la fusariose est disponible dans le patrimoine génétique du blé, y compris dans les variétés françaises (**Figure 10**). Les sélectionneurs ont cependant une tâche difficile consistant à combiner une productivité élevée et stable avec une résistance à la maladie, car souvent les meilleurs cultivars, très productifs, sont sensibles à la maladie (Buerstmayr et al., 2009). Par conséquent les QTLs ont été utilisés pour étudier la résistance à la fusariose chez le blé. Plus de 100 QTLs ont été identifiés sur l'ensemble des chromosomes du blé (Buerstmayr et al., 2009; Chu et al., 2011; Li et al.,

2011). Buerstmayr et collaborateurs (2009) ont résumé 52 études sur des QTLs de *T. aestivum* en réponse à la fusariose des épis. Il est probable que parmi tous ces QTLs, certains soient de faux positifs du fait de la petite taille des populations sur lesquelles les études ont été conduites. Les auteurs ont conclu que les QTLs les plus répétables entre les études sont situés sur les bras courts des chromosomes 3B, 5A et 6B (nommés respectivement *Fhb1*, *Qfhs.ifa-5A* et *Fhb2*). *Fhb1* et *Fhb2* sont des loci issus du cultivar chinois Sumai 3 connu pour sa résistance très élevée. *Fhb1* (*Qfhs.ndsu-3BS* (Liu et al., 2006)) a été associé à la résistance de type II (Bai et al., 1999) par sa capacité à limiter à l'expansion de la maladie. La présence du QTL est également corrélée à la capacité à convertir le DON en DON-3-*O*-glucoside (D3G) (Lemmens et al., 2005) qui peut aussi être associée à une résistance de type V-1. Lemmens et collaborateurs (2005) associent la capacité de transformation du DON en D3G à la présence de gènes codant des UDP-glycosyltransférases (UGTs) associés à *Fhb1* ou à la présence de gènes régulant leur expression. Un autre QTL nommé *Fhb2* et associé à la résistance de type II a été identifié chez Sumai 3. Une cartographie fine l'associe au chromosome 6B (Cuthbert et al., 2007; Buerstmayr et al., 2012). Aucune fonction n'a pour le moment été associée à ce QTL. *Qfhs.ifa-5A* est régulièrement associé à la résistance de type I ; il se trouve sur le bras court du chromosome 5A (Buerstmayr et al., 2009). Comme chez l'orge, certains QTLs de résistance à la fusariose chez le blé d'hiver colocalisent avec des QTLs associés à des traits agronomiques comme la date de floraison (Buerstmayr et al., 2012) et la taille des plantes (locus *Rht* (Voss et al., 2008; Srinivasachary et al., 2009)). L'identification des QTLs de résistance n'est que peu utile aux sélectionneurs s'ils ne peuvent introgresser ces caractères dans les cultivars de blé d'intérêt, dits « Elites ». Pour répondre à cet objectif la sélection assistée par marqueurs a été un outil déterminant. Le QTL *Fhb1* a ainsi pu être introgressé dans de nombreux cultivars de blé aussi bien aux Etats-Unis, au Canada, en Australie ou en Allemagne (Buerstmayr et al., 2009).

En 2006, Miedaner et collaborateurs ont réussi à introgresser en modèle pyramidal trois QTLs (3B et 5A provenant du cultivar CM-82036 et 3A provenant du cultivar Frontana) dans des variétés allemandes de blé à fort rendement, moyennement ou très sensibles à la fusariose des épis (les cultivars Nandu et Munk). Les auteurs ont observé dans les descendants portant la combinaison de QTLs 3B + 5A une réduction de la concentration en DON de 78% et de 55% pour la FHB. En revanche la présence des 3 QTLs (3B + 5A + 3A) n'a pas montré d'effet supérieur au cas décrit précédemment. Les auteurs ont conclu à un rôle mineur du QTL 3A lorsqu'il est associé aux deux autres (Miedaner et al., 2006).

L'introgession de QTL de résistance par sélection assistée par marqueurs bien qu'utile dans les programmes de sélection sur le blé ne permet en aucun cas de comprendre directement quels sont les mécanismes moléculaires ou voies métaboliques impliqués dans la résistance à la fusariose *via* ces QTLs.

E. Les approches « -omiques » pour la compréhension de la résistance à la FHB

L'utilisation de la transcriptomique, de la métabolomique et ou de la protéomique permet d'avoir une vue globale de processus biologiques. De telles approches ont été conduites pour élucider les processus impliqués dans la résistance à la fusariose chez les céréales.

De nombreuses études de transcriptomique en réponse à *F. graminearum* ou au DON ont été conduites chez l'orge et le blé (Boddu et al., 2006; Boddu et al., 2007; Walter et al., 2008; Jia et al., 2009; Steiner et al., 2009; Gardiner et al., 2010; Foroud et al., 2012; Schweiger et al., 2013; Al-Taweel et al., 2014). Dans l'ensemble, les gènes végétaux dérégulés dans ces études peuvent être associés aux grandes catégories suivantes : protéines de défense (type PR), mort cellulaire, métabolisme de la membrane et de la paroi cellulaire, métabolisme primaire, protéines impliquées dans le burst oxydatif, processus de détoxification, métabolisme secondaire, métabolisme des acides aminés, protéines de transport, signalisation, régulation de l'expression, hormones, photosynthèse, protéines de réponse aux stress et les ribosomes.

Les études Walter et collaborateurs (2008) et Schweiger et collaborateurs (2013) mettent en évidence des gènes différentiellement exprimés en fonction de la présence ou de l'absence du QTL *Fhb1*. Ces gènes codent pour des fonctions connues pour être impliquées dans les processus de détoxification comme des ABC transporteurs, des glutathion-S-transférases (GST) ou des UDP-glycosyltransférases (UGT). Cependant, lorsque les auteurs cherchent à cartographier ces gènes, ils ne colocalisent pas avec *Fhb1*. De façon similaire, parmi 14 transcrits différentiellement exprimés et potentiellement associés à *Fhb1* seul un transcrit a pu être associé à un gène cartographié sur le chromosome 3BS (Jia et al., 2009). Récemment, un gène nommé *WFhb1_c1*, codant probablement pour un inhibiteur de pectine méthylestérase, a été associé à *Fhb1* (Zhuang et al., 2013). De la même façon, des études de métabolomique ou protéomique réalisées en réponse à *F. graminearum* chez des lignées de blé portant ou non *Fhb1* ont mis en évidence des différences d'accumulation de métabolites

secondaires ou de protéines connus pour être impliqués dans les réactions de défense, comme des amides d'acides hydroxycinnamiques, des phénol-glucosides ou encore des flavonoïdes (Gunnaiah et al., 2012), des chitinases, des super-oxyde dismutases ou des ribonucléases (Zhang et al., 2013). Pour le moment seul un gène codant un transporteur non spécifique de lipides a pu être associé au QTL 5AS (Schweiger et al., 2013). Ces études, bien que très informatives sur les changements dans les transcriptomes, protéomes et/ou métabolomes de plantes résistantes, ne permettent pas d'associer ces QTLs à des fonctions précises. Il semble donc important de pouvoir réaliser des analyses fonctionnelles ciblées sur les candidats identifiés par ces approches globales. De plus, en fonction du fond génétique dans lequel se trouve un QTL, celui-ci n'est pas toujours associé au même type de résistance, c'est le cas par exemple de *Fhb1* qui dans le cultivar Nyubai n'est pas associé à la formation de D3G (Zhang et al., 2013) contrairement à ce qui a été précédemment montré dans le cultivar CM-82036 (Lemmens et al., 2005). Malgré des résultats parfois contradictoires, la capacité de la plante à former du DON-3-*O*-glucoside (D3G) et donc un ratio D3G/DON élevé sont fréquemment associés à la résistance chez le blé (Lemmens et al., 2005; Bollina et al., 2011; Kumaraswamy et al., 2011a; Schweiger et al., 2013). Le D3G n'est pas la seule forme de mycotoxine conjuguée découverte à ce jour. Les formes suivantes ont pu être mises en évidence *in planta* : le DON-GSH (Kluger et al., 2013), le DON-*S*-cystéinyl-glycine (Kluger et al., 2013), le DON-*S*-cystéine (Kluger et al., 2013), le nivalénol-3-*O*-glucoside (Nakagawa et al., 2011; Yoshinari et al., 2014) et le 4-acétylnivalénol-3-*O*-glucoside (Nakagawa et al., 2011). L'ensemble de ces mycotoxines conjuguées soit à des sucres, au glutathion ou à des dérivés du glutathion sont regroupées sous l'appellation de mycotoxines masquées (Berthiller et al., 2009; Berthiller et al., 2013). La conjugaison est une stratégie souvent associée au processus de détoxification chez les plantes.

F. Les UGTs des acteurs majeurs dans les processus de détoxification

1. Les processus de détoxification chez les plantes

Les plantes, dans leur environnement, sont constamment exposées à des substances potentiellement toxiques (Coleman et al. 1997). Ces composés dits xénobiotiques ne peuvent pas servir de source d'énergie mais ils sont néanmoins pris en charge et accumulés. Les xénobiotiques peuvent être des produits d'origine naturelle ou non (pesticides, herbicides, fongicides). La prise en charge des xénobiotiques par les plantes peut se diviser en quatre

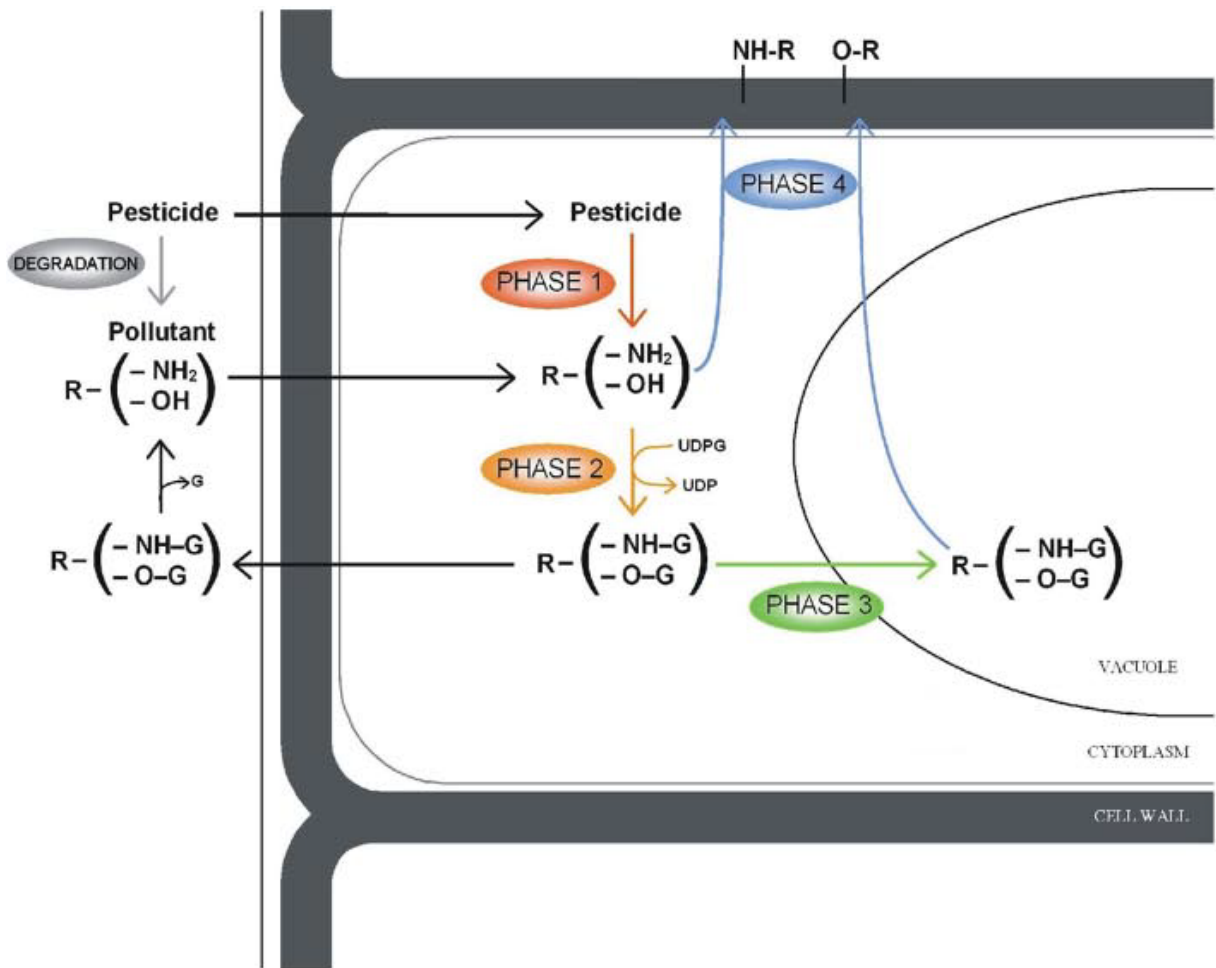


Figure 11 : Processus de détoxification des xénobiotiques chez les plantes (Brazier-Hicks et al., 2007).

grandes étapes (Kvesitadze et al., 2006) (**Figure 11**) : 1 : une ou des modifications chimiques ; 2 : la conjugaison ; 3 : le transport et 4 : le stockage.

Phase 1 : la modification chimique

Cette étape consiste en une ou des modifications chimiques de la molécule impliquant une ou des réactions enzymatiques. Ces modifications vont augmenter la solubilité et généralement déjà réduire la toxicité des xénobiotiques (Abhilash et al., 2009). Ces modifications chimiques vont être principalement des oxydations, parfois successives, catalysées par des cytochromes P450 monooxygénases (CYP). Il peut également y avoir hydrolyse sous l'action d'estérases (Coleman et al., 1997) ou oxydoréduction. Par exemple, le trinitrotoluène (TNT) est réduit en monohydroxylaminodinitrotoluène (HADNT) et en aminodinitrotoluène (ADNT). Chez les plantes, un traitement au TNT va induire l'expression de gènes codant des probables nitroréductases (Ekman et al., 2003). Chez Arabidopsis, des plantes surexprimant les oxophytodiénoate réductases (OPR) 1, 2 et 3 accumulent plus d'ADNT en comparaison aux plantes non modifiées (Beynon et al., 2009). *In vitro* les OPRs sont capables de transformer le TNT en HADNT (Beynon et al., 2009).

Phase 2 : la conjugaison

La conjugaison consiste à ajouter au xénobiotique ayant subi ou non l'étape 1 des molécules endogènes hydrophiles afin d'augmenter la solubilité de l'ensemble. Cette conjugaison peut avoir lieu avec des sucres, le glutathion ou encore le malonyl. Ces réactions sont respectivement catalysées par des UDP-glycosyltransférases (UGTs), des glutathion-S-transférases (GSTs) et des malonyl-transférases (Coleman et al., 1997). La conjugaison peut aussi s'effectuer avec des protéines, des peptides, des acides aminés, des acides organiques, des mono-, oligo-, ou polysaccharides (Kvesitadze et al., 2006). La conjugaison permet de rendre les xénobiotiques inactifs ou moins actifs (Burken, 2004) mais des réactions inverses peuvent, en supprimant la conjugaison, rendre à la molécule sa toxicité. Chez les plantes, 70% des xénobiotiques absorbés subissent une conjugaison (Kvesitadze et al., 2006). Dans l'exemple du TNT, des gènes codant des UGTs et des GSTs sont fortement induits en réponse à son application (Ekman et al., 2003; Gandia-Herrero et al., 2008). Chez le maïs un traitement à l'atrazine (2-chloro-4-(éthylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine) qui est un pesticide va induire l'induction de gènes codant des GSTs et des ABC transporteurs (Pang et al., 2012). Un traitement de l'orge par le déoxynivalénol, considéré comme un xénobiotique,

induit des gènes codant pour des CYPs, des UGTs, des GSTs et des transporteurs (Gardiner et al., 2010).

Phase 3 et 4 : le transport et le stockage

Initialement ces deux phases étaient regroupées en une seule. Elles correspondent au transport des métabolites par l'intermédiaire de transporteurs membranaires comme les transporteurs ABC et les MATEs (Multidrug and Toxic compound Extrusion) ou de transporteurs vésiculaires permettant une compartimentation. La phase 3 correspond à une compartimentation dans la vacuole et la phase 4 à l'export vers l'apoplasme ou à une liaison à la paroi végétale (Abhilash et al., 2009). Peu d'informations sont disponibles à ce jour sur ces deux phases.

Lors des processus de détoxification, la conjugaison (phase 2 décrite précédemment) constitue une étape majeure. Les UGTs sont des enzymes clés de ce processus.

2. Les glycosyltransférases du métabolisme secondaire

Chez les plantes, la glycosylation, c'est-à-dire l'ajout d'un sucre, intervient dans divers processus. Les glycosyltransférases (GTs) sont les enzymes responsables de cette réaction aboutissant à la biosynthèse de di-, oligo- et poly- saccharides. Souvent, le sucre va être activé par un nucléotide diphosphate comme l'uridine diphosphate (UDP). Les GTs peuvent glycosyler de nombreux substrats comme des protéines, des lipides, les hormones ou des métabolites secondaires endogènes ou exogènes (Keegstra and Raikhel, 2001). Elles sont impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides de la paroi chez les plantes comme la cellulose, l'hémicellulose et les pectines (Zhong and Ye, 2003; Scheible and Pauly, 2004; Mohnen, 2008).

Les glycosyltransférases forment une superfamille multigénique divisée en 96 familles selon le système CAZY (<http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html> ; (Sinnott, 1990; Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 2003; Lairson et al., 2008; Osmani et al., 2009)). La classification des GTs repose sur l'analyse de leur séquence protéique. La superfamille des GTs est subdivisée en clans, familles et sous-familles (Coutinho et al., 2003). La nomenclature des GTs dépend de l'organisme dans lequel elles ont été identifiées et de leur degré de similarité avec des séquences protéiques déjà connues. Les glycosyltransférases sont présentes dans tous les organismes vivants : Eucaryotes, Eubactéries et Archae. Par exemple, chez la plante modèle *A. thaliana*, elles sont d'après CAZY (Carbohydrate-Active enZYmes)

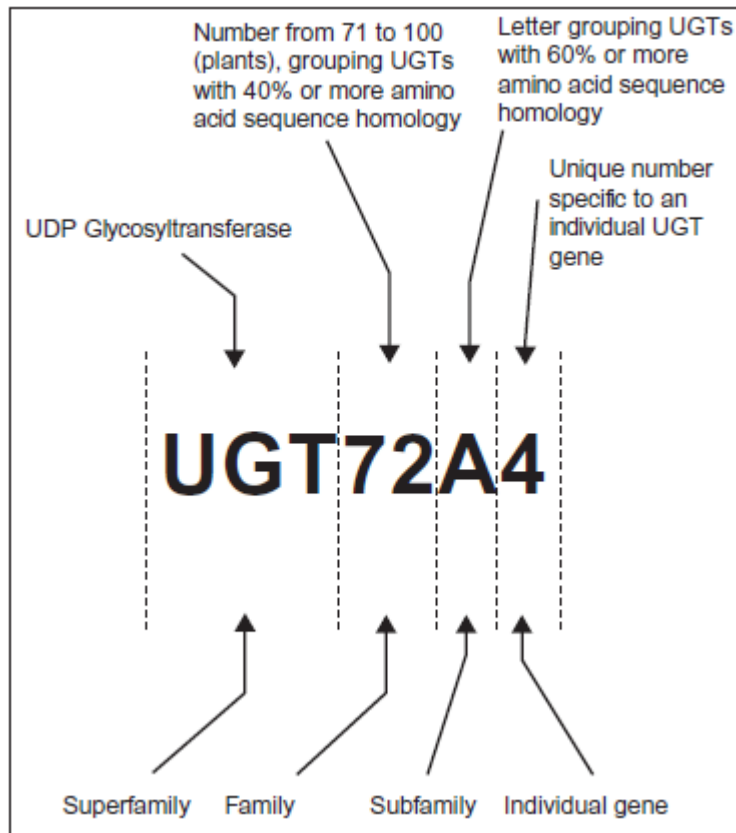


Figure 12 : Nomenclature des UGTs de la famille 1 chez les plantes (Ross et al., 2001).



Figure 13 : Séquence protéique consensus définissant le motif « plant secondary product glycosyltransferase » (PSPG). La taille des lettres est proportionnelle au taux de conservation des acides aminés. (Osmani et al., 2009).

au nombre de 572, dont 96 non classées, et représentent 47 familles (<http://www.cazy.org/e1.html>).

Les glycosyltransférases de la famille 1 appartiennent à la superfamille des GTs et forment chez les plantes un clade spécifique (Paquette et al., 2003), leur nomenclature est la suivante UGT_{iXj} (**Figure 12**). L'ajout d'un sucre sur un substrat par ces enzymes nécessite une activation préalable du sucre par de l'UDP. Ces enzymes sont nommées UDP-glycosyltransférases ou UGTs. Le sucre activé par l'UDP peut être de différente nature : galactose, glucose, rhamnose, xylose, fructose...

Chez les plantes, les UGTs de la famille 1, ou UGTs du métabolisme secondaire, sont caractérisées par la présence dans leur séquence protéique d'un motif consensus, conservé et localisé en C terminal de la protéine. Ce motif est nommé PSPG pour « Plant Secondary Product Glycosyltransferase » (**Figure 13**). Cette famille multigénique comporte 120 membres chez *A. thaliana* (Paquette et al., 2003), 147 chez le maïs (Li et al., 2014), 164 chez *Medicago truncatula* (Achnine et al., 2005), plus de 200 chez le riz (Yonekura-Sakakibara and Hanada, 2011) et est estimée à plus de 550 membres chez le blé tendre (Sado et al., 2009).

La glucosylation d'un métabolite va augmenter sa solubilité et réduire sa réactivité chimique (Gachon et al., 2005). Les plantes étant constamment soumises à différents stress, notamment biotiques, elles vont produire des métabolites avec diverses propriétés antimicrobiennes. Afin de ne pas s'intoxiquer elles mêmes, les plantes sont capables de stocker ces composés sous forme glycosylée afin de réduire leur toxicité. Elles sont également soumises à des métabolites toxiques exogènes tels que les herbicides ou les mycotoxines. Le rôle des UGTs dans la cellule végétale ne se cantonne pas à intervenir dans les processus de détoxification. Elles peuvent être impliquées dans des voies de biosynthèse (Grubb et al., 2004), dans la régulation de molécules de signalisation (Priest et al., 2006), dans l'état redox (Simon et al., 2014) et probablement dans le transport de composés vers la paroi pour le renforcement pariétal (Vanholme et al., 2008).

a. Spécificité de substrats des UDP-glycosyltransférases

Plusieurs études ont cherché à évaluer *in vitro* la spécificité de substrats des UGTs d'*Arabidopsis* sur différentes classes de métabolites : les benzoates (Lim et al., 2002), les flavonoïdes (Lim et al., 2004) et les terpènes (Caputi et al., 2008). Parmi les 14 groupes

d'UGTs présents chez *Arabidopsis*, des UGTs appartenant aux groupes D, E et L ont montré une activité sur les 3 familles de substrats et des UGTs appartenant aux groupes B et F sur au moins deux familles (**Figure 14**). Une étude d'activité *in vitro* sur la capacité des UGTs à former des glucosides d'hydroxycoumarines (l'esculétine-6-*O*-glucoside, l'esculétine-7-*O*-glucoside et la scopolétine-7-*O*-glucoside) a montré que 48 des 90 UGTs testées étaient capables de former au moins un des produits et représentaient 6 groupes différents parmi les 14 présents chez *Arabidopsis* (Lim et al., 2003). Il semble donc difficile de prédire une spécificité de substrats aux UGTs en se fondant uniquement sur leur phylogénie et leur capacité à glycosyler tel ou tel métabolite *in vitro* puisque des UGTs appartenant à des groupes phylogénétiques distincts sont capables de prendre en charge les mêmes substrats (Osmani et al., 2009). A titre d'exemple, au sein du groupe D chez *Arabidopsis*, toutes les UGTs sauf UGT73D1 sont capables de glycosyler l'esculétine et/ou la scopolétine (Lim et al., 2003). Les UGTs sont plutôt dites régiospécifiques que spécifiques d'un substrat (Vogt and Jones, 2000). En effet chez la gentiane, UGT78B1 peut glycosyler plusieurs anthocyanidines différentes mais toujours sur l'hydroxyle associé au carbone 3 (Tanaka et al., 1996). UGT85B1 du sorgho glycosyle de nombreux substrats seulement en cas de désencombrement stérique du groupement hydroxyle réactif (Hansen et al., 2003). Cette régiospécificité pourrait expliquer pourquoi certaines UGTs ont plusieurs substrats qui, d'un point de vue régiospécifique, possèdent des sites de glycosylation similaires. UGT72B1 d'*Arabidopsis* est capable respectivement de -*O* et -*N* glycosyler le 2,4,5-trichlorophénol et le 3,4-dichloroaniline (Brazier-Hicks et al., 2007). Bien que certaines UGTs apparaissent comme substrat peu spécifiques, certaines le sont fortement comme c'est le cas d'une anthocyanine 3-*O*-glucosyltransférase (UGT73A14) chez la gentiane (Fukuchi-Mizutani et al., 2003) impliquée exclusivement dans la biosynthèse de la gentiodelphine.

b. Implication des UGTs dans la biosynthèse et/ou la protection contre des métabolites secondaires endogènes

Les UDP-glycosyltransférases de la famille 1 sont connues pour intervenir dans la biosynthèse de métabolites secondaires soit de façon intermédiaire soit en fin de voie pour stocker ou compartimenter les composés. Chez *Arabidopsis* et le colza, le sinapoyl malate, issu de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et impliqué dans la protection des feuilles contre les ultra-violets, ainsi que la sinapoylcholine, dégradée en acide sinapique et en choline lors de la germination des graines, semblent tous les deux avoir un intermédiaire de biosynthèse glycosylé : le sinapoyl glucose (Milkowski et al., 2000a, b; Lim et al., 2001;

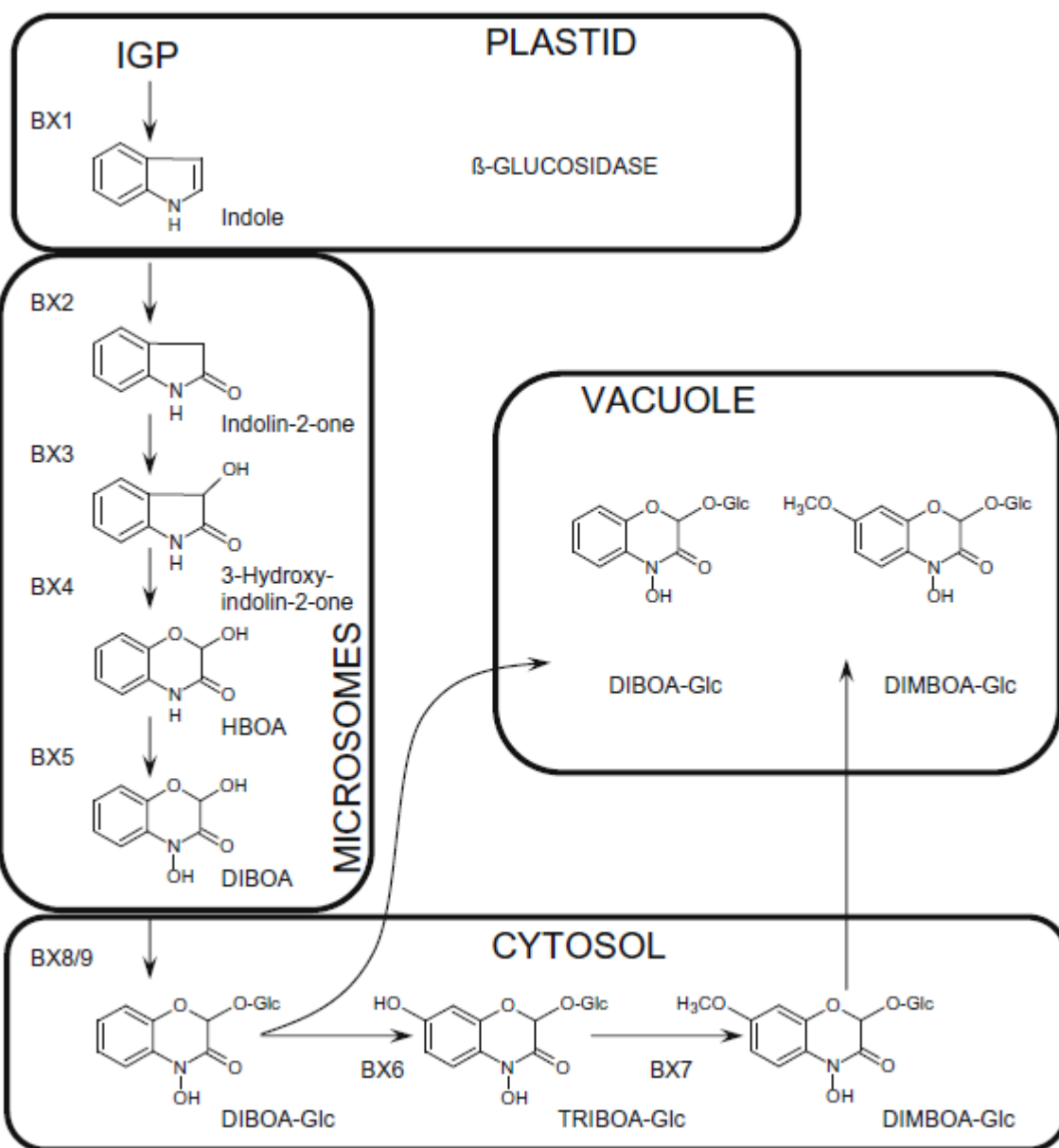


Figure 15 : Voie de biosynthèse des benzoxazinoïdes chez le maïs (*Zea mays*). Les fonctions enzymatiques des gènes dénommés *BX* sont les suivantes : *BX1* : indole 3-glycéril phosphate lyase ; *BX2/3/4/5* : cytochrome P450 monooxygénase ; *BX6* : dioxygénase 2-oxoglutarate-dépendante ; *BX7* : *O*-méthyltransférase ; *BX8/9* : UDP-glycosyltransférase (Frey et al., 2009).

Milkowski et al., 2004). Chez *Arabidopsis*, la famille des glucosinolates, comme leur nom l'indique, nécessite l'intervention d'UGTs (UGT74B1 et UGT74C1) pour leur biosynthèse (Grubb et al., 2004; Halkier and Gershenzon, 2006; Sonderby et al., 2010). UGT74B1 va ajouter un sucre sur le thiohydroximate et permettre la synthèse du désulfo-benzyl-glucosinolate (Grubb et al., 2004). L'activité antimicrobienne des glucosinolates est due à la formation de composés de dégradation sous l'action de *S*-glycosyl hydrolases (myrosinases) (Clay et al., 2009). De façon similaire, chez l'avoine, des UGTs ont été montrées comme impliquées dans la biosynthèse des avénacines. UGT74H6 va intervenir dans la transformation de l'acide *N*-méthylantranilique en acide *N*-méthylantranilique- β -D-glucopyranose et UGT74H7 dans la glycosylation de l'acide benzoïque pour former le benzoyl- β -D-glucopyranose. Ces deux molécules glycosylées peuvent ensuite être acétylées pour former les avénacines (Owatworakit et al., 2013). Les avénacines sont des saponines (ou triterpénoïdes) ayant une activité antifongique protectrice au niveau racinaire (Papadopoulou et al., 1999). La libération de la forme active nécessite l'intervention de β -glucosidases (ici des avénacosidases), qui vont retirer le groupement sucre et rendre aux molécules toute leur toxicité (Morant et al., 2008).

Dans certains cas, les UGTs intervenant dans la biosynthèse de métabolites secondaires participent à des métabolons. C'est le cas d'UGT85B1 qui participe à la synthèse de dhurrine (composé cyanogénique) chez *Sorghum bicolor* (Kristensen et al., 2005; Nielsen et al., 2008). Ce métabolon regroupe trois enzymes liées à la membrane du réticulum endoplasmique : deux cytochromes P450 monooxygénases, une NADPH oxydoréductase et une UGT (UGT85B1) cytosolique. Il semblerait que le canal formé par l'ensemble de ces enzymes, en plus de guider les intermédiaires vers l'étape suivante de synthèse, permette de réduire les effets toxiques sur la cellule (Bowles et al., 2006).

De nombreux métabolites secondaires tels que les coumarines, flavonols ou dérivés de l'acide sinapique pouvant avoir des effets toxiques sur la cellule sous leur forme aglycone vont être transformés en fin de voie de biosynthèse en glycones sous l'action d'UGTs (Bowles et al., 2006). Par exemple, les benzoxazinoïdes sont des composés de défense allélopathiques présents chez de nombreuses graminées comme le blé, le maïs, le seigle, certaines orges ainsi que chez quelques dicotylédones (Frey et al., 2009). Ces composés et leurs dérivés jouent un rôle de défense contre les agents pathogènes, les insectes herbivores et interviennent dans la communication des plantes avec leur environnement. La voie de biosynthèse des benzoxazinoïdes a été totalement élucidée chez le maïs (Frey et al., 1997; von Rad et al., 2001; Frey et al., 2003; Jonczyk et al., 2008). Cette voie (**Figure 15**) fait intervenir

plusieurs enzymes nommées BX1 à BX9. Parmi ces enzymes deux UGTs de la famille 1 interviennent : BX8 et 9 (von Rad et al., 2001; Dick et al., 2012). L'expression de BX8 et BX9 dans *A. thaliana* a mis en évidence leur rôle majeur dans la réduction de la toxicité du 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA) et du 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA). Une étude de la réponse d'Arabidopsis au benzoxazolin-2(3H)-one (BOA) montre que la détoxification de ce composé passe par la formation de BOA-6-O-glucoside (Baerson et al., 2005). Comme dans le cas des avénacines, le DIBOA et DIMBOA, après stockage dans la vacuole sous forme glycosylée, vont nécessiter l'action de β -glucosidases dans le plaste (Morant et al., 2008) pour être de nouveau bioactifs.

Implication des UGTs dans la détoxification de composés exogènes

Les polluants ou les molécules issues de l'agrochimie comme les pesticides peuvent être pris en charge par les plantes et entrer dans le processus de détoxification (**Figure 11**). Ce processus fait notamment intervenir des UGTs. Par exemple chez le blé et Arabidopsis, la formation de 3,4-dichloraniline-glucoside et 2,4,5-trichlorophénol-glucoside a pu être mise en évidence (Brazier et al., 2003; Loutre et al., 2003; Messner et al., 2003; Brazier-Hicks and Edwards, 2005). En 2002, il a été montré que le vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides* de la famille des Poacées) résistant aux herbicides avait une plus forte activité *O*-glycosyltransférase sur des xénobiotiques, le 4-nitrophénol et le 2,4,5-trichlorophénol (Brazier et al., 2002). Des lignées d'Arabidopsis surexprimant les UGTs UGT73B4 ou UGT73C1 montrent une plus grande capacité à glycosyler des produits de dégradation/réduction du TNT : l'hydroxylaminotrotoluène et l'amidodinitrotoluène (Gandia-Herrero et al., 2008).

3. UGTs et détoxification de fusariotoxines

Les plantes sont également capables de glycosyler les mycotoxines produites par les champignons ce qui aboutit à la production de mycotoxines dites masquées (Berthiller et al., 2013). Des glucosides de métabolites secondaires fongiques tels que les ochratoxines (Ruhland et al., 1996), le déoxynivalénol (Berthiller et al., 2005), le nivalénol (Yoshinari et al., 2014) ou la zéaralénone (Engelhardt et al., 1988) ont pu être identifiés. Plusieurs études ont cherché à mettre en évidence le pouvoir de détoxification des UGTs de plantes vis-à-vis de toxines de *F. graminearum*. L'expression de l'ADNc codant pour l'UGT73C6 d'Arabidopsis dans une souche de levure sensible à la zéaralénone a montré la capacité de cette UGT à former de la ZEA-4-O-glucoside et à conférer une résistance à la souche de levure sur un milieu contenant ce mycoestrogène (Poppenberger et al., 2006). En utilisant ce même

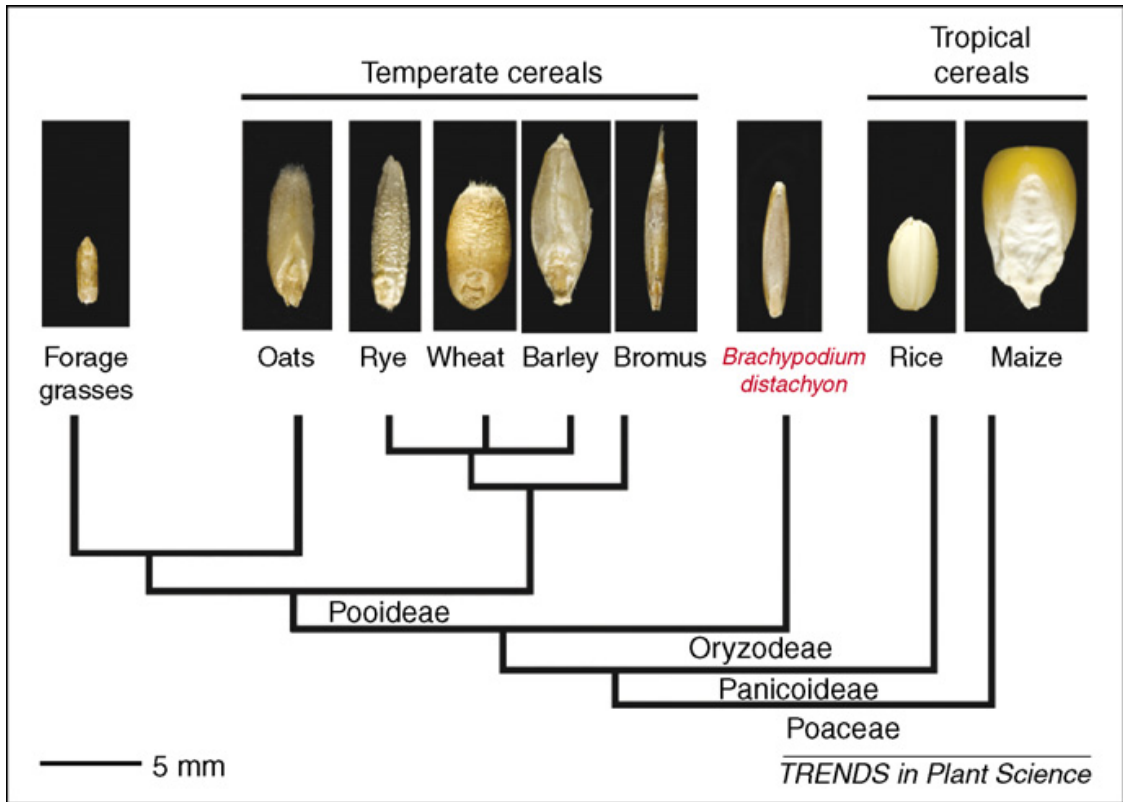


Figure 16 : Relations phylogénétiques dans la famille des *Poaceae* (Opanowicz et al., 2008).

modèle, la production de ZEA-16-*O*-glucoside a récemment été mise en évidence suite à l'expression d'une UGT d'orge (HvUGT14077) (Kovalsky Paris et al., 2014). Dès 2003, l'utilisation de ce modèle levure a mis en évidence la formation de DON-3-*O*-glucoside par l'expression de l'ADNc du gène *UGT73C5* d'*Arabidopsis* (Poppenberger et al., 2003). La surexpression d'*UGT73C5* dans *Arabidopsis* confère également une tolérance au déoxynivalénol sur milieu gélosé. Des études de transcriptomique large de la réponse de l'orge à *F. graminearum* ou au déoxynivalénol seul ont mis en évidence une très forte induction de l'expression de gènes codant des glycosyltransférases (Boddu et al., 2006; Boddu et al., 2007; Gardiner et al., 2010). Ces études ont permis d'identifier et de tester en système hétérologue levure quatre UGTs d'orge, HvUGT5876, HvUGT13248, HvUGT14077 et HvUGT19290, parmi lesquelles seule HvUGT13248 confère une résistance au DON à la levure. La surexpression du gène correspondant chez *Arabidopsis* confère également une tolérance au DON (Shin et al., 2012). Chez le blé, TaUGT3, induite par l'infection, a montré sa capacité à rendre *Arabidopsis* tolérant au DON lors de sa surexpression dans la plante (Lulin et al., 2010). Cependant, Schweiger et collaborateurs (2010) ont montré qu'en système hétérologue levure l'expression de *TaUGT3* ne conférait pas la résistance au DON.

Toutes ces études, bien que très informatives, sont parfois contradictoires et ne permettent en aucun cas d'établir une relation directe entre la tolérance au déoxynivalénol et la résistance à *F. graminearum*. Pour cela nous proposons d'utiliser la graminée modèle *Brachypodium distachyon*.

G. *Brachypodium distachyon* un modèle végétal pour les graminées

Brachypodium distachyon a été décrit comme un nouveau et futur modèle végétal pour les graminées en 2001 (Draper et al., 2001). Il s'agit d'une plante de petite taille, d'une vingtaine de centimètres en fonction des conditions de croissance. La densité peut aller jusqu'à 1000 plantes/m² soit 200 fois plus que le blé (Vogel and Bragg, 2009). Son temps de génération est court, compris entre 8 et 12 semaines pour l'écotype Bd21-3, et ne nécessite, pour certains écotypes pas de période de vernalisation si la photopériode est de 20 h de jour / 4 h de nuit et la thermopériode de 24°C/18°C. *B. distachyon* est une espèce diploïde, le génome organisé en 10 chromosomes, est de petite taille (272 Mb) et est entièrement séquencé (International Brachypodium Initiative, 2010), *Brachypodium* est phylogénétiquement plus proche du blé et de l'orge que ne le sont le riz ou le maïs (**Figure 16**) (Vogel et al., 2006b; Opanowicz et al., 2008).

1. Un modèle pour l'organisation des génomes

Dès 2006 une banque BAC (bacterial artificial chromosome, chromosome bactérien artificiel) de 9100 clones de *B. distachyon* a été construite (Hasterok et al., 2006) pour valider la haute synténie entre *Brachypodium* et les autres *Poaceae*. Depuis le séquençage complet de son génome, *Brachypodium* est constamment utilisé pour étudier les relations synténiques et la cartographie fine de marqueurs génétiques chez d'autres espèces comme le blé (Wicker et al., 2011; Adamski et al., 2013; Breen et al., 2013; Molnar et al., 2013), *Aegilops* spp. (Jia et al., 2013; Luo et al., 2013; Molnar et al., 2013) (*A. tauschii* correspondant à l'ancêtre du génome D de *T. aestivum*), *Triticum urartu* (Ling et al., 2013) (correspondant à l'ancêtre du génome A de *T. aestivum*), l'orge (Wicker et al., 2011; Acevedo-Garcia et al., 2013) et le seigle (Martis et al., 2013). La qualité d'assemblage du génome de *B. distachyon* (99,6%), sa forte synténie avec des espèces d'intérêt agronomique, la faible proportion de séquences répétées (72/272 Mb (Bevan et al., 2010)), l'annotation de 25 532 protéines soutenue à 90% par des données de RNA-seq Illumina représentant 180 000 ESTs (expressed sequence tags, séquences exprimées) (Vogel et al., 2006b; International *Brachypodium* Initiative, 2010) font ainsi de *B. distachyon* un excellent modèle pour les études de génomique comparative inter *Pooideae*.

2. Analyses fonctionnelles *in planta* : quels outils disponibles ?

La taille du génome, la disponibilité de sa séquence, la petite taille de la plante, son cycle de vie court sont clairement des atouts indispensables dans l'objectif d'utiliser *Brachypodium* comme modèle. Il existe de nombreux outils développés par la communauté scientifique pour le rendre attractif et compétitif. *B. distachyon* peut être transformé de façon stable par *Agrobacterium tumefaciens* depuis 2006 (Vogel et al., 2006a; Pacurar et al., 2008; Vain et al., 2008; Vogel and Hill, 2008; Alves et al., 2009; Thole and Vain, 2012). Cette capacité de transformation à partir de cals embryogènes a permis la construction de banques de mutants T-DNA dans l'écotype Bd21 et Bd21-3 (Thole et al., 2009; Thole et al., 2010; Bragg et al., 2012; Thole et al., 2012). Ces banques (<http://www.brachytag.org/> et <http://brachypodium.pw.usda.gov/>) désormais regroupées à l'USDA-ARS, Western Regional Research Center aux Etats-Unis représentent environ 28 000 mutants et couvrent un tiers du génome. Une banque de mutants TILLING est également disponible en France (<http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb> ; (Dalmais et al., 2013)). Celle-ci a été réalisée sur l'écotype Bd21-3 avec utilisation d'azide de sodium comme agent mutagène. Elle comprend à l'heure

actuelle 5530 familles mutantes. Une seconde collection de mutants TILLING est disponible au Boyce Thompson Institute for Plant Research (<http://brachybio.iplantcollaborative.org/>). Une puce Affymetrix est disponible (<http://www.affymetrix.com>; sous le nom de BradiAR1b520742). Malgré la difficulté de réaliser des croisements entre deux lignées de *Brachypodium*, cela est désormais possible (Garvin et al., 2008) et a abouti à la création de populations en ségrégation. Les populations disponibles à l'heure actuelle sont les suivantes : Bd21 x BdTR 1-1f ; Bd21 x Bd3-1 ; Bd3-1 x Bd21 ; Adi-9 x Bd3-1 et Bd3-1 x Bd1-1 (http://www6.versailles-grignon.inra.fr/ijpb-brachypodium_eng/RILs-and-natural-accessions); Bd2-3 x Bd21 et Bd3-1 x Bd2-3 (<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=18531>).

3. Processus biologiques étudiés

Brachypodium distachyon est utilisé de manière croissante pour étudier de nombreux processus biologiques de développement, d'évolution ou de réponse à des stress abiotiques / biotiques (Catalan et al., 2014). Nous nous concentrerons par la suite sur quelques exemples précis.

a. La saccharification un élément majeur pour la production de bioéthanol

La saccharification consiste à transformer (généralement par hydrolyse) en sucres simples (glucose ou saccharose) les matières à base d'amidon ou de cellulose. La production de bioéthanol à partir de résidus de grandes cultures ou de plantes cultivées dans ce but comme *Miscanthus*, se heurte à la présence de lignine dans les parois végétales. En effet, plus la teneur en lignine dans les tissus végétaux est importante moins le rendement de l'hydrolyse de la cellulose en sucre simple est efficace (Nakagame et al., 2011). La composition monosaccharidique de la paroi primaire de *B. distachyon* est similaire à celle d'*H. vulgare* et *T. aestivum* (Christensen et al., 2010), cependant elle diffère de celle de ces deux espèces par son plus faible niveau de substitution d'arabinoxylane dans l'hémicellulose (Christensen et al., 2010). La mutation du gène *BdCAD1* codant pour une cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD) chez *B. distachyon* réduit de 20% l'activité CAD, de 20 à 26% la teneur en lignine Klason dans les tiges et augmente la saccharification de 45% en comparaison aux plantes sauvages (Bouvier d'Yvoire et al., 2013). De plus, les auteurs ont montré que la biomasse produite n'est pas différente entre les lignées mutantes pour le gène *CAD1* et les plantes sauvages, ce qui rend la réduction partielle de l'activité CAD, spécifique à la formation de la lignine, une piste intéressante à explorer pour améliorer la saccharification des plantes en C3.

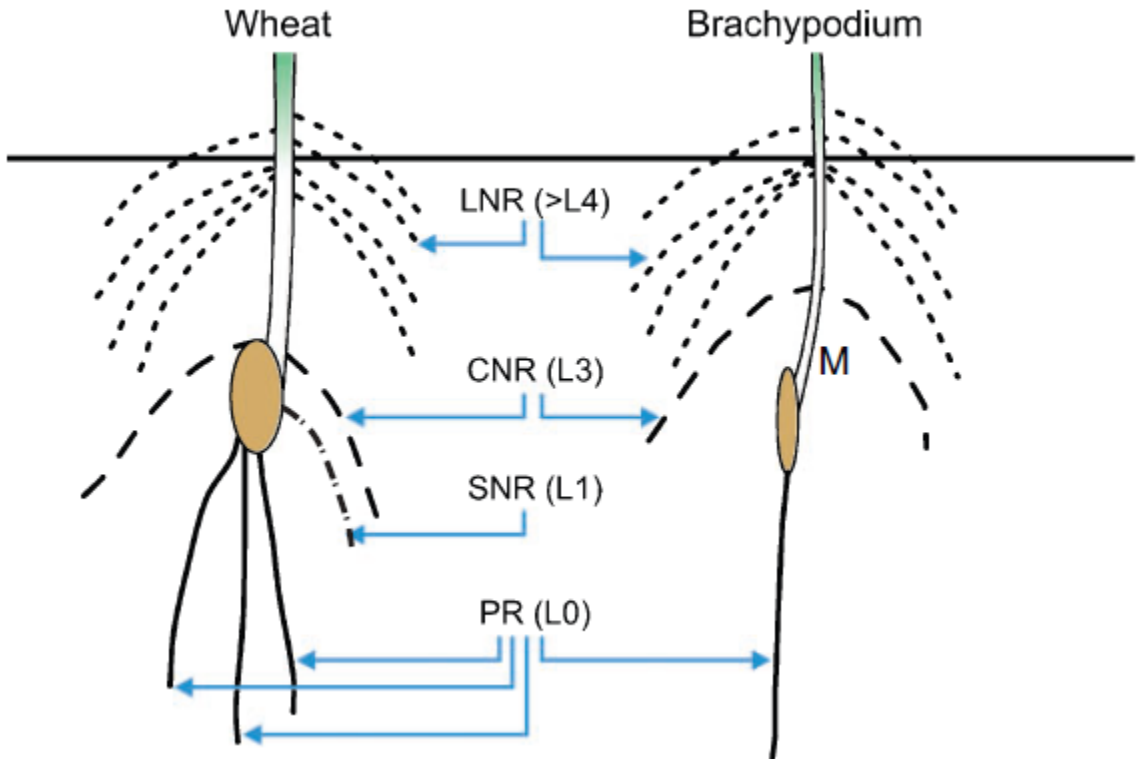


Figure 17 : Structure de l'appareil racinaire chez le blé (gauche) et chez *B. distachyon* (droite). PR : primary axile root (racine primaire) ; CNR : coleoptile node axile root (racine adventive à partir du coléoptile) ; SNR : scutellar node root (racine adventive à partir du nœud du scutellum) ; LNR : leaf node axile roots (racine adventive à partir du premier nœud de la tige) ; M : mésocotyle situé entre la graine et le coléoptile, celui-ci croît chez Brachypodium (Watt et al., 2009).

b. Etude des stress abiotiques et biotiques

La sélection du blé a été construite sur la base de caractères comme le rendement, la qualité nutritive des grains ou encore la résistance aux maladies mais dans aucun cas sur l'architecture racinaire (Chochois et al., 2012). Pourtant, le système racinaire constitue un élément majeur dans l'assimilation des nutriments, de l'eau et donc indirectement dans la tolérance à la sécheresse. *Brachypodium* possède un système racinaire proche du blé malgré l'absence de racines adventives sur le scutellum (**Figure 17**) (Watt et al., 2009). C'est dans ce contexte qu'il est proposé comme modèle d'étude (Watt et al., 2009; Chochois et al., 2012). La sélection humaine et la culture des céréales d'intérêt dans des régions aux climats favorables ont contre-sélectionné les caractères associés à la résistance au stress hydrique. Dans le but d'identifier ces caractères, l'espèce non domestiquée *B. distachyon* tolérante à ce stress est idéale. 57 écotypes naturels de *B. distachyon* ont été testés pour leur tolérance / sensibilité à la sécheresse. Trois écotypes se sont montrés particulièrement tolérants (Luo et al., 2011). Les auteurs proposent d'utiliser la variabilité naturelle pour rechercher des allèles bénéfiques pour ce caractère de tolérance. Une analyse transcriptomique de différentes zones de la feuille (prolifération, expansion ou fin de croissance cellulaire) en réponse à un stress hydrique met en évidence le rôle de la biosynthèse des stérols dans la tolérance à la sécheresse chez *Brachypodium* (Verelst et al., 2013). *Brachypodium* est également utilisé dans le cadre de l'étude du stress température (chaud ou froid) (Priest et al., 2014; Ryu et al., 2014) ou salin (Priest et al., 2014).

De nombreuses études ont porté sur la capacité de *Brachypodium* à se comporter comme un hôte en réponse aux agents pathogènes des céréales, du blé tendre en particulier. Ces études ont montré qu'effectivement *Brachypodium* est un hôte pour de nombreux pathogènes du blé et de l'orge sauf dans quatre cas d'interactions (**Tableau 6**). *Brachypodium* possède une résistance non hôte à *P. graminis* f. sp. *tritici*, f. sp. *lolii* et f. sp. *phlei-pratensis*, des agents de rouilles (Ayliffe et al., 2013; Figueroa et al., 2013) et à *Mycosphaerella graminicola*, agent responsable de la septoriose foliaire du blé (Kellner et al., 2014). Cette résistance s'explique par la spécificité très étroite qui existe entre les agents pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes et leurs hôtes respectifs. Une souche de *P. brachypodii*, agent pathogène biotrophe sur *B. distachyon*, a été utilisée pour identifier avec succès des QTLs de résistance dans les écotypes Bd3-1 et Bd1-1 par l'utilisation de la population en ségrégation Bd3-1 x Bd1-1 (Barbieri et al., 2012). Une étude de la réponse à une gamme d'insectes et de champignons (**Tableau 7**) (Sandoya and Buanafina, 2014) a démontré qu'il existe une

Tableau 6 : Liste des agents pathogènes testés sur la plante modèle *B. distachyon*.

Agents pathogènes	Hôte / non hôte	Références
<i>Magnaporthe grisea</i>	hôte	Allwood et al., 2006; Parker et al., 2008; Parker et al., 2009; Sandoya and Buanafina, 2014
<i>Oculimacula</i> spp.	hôte	Peraldi et al., 2014
<i>Ramularia collo-cygni</i>	hôte	Peraldi et al., 2014
<i>Fusarium graminearum</i>	hôte	Deguercy, 2010; Peraldi et al., 2011
<i>Fusarium culmorum</i>	hôte	Peraldi et al., 2011
<i>Puccinia brachypodii</i>	hôte	Barbieri et al., 2012
<i>Rhizoctonia solani</i>	hôte	Sandoya and Buanafina, 2014; Schneebeli et al., 2014
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	hôte	Pogorelko et al., 2013
<i>Ustilago bromivora</i>	hôte	Barbieri et al., 2012
BSMV (barley stripe mosaic virus)	hôte	Cui et al., 2012
PMV (Panicum mosaic virus)	hôte	Mandadi and Scholthof, 2012
SPMV (virus satellite du Panicum mosaic virus)	hôte	Mandadi and Scholthof, 2012
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	non hôte	Ayliffe et al., 2013; Figueroa et al., 2013
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>lolii</i>	non hôte	Ayliffe et al., 2013; Figueroa et al., 2013
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>phlei-pratensis</i>	non hôte	Ayliffe et al., 2013; Figueroa et al., 2013
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	non hôte	Kellner et al., 2014

Tableau 7 : Espèces pathogènes utilisées dans l'étude Sandoya and Buanafina (2014).

Type de pathogènes	Espèces
Insectes	<i>Spodoptera frugiperda</i>
	<i>Diuraphis noxia</i>
Champignons	<i>Magnaporthe grisea</i>
	<i>Colletotrichum cereale</i>
	<i>Pythium aphanidermatum</i>
	<i>Ophiosphaerella agrostis</i>
	<i>Ophiosphaerella korrae</i>
	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>avenae</i>
	<i>Magnaporthe poae</i>
<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	
Bactérie	<i>Rhizoctonia solani</i>

variabilité naturelle de résistance / sensibilité entre les différents écotypes de *B. distachyon* à l'ensemble de ces agents pathogènes.

Le PMV (*Panicum mosaic virus*) et le SPMV (virus satellite du *Panicum mosaic virus*) sont des virus capables d'infecter les graminées utilisées pour leurs grains ou pour le bioéthanol. En 2012, l'utilisation de *Brachypodium* a mis en évidence que le synergisme entre ces deux virus, avec des symptômes exacerbés lors de l'infection par le PMV et le SPMV en comparaison au PMV seul, résulte de la modulation de l'expression de gènes dans le métabolisme du carbone, la photosynthèse, les modifications post-traductionnelles, le remodelage de la paroi cellulaire et la mort cellulaire (Mandadi and Scholthof, 2012).

L'ensemble de ces études ainsi que la totalité des outils disponibles démontrent le rôle majeur, présent et futur, de *Brachypodium distachyon* comme modèle pour la réalisation d'analyses fonctionnelles *in planta* par approche gène candidat ou sans *a priori* sur des questions biologiques liées aux céréales d'intérêt agronomique dans l'objectif de transférer par la suite ces connaissances.

H. Objectifs de la thèse

De nombreuses études sur les céréales, telles que le blé ou l'orge, ont eu lieu en réponse aux agents pathogènes responsables d'importantes pertes économiques. Certaines ont mis en évidence des QTLs de résistance à la fusariose des épis provoquée majoritairement par *Fusarium graminearum* (Buerstmayr et al., 2009). Le QTL majeur *Fhb1* a pu être associé chez le blé à la capacité de la plante à glucosyler le déoxynivalénol (Lemmens et al., 2005). Ce type de conjugaison est réalisé par des UDP-glycosyltransférases. Comme mentionné dans les paragraphes précédents, elle a pu être montrée dans plusieurs systèmes hétérologues comme la levure ou *Arabidopsis* (Poppenberger et al., 2003; Schweiger et al., 2010; Shin et al., 2012). Cependant, aucun de ces systèmes ne permet de réaliser des analyses fonctionnelles *in planta* pour déterminer s'il existe ou non une relation directe entre détoxification des mycotoxines et résistance à l'agent pathogène. Dans ce contexte, l'équipe a choisi d'utiliser le nouveau modèle d'étude pour les céréales, *Brachypodium distachyon*, pour essayer de répondre à cette question scientifique. En effet, *B. distachyon* est une plante hôte de *F. graminearum*, sur laquelle il induit des symptômes caractéristiques de la fusariose et produit des mycotoxines (Deguercy, 2010; Peraldi et al., 2011).

L'objectif principal de ma thèse a été d'évaluer s'il y a une relation directe entre la conjugaison du déoxynivalénol et la résistance à l'agent pathogène comme suggéré précédemment.

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer chez *B. distachyon* quelles étaient les différentes réponses moléculaires et métaboliques en réponse à l'infection par une souche de *F. graminearum* produisant majoritairement du DON et une souche dérivée de cette dernière, dans laquelle le gène *Tri5* a été inactivé et ayant par conséquent perdue la capacité à produire la mycotoxine (Cuzick et al., 2008). Nous avons réalisé une approche de transcriptomique large en réponse aux deux souches sur puce Affymetrix. Ces analyses ont été étoffées par des analyses de métabolomique (HPLC-UV et HPLV-UV couplée à un spectromètre de masse) (**Chapitre 1, Article 1**). Ces résultats ont pu récemment être complétés par une analyse transcriptomique de la réponse au DON seul sur puce Affymetrix. Une comparaison succincte entre la réponse à *F. graminearum* (+/- DON) et au DON sera présentée en fin de **chapitre 1**.

Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les orthologues potentiels du gène *Hv13248* de l'orge et d'*UGT73C5* d'*Arabidopsis* chez *B. distachyon* par une stratégie en plusieurs étapes. Tout d'abord, les orthologues potentiels ont été identifiés par une analyse phylogénétique de l'ensemble des séquences protéiques correspondante à des UGTs potentiellement fonctionnelles chez *B. distachyon*. Un tri parmi les gènes candidats a été réalisé par l'analyse de leurs profils d'expression *in planta* en réponse à la mycotoxine et à l'agent pathogène ainsi que par la capacité des protéines correspondantes à conférer la résistance en système hétérologue levure, tout ceci dans le but de déterminer un candidat idéal pour la réalisation d'analyses fonctionnelles dans une plante hôte de *F. graminearum* (**Chapitre 2, Article 2**).

Dans un dernier temps, nous avons réalisé l'analyse fonctionnelle *in planta* du gène candidat identifié au cours du **chapitre 2**. Pour cela, nous avons entrepris la recherche de lignées altérées dans le gène, et donc dans la protéine correspondante, et la construction de lignées surexprimant le gène cible. La caractérisation de ces lignées en réponse au déoxynivalénol et à l'agent pathogène a été menée et renforcée par la quantification de mycotoxines (**Chapitre 3, Article 3**). Ce chapitre sera complété par des données sur la capacité de cette protéine à conférer une tolérance à d'autres mycotoxines de *F. graminearum* et par l'étude du comportement de ces lignées suite à l'infection par des souches fongiques productrices de ces mycotoxines (**Chapitre 3**).

CHAPITRE 1 : Caractérisation macroscopique, transcriptomique et métabolomique de l'interaction entre *B. distachyon* et *F. graminearum*

Introduction

Les approches «-omics» permettent d'avoir une vision globale des modifications entraînées dans le transcriptome, le protéome ou le métabolome dans une condition de stress biotique ou abiotique, par exemple. Dans le cadre de la fusariose des épis des céréales, ces approches ont mis en évidence de nombreuses modifications (voir **Introduction**, partie **E.**). L'ensemble de ces stratégies sont complémentaires et indissociables les unes des autres afin de mieux appréhender les réponses de défense des plantes (Kushalappa and Gunnaiah, 2013).

Les gènes impliqués dans les réponses de défense des céréales (blé ou orge) à la fusariose ont pu être classés dans les grandes catégories suivantes : paroi cellulaire, métabolisme primaire, protéines impliquées dans le burst oxydatif, processus de détoxification, métabolisme secondaire, métabolisme des acides aminés, protéines de transport, signalisation, régulation de l'expression, hormones, protéines de réponse aux stress et les ribosomes. L'implication des phénylpropanoïdes dans la résistance à la FHB a été mise en évidence de façon assez exhaustive par la détection de métabolites associés à cette voie comme par exemple l'acide *p*-coumarique, la phénylalanine, l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide sinapique ou la syringine (Kumaraswamy et al., 2011a; Kumaraswamy et al., 2011b; Gunnaiah et al., 2012). La conjugaison d'acides hydroxycinamiques avec des amides a également été associée à la résistance, avec la détection et l'accumulation de *p*-coumaroylputrescine, de féruloylputrescine, de féruloylagmatine, de cafféoylsérotonine ou de féruloylsérotonine dans un fond génétique portant le QTL de résistance *Fhb1* (Gunnaiah et al., 2012). D'autres classes métaboliques comme les flavonoïdes, les terpènes ou des intermédiaires de signalisation ou de biosynthèse de l'acide jasmonique ont été trouvés fortement représentés dans un contexte de résistance à l'agent pathogène (Kumaraswamy et al., 2011a; Kumaraswamy et al., 2011b; Gunnaiah et al., 2012).

B. distachyon a émergé pendant les 10 dernières années comme un nouvel organisme modèle pour les céréales (Draper et al., 2001; Opanowicz et al., 2008; Vogel and Bragg, 2009; Brkljacic et al., 2011; Mur et al., 2011; Catalan et al., 2014). Plus récemment, l'interaction entre *B. distachyon* et *F. graminearum* a été décrite comme compatible (Deguercy, 2010; Peraldi et al., 2011). L'objectif de ce premier chapitre est de montrer que *B. distachyon*, hôte de *F. graminearum*, échafaude des réponses moléculaires et métaboliques proches de celles connues chez l'orge ou le blé. L'ensemble de ces éléments permettra non seulement de s'assurer de la pertinence d'utiliser ce pathosystème dans la réalisation

d'analyses fonctionnelles sur la FHB mais également de constituer une banque de données essentielle pour la thématique de l'équipe.

Afin de répondre à ces objectifs, nous avons caractérisé de manière comparative le comportement *in planta* d'une souche productrice de DON ($FgDON^+$) et d'une souche incapable d'en produire ($FgDON^-$). Chez le blé, cette dernière est incapable de coloniser l'ensemble de l'épillet (Jansen et al., 2005; Maier et al., 2006). Nous avons évalué chez *B. distachyon* le développement de ces deux souches par observation des symptômes macroscopiques et par cytologie. Un suivi dans le temps de la biomasse fongique et de la formation d'inoculum secondaire a également été réalisé.

Dans un second temps, nous avons développé une approche de transcriptomique comparative de la réponse de la plante à ces deux souches ($FgDON^+$ et $FgDON^-$) pour évaluer si les modifications observées du transcriptome en réponse à l'infection chez *B. distachyon* sont de même nature que celles connues chez le blé ou l'orge. La dérégulation d'expression observée a été validée par qPCR pour un sous-ensemble de gènes. A partir d'un exemple de gènes différentiellement régulés entre les souches et potentiellement impliqués dans la même voie métabolique nous avons essayé de mettre en évidence des modifications dans l'accumulation ou la présence des métabolites associés. Pour cela nous avons réalisé un profilage métabolique des différentes conditions par HPLC-MS/MS.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons réalisé une comparaison des transcriptomes de la plante en réponse à l'agent pathogène et en réponse à l'application de DON.

Les données transcriptomiques ainsi obtenues permettront également au laboratoire d'en disposer dans leur intégralité pour le développement de futurs projets et la recherche de nouveaux gènes candidats codant potentiellement des cibles du DON ou susceptibles d'être impliqués dans les processus de détoxification de la mycotoxine dans la plante.

Article 1 : Differential gene expression and metabolomic analyses of *Brachypodium distachyon* infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of *Fusarium graminearum*

Jean-Claude Pasquet, Séjir Chaouch, Catherine Macadré, Sandrine Balzergue, Stéphanie Huguet, Marie-Laure Martin-Magniette, Floriant Bellvert, Xavier Deguercy, Vincent Thareau, Dimitri Heintz, Patrick Saindrenan and Marie Dufresne

BMC Genomics (2014) **15**: 629

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Differential gene expression and metabolomic analyses of *Brachypodium distachyon* infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of *Fusarium graminearum*

Jean-Claude Pasquet¹, Séjir Chaouch¹, Catherine Macadré¹, Sandrine Balzergue², Stéphanie Huguet², Marie-Laure Martin-Magniette^{2,3}, Floriant Bellvert⁴, Xavier Deguercy¹, Vincent Thareau¹, Dimitri Heintz⁵, Patrick Saindrenan¹ and Marie Dufresne^{1*}

Abstract

Background: Fusarium Head Blight (FHB) caused primarily by *Fusarium graminearum* (*Fg*) is one of the major diseases of small-grain cereals including bread wheat. This disease both reduces yields and causes quality losses due to the production of deoxynivalenol (DON), the major type B trichothecene mycotoxin. DON has been described as a virulence factor enabling efficient colonization of spikes by the fungus in wheat, but its precise role during the infection process is still elusive. *Brachypodium distachyon* (*Bd*) is a model cereal species which has been shown to be susceptible to FHB. Here, a functional genomics approach was performed in order to characterize the responses of *Bd* to *Fg* infection using a global transcriptional and metabolomic profiling of *B. distachyon* plants infected by two strains of *F. graminearum*: a wild-type strain producing DON (*Fg* DON⁺) and a mutant strain impaired in the production of the mycotoxin (*Fg* DON⁻).

Results: Histological analysis of the interaction of the *Bd*21 ecotype with both *Fg* strains showed extensive fungal tissue colonization with the *Fg* DON⁺ strain while the florets infected with the *Fg* DON⁻ strain exhibited a reduced hyphal extension and cell death on palea and lemma tissues. Fungal biomass was reduced in spikes inoculated with the *Fg* DON⁻ strain as compared with the wild-type strain. The transcriptional analysis showed that jasmonate and ethylene-signalling pathways are induced upon infection, together with genes encoding putative detoxification and transport proteins, antioxidant functions as well as secondary metabolite pathways. In particular, our metabolite profiling analysis showed that tryptophan-derived metabolites, tryptamine, serotonin, coumaroyl-serotonin and feruloyl-serotonin, are more induced upon infection by the *Fg* DON⁺ strain than by the *Fg* DON⁻ strain. Serotonin was shown to exhibit a slight direct antimicrobial effect against *Fg*.

Conclusion: Our results show that *Bd* exhibits defense hallmarks similar to those already identified in cereal crops. While the fungus uses DON as a virulence factor, the host plant preferentially induces detoxification and the phenylpropanoid and phenolamide pathways as resistance mechanisms. Together with its amenability in laboratory conditions, this makes *Bd* a very good model to study cereal resistance mechanisms towards the major disease FHB.

Keywords: Fusarium Head Blight, *Brachypodium distachyon*, Transcriptome, Metabolic profiling, Serotonin

* Correspondence: marie.dufresne@u-psud.fr

¹Institut de Biologie des Plantes, Unité Mixte de Recherche 8618, Saclay Plant Sciences, Université Paris-Sud, Orsay 91405, France

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

Background

Among diseases affecting small-grain cereals, Fusarium head blight (FHB), mainly caused by *Fusarium graminearum* (*Fg*), is a major concern (for a review, see [1]): it reduces yields but also causes quality losses due to the production of mycotoxins, including deoxynivalenol (DON), which are harmful to humans and animals [2,3]. *Brachypodium distachyon* (*Bd*) is an emerging model species for small-grain cereals [4]. This species is more closely-related to barley and wheat than rice and is very amenable to functional studies in laboratory conditions: a short life cycle, a small size, a routine genetic transformation and numerous genetic and genomic resources [5]. Recently, *Bd* has been shown to behave as a host plant for *Fg* [6], exhibiting characteristic symptoms, in particular at the spikes' level, and has been proposed as a valuable model for undertaking functional genomics studies of FHB. There is no specific resistance to *Fg*, but a number of quantitative trait loci have been identified [7], some of which have been associated with the ability to detoxify DON [8,9]. Detoxification processes in plants involve chemical modifications of the xenobiotic by enzymes such as UDP-glycosyltransferases (UGTs), glutathione-S-transferases (GST) or cytochrome P450 mono-oxygenases (CYP). Chemically modified metabolites are then transported either to the vacuoles or to the plant cell wall, or exported in the apoplast [10]. A number of more or less exhaustive transcriptomic analyses conducted in bread wheat or barley have shown that genes encoding such functions were highly induced by DON-producing strains of *Fg* [11-13] and/or in resistant lines [8,9,14,15]. Similarly, metabolomic studies have allowed the identification of resistance-associated metabolites, including DON-3-O-glucose (DON-Glc) [16,17]. Despite these numerous studies, no direct evidence of the relationship between mycotoxin detoxification and resistance towards *Fg* has been reported to date. The main reason is that functional analyses in cereal crops are hampered by the complexity of these species.

In the present study, we aimed at better characterizing the *Bd-Fg* interaction in order to (i) further establish *Bd* as a good model system to perform functional genomics studies of the interaction; (ii) decipher the potential role of DON in the infection process and (iii) identify some potential resistance mechanisms to FHB. For this purpose, we first performed an in depth analysis of the behavior of *Bd* ecotype Bd21 plants following infection with either the DON-producing (*Fg* DON⁺) or DON non-producing (*Fg* DON⁻) strains of *Fg*, using a number of quantitative and qualitative traits. We then acquired transcriptomic and metabolomic data on the same biological material. The results are described and the main pathways/functions involved in the plant-pathogen interaction, and in response to DON

are presented. The analogy to results previously described in cereal crops is discussed.

Methods

Plant growth conditions

B. distachyon ecotype Bd21 (hereafter referred to as Bd21) was cultivated in a growth chamber under a 20 h light period at 23°C ± 2°C under fluorescent light (265 μE.m⁻².s⁻¹ at the soil level and approximately 315 μE.m⁻².s⁻¹ at the spikes' level). Prior to sowing, seeds were surface sterilized by incubation in a 0.6% sodium hypochlorite solution for 10 min with gentle shaking followed by three rinses in sterile distilled water. Sterilized seeds were subsequently incubated for five days at 4°C in the dark. Plants were grown routinely on a 3:1 mixture of compost (Tref terreau P1, Jiffy France SARL, Trevoux, France) and standard perlite (Sinclair, Gainsborough, UK), soaked with an aqueous solution containing a carbamate fungicide (Previcur at 2 ml/L, Bayer Crop Sciences, Lyon, France) and a larvicide (Hortigard at 1 g/L, Syngenta France, Guyancourt, France). Plants were usually watered in two- to three-day intervals using a standard nutritional solution and were never allowed to stand in water.

F. graminearum strain maintenance and conidia production

F. graminearum strains PH-1 (*Fg* DON⁺) and $\Delta tri5$ (MU102 mutant strain or *Fg* DON⁻, [18]) were maintained on PDA plates. To obtain conidia, 2–4 mm² plugs from 15-day old PDA plates were inoculated in liquid mung bean medium ([19], 10 plugs for 20 ml) and incubated with shaking at 150 rpm at room temperature for five to six days. The resulting conidial suspension was then diluted ten times in fresh liquid mung bean medium and further incubated for five to six additional days under the same conditions. For pathogenicity assays, conidia were further filtrated onto sterile Miracloth (Calbiochem, Toulouse, France) and resuspended in 0.01% Tween 20 at a final concentration of 10⁵ conidia/ml.

Serotonin effect on *Fusarium graminearum* in vitro

The effect of serotonin on radial growth was estimated by placing a mycelial plug (3 mm diameter) of the *Fg* DON⁺ strain in the center of a Petri dish (5.5 cm) containing PDA broth added with 0, 1 or 5 mM of serotonin (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Radial growth was estimated after 24 and 48 h incubation at 26°C. To measure the impact on fungal sporulation, 1 ml of mung bean liquid medium containing a final concentration of 0, 1 or 5 mM serotonin was inoculated with 10⁴ conidia of the *Fg* DON⁺ strain and conidia were counted daily using a Thoma cell during one week. Conidia germination was performed on water agar (2%) containing serotonin (0, 1 or 5 mM). For each counting, the proportion of germinated conidia was

estimated over a minimal total number of 100 conidia. Counting was performed 3 times for each serotonin concentration and for each incubation time after depositing conidia on the agar (3, 6 or 9 h).

Pathogenicity assays

Inoculation was performed by depositing 300 conidia (3 μ l of a 10^5 conidia/ml suspension) into a central floral cavity of the second spikelet starting from the top of the spike of Bd21 plants at mid-anthesis (approximately 30 to 35 days after sowing). A single spike was inoculated per plant to further guarantee the independency of the samples. Inoculated plants were covered with clear plastic bags sprayed with distilled water beforehand. The inoculated heads were first kept in the dark for 24 h then incubated in a 16 h light/8 h darkness photoperiod at 20°C with light intensities similar to the ones used for plant development (see section Plant growth conditions). Application of 0.01% Tween 20 was performed as a control condition.

Microscopy analysis

Infected spikelets were cleared in ethanol/acetic acid (3:1) 48 and 72 h after inoculation with *F. graminearum* and were stained with Trypan blue in lactophenol (Fluka, Lyon, France) following a procedure adapted from Cao et al. [20]. Spikelets were boiled for 5 min in lactophenol/Trypan blue (0.1%) and destained for 24 h in chloral hydrate solution (8 g of chloral hydrate, 1 ml 100% glycerol, and 2 ml sterile water) to remove staining. Images were captured on an Axioskop microscope (Zeiss) with a Spot RT slider camera (Diagnostic Instrument).

Quantification of fungal genomic DNA in infected spikes

DNA was extracted from 100 mg of crushed infected spikelets. 600 μ l of buffer extraction (Buffer 10x (NaCl 3.5 M, Tris HCl, pH 7.6 0.1 M, EDTA 10 mM), urea 4.2 g, EDTA 0.5 M 1 ml, phenol pH 7.5 0.65 ml and volume brought to 10 ml with water) were added then heated 5 min at 50°C and agitated 10 min at room temperature. 700 μ l of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25-24-1) were added, the aqueous phase was extracted, 700 μ l of chloroform were added and the aqueous phase was extracted again. Nucleic acids were precipitated with one volume of isopropanol and washed with 1 ml of ethanol 70%. The pellet was resuspended in water with RNase A (40 μ g/ml) (Sigma Aldrich, Lyon, France). Quantification of fungal DNA was realized by qPCR on 10 ng of total DNA using primers specific for the 18S ribosomal subunit-encoding genomic region [21] (Additional file 1).

Quantification of fungal sporulation on infected plant tissue

7, 10, 14 and 21 days after inoculation, 5 spikes (with three spikelets among which the central one was inoculated by

the point inoculation method described above) were pooled in 10 ml of sterile water and shaken for 30 min at 180 rpm. They were filtrated onto sterile Miracloth (Calbiochem, Toulouse, France) and conidia were counted in a Thoma cell.

Detection of fungal colonization of the rachis

Point inoculated spikes were collected at 7 days after inoculation. Spikelets were removed and the surface of the rachis was sterilized with ethanol 100%. Five fine slices (named a to e) from the rachis were cut and deposited onto a Petri dish containing water/agar (2%). 48 or 72 h after incubation at 26°C, the presence or absence of mycelial growth on the Petri dish out of the different rachis sections was observed.

Material preparation for microarray experiments and transcriptome analyses

Three independent biological replicates differing by their sowing dates were produced. For each biological repetition, four inoculated spikelets per time point were collected at 0, 24, 48, 72 and 168 h after fungal inoculation (hai, strains *Fg* DON⁺ or *Fg* DON⁻). For the 96 hai used for the microarray analysis, 6 spikelets, coming from 6 independent plants, were collected from each biological replicate and pooled for RNA extraction. For each sample, spikelets were ground in liquid nitrogen and total RNA was extracted from 0.1 g of the resulting powder using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France) followed by an RNase-free DNase I step (Ambion[®], Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to manufacturers' instructions. Total RNA was subsequently cleaned using the NucleoSpin RNA Clean-up XS kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to the supplier's conditions.

Microarray experiments

AFFYMETRIX array hybridization

RNA samples originating from the 96 hai time point were checked for their integrity on The Agilent 2100 bioanalyzer according to the Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).

For each sample, 50 ng of total RNA was used as a manufacturer recommendation to synthesize cDNA with the Ovation[®] Pico WTA System V2 kit (NuGEN Technologies Inc.). Single stranded cDNA was quantified with NanoDrop[®] (Spectrophotometer ND1000, Thermo Fisher Scientific) and 5 μ g of SPIA cDNA were used to synthesize fragmented labeled single-strand cDNA with The Encore Biotin Module kit (NuGEN Technologies Inc.).

For all samples, hybridization was performed for 16 hours at 45°C to Affymetrix GeneChip[®] Brachypodium Genome Array. After hybridization, the arrays were washed with 2 different buffers (stringent: 6X SSPE, 0.01% Tween-20 and non-stringent: 100 mM MES, 0.1 M [Na⁺], 0.01% Tween-

20) and stained with a complex solution including Streptavidin R-Phycoerythrin conjugate (Invitrogen/molecular probes, Carlsbad, CA) and anti Streptavidin biotinylated antibody (Vectors laboratories, Burlingame, CA). The washing and staining steps were performed in a GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix). The Affymetrix GeneChip® Brachypodium Genome Arrays were finally scanned with the GeneChip® Scanner 3000 7G piloted by the Command Console Launcher Tool.

Statistical analysis of microarray data

The statistical analysis was based on probesets corresponding to the 53,263 genes. The data were normalized with RMA method [22] by using RMAExpress. To determine differentially expressed genes, we performed a usual two group t-test that assumes equal variance between groups. The variance of the gene expression per group is a homoscedastic variance, where genes displaying extremes of variance (too small or too large) were excluded. The raw p-values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the Family Wise Error Rate (FWER) [23]. A gene is declared differentially expressed if the Bonferroni p-value is less than 0.05.

Data deposition

All raw and normalized data are available in the CATdb database [24] (Project AFFY_BRACHY_2011_11) and in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) [25], accession number GSE50665.

Gene annotation

Assignment of putative function to down- or up-regulated genes was performed using the combined use of the Planet site (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de>) and NCBI Blast [26].

Real-time PCR

cDNA synthesis was performed on 1 µg of total RNA using the ImProm-II™ reverse transcription system (Promega France, Melun-les-Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. The resulting product was diluted 10 times in nuclease-free water. Primers were designed to amplify 27 gene transcripts, including one reference gene *Bradi4g00660 (UBC18)* as previously determined by [27] (Additional file 1). qPCR reactions were performed on 2 µl of the diluted cDNA product using 8 pmoles of each specific primer and 10 µl of SYBRGreen Master Mix in a final volume of 20 µl. Reactions were performed in a Light Cycler LC480 Real-time PCR system (Roche Diagnostics, Meylan, France). All qRT-PCR reactions were carried out on biological triplicates, each in technical duplicate. The final threshold cycle (Ct) values were the mean of the two technical

duplicates. Standard deviations were calculated using the biological triplicates. The comparative $\Delta\Delta C_t$ method was used to evaluate the relative quantities of each amplified product in the samples. The Ct was automatically determined for each reaction by the Light Cycler LC480 Real-time PCR system set with default parameters. The specificity of the qRT-PCR reactions was determined by melt curve analysis of the amplified products using the standard method installed in the system. Negative controls were included for each primer pair and the absence of primer dimers was verified. For each gene, the corresponding real-time PCR average efficiency (E) in the exponential phase was calculated using the equation $E = 10[-1/\text{slope}]$, applied to a dilution series of cDNA pool of all samples. The PCR efficiencies of the different primer pairs used in this study are indicated in Additional file 1.

DON quantification by chromatography coupled to mass spectrometry

400 mg of fresh ground material was extracted with 1.6 ml of methanol/water/acetic acid (80:19.5:0.5) overnight at 200 rpm, 4°C. The supernatant was recovered and the pellet was extracted once again, each time consisting in two hours at 4°C (200 rpm) with 1 ml of methanol/water/acetic acid or 0.5 ml of methanol/water (80:20), respectively. After each extraction the supernatant was pooled with the previous ones. The whole supernatant was dried with a speed vacuum concentrator and kept until analysis. In this study, DON¹³C₁₅ (Romers Lab, Tulln, Austria) was used as internal standard. Plant extracts were resuspended just before analysis in 200 µl of 80% methanol and 0.1% formic acid. The samples were then analyzed on an Ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) at MS and MS/MS mode. The analysis were performed on a Waters Quattro Premier XE (Waters, Mildorf, MA USA) equipped with an Electrospray Ionisation (ESI) source and coupled to an Acquity UPLC system (Waters) with diode array detector (DAD). UV spectra were recorded from 190 to 500 nm. Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C₈ column (100 × 2.1 mm, 1.7 µm; Waters), coupled to an Acquity UPLC BEH C₈ pre-column (2.1 × 5 mm, 1.7 µm; Waters). The two mobile phases were water (UPLC MS grade, Sigma) with 0.1% formic acid (Buffer A), and methanol containing 0.1% formic acid, (Buffer B). The gradient separation, which was performed at a flow rate of 300 µl/min, was as follows: 2 min 95% A, 10 min linear gradient from 95% A to 100% B. After washing the column for 2 min with 100% B, the buffer was set back to 95% A in 1 min and the column was re-equilibrated for 2 min with 95% A (17 min total running time). To determine DON and DON¹³C₁₅ best ionization parameters, positive and negative electrospray scan modes were tested. The selected Ion recording

(SIR) MS mode was then used to determine parent mass transition conditions. Daughter scan MS/MS mode was then used to determine the fragmentation pattern of the different DON molecules. The quantification of the different DON molecules were made with standard molecules injected at different concentration using the MS/MS MRM (multiple reaction monitoring) mode in order to establish standard curves for each molecules. The MRM transitions resulted from SIR and daughter scan analysis and were as follow: (DON) $[M + H^+]$ 297.30 > 249.19, dwell (secs) 0.100, cone Voltage 20.0, collision energy 11.0, delay (secs) 0.050; (DON¹³C₁₅) $[M + H^+]$ 312.30 > 263.15, dwell (secs) 0.100, cone Voltage 22.0, collision energy 16.0, delay (secs) 0.050. Acquisition and analysis were performed with the MassLynx software.

Secondary metabolite analysis

Soluble metabolites were extracted as described by Simon et al. [28]. The dried extracts were resuspended in 500 μ l of a mixture of methanol–water (1:1) and 1 μ l was analyzed using a UHPLC/DAD instrument (Agilent technologies 1290) with a reverse-phase C18 column (Poroschell C18 2.7 μ m, 150 mm \times 3 mm) maintained at 40°C. The column was eluted at the flow rate 0.7 ml/min with solvent A (water added 0.4% acetic acid) and solvent B (acetonitrile) using a multi-step linear gradient between point: 100% A at 0 min, 100% A at 1.5 min, 66% A/34% B at 20 min, 100% B at 26 min, 100% B at 27 min, 100% A at 27.1 min and 100% A at 30 min. UV spectra were recorded between 200 nm to 600 nm. The UHPLC system was coupled to a qTOF mass spectrometer (Agilent technologies 6530) equipped with an ESI source operating in positive ion mode using the optimized parameters as follows: nitrogen as nebulizing gas with a flow rate of 12 L/min and a temperature of 310°C at 40 psi, scan spectra from m/z 100 to 2000, capillary voltage 3 kV, fragmentor 120 V. The detection was made considering a mass range of 80–2000 m/z . Compounds were identified by analysis of their UV, MS and MS/MS spectra and quantified with UV chromatogram at 280 nm using MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies). For absolute quantification of serotonin, tryptophan and tryptamine, samples were analyzed by HPLC on a Symmetry 5 μ m C18 column (250 \times 4.6 mm, Waters Corporation). We used two methods. The first one was used for serotonin and tryptophan. Samples were subjected to HPLC with 0.1% aqueous TFA as solvent A and acetonitrile with 0.1% TFA as solvent B, at a flow rate of 1.3 ml/min with the same gradient as described by Hagemeyer et al. [29]. Peak detection was performed with a DAD (200–600 nm) as part of the Waters system (Waters Corporation). HPLC chromatograms were analyzed at 280 nm using Empower Pro Software (Waters Corporation). The second method was used for tryptamine.

After extraction, samples were diluted in 90% TFA 0.05% (solvent A) and 10% acetonitrile (solvent B) and analyzed by HPLC coupled to a Multi λ Fluorescence Detector (Waters2475, Waters Corporation) with an excitation wavelength set at 280 nm and fluorescence emission wavelength set at 320 nm. The column was eluted at the flow rate 1 ml/min, with a multi-step gradient: 100% A at 0 min, 88% A at 6 min, 82% A at 10 min, 42% A at 30 min, 20% A at 30.5 min, 20% A at 36 min, 100% A at 36.5 min and 100% A at 42 min.

Results

Histological characterization of the interaction between *Bd* and *Fg* DON⁺ and *Fg* DON⁻ strains

To determine the involvement of the mycotoxin in the infection process of *Fg* on *Bd* spikes, point inoculations were performed. We used either the *Fg* wild-type strain PH-1 (*Fg* DON⁺) or a mutant strain with the same genetic background impaired in the *Tri5* gene encoding the enzyme catalyzing the first committed step of the DON biosynthetic pathway, and thus unable to produce the mycotoxin (*Fg* DON⁻) [18]. Following a 96 h incubation, spikes inoculated with the *Fg* DON⁺ strain exhibited clear bleaching symptoms on part of the inoculated spikelet (Figure 1A) while *Fg* DON⁻ inoculated plants only showed initial browning of the inoculated floral cavity (Figure 1B). Microscopy analysis showed that both strains were able to penetrate the flower through stigmata to a similar extent (Figure 2A,B). In contrast, the observation of palea tissues of the inoculated florets 72 hours after inoculation (hai) showed clear differences: while extensive fungal tissue colonization could be observed for the *Fg* DON⁺ strain (Figure 2C), palea infected with the *Fg* DON⁻ strain exhibited far less hyphae but numerous dying or dead cells could be observed (Figure 2D). The production of DON,

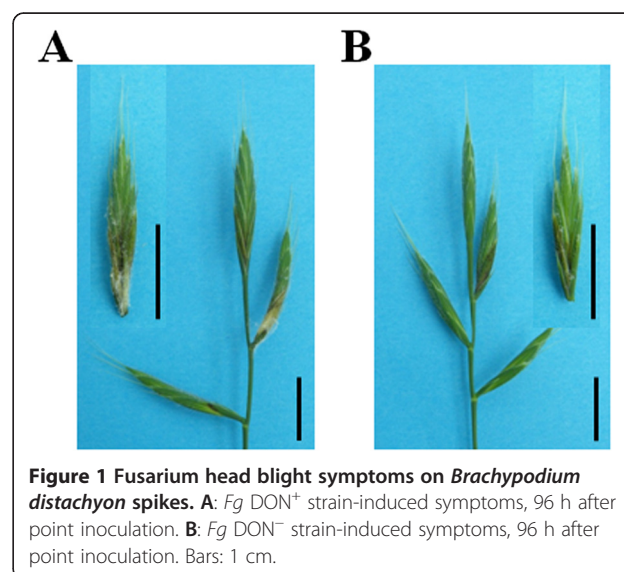
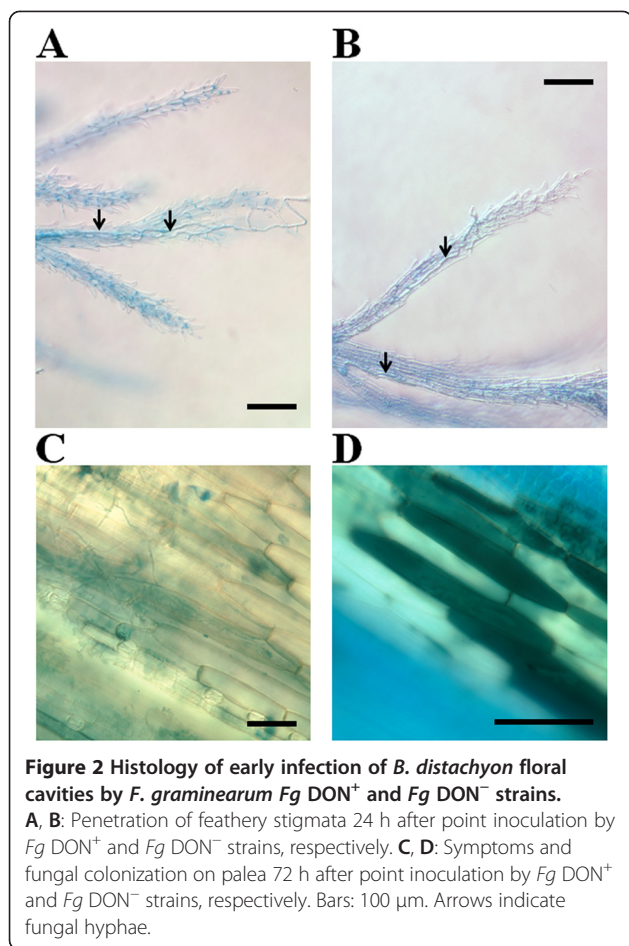


Figure 1 Fusarium head blight symptoms on *Brachypodium distachyon* spikes. **A:** *Fg* DON⁺ strain-induced symptoms, 96 h after point inoculation. **B:** *Fg* DON⁻ strain-induced symptoms, 96 h after point inoculation. Bars: 1 cm.



the main mycotoxin synthesized by the *Fg* DON⁺ strain [30], was quantified during an infection time-course. The free form of DON was detected at very low levels as early as 48 hai (1.11 ± 0.05 ppm) and then increased reaching 22 ppm (21.99 ± 1.16) at 96 hai and 51.5 ppm on average at 168 hai.

When incubation was extended further, the mutant strain showed a delay in colonization that tended to attenuate in the last timepoints (14 and 21 days after inoculation (dai), data not shown). In order to better compare fungal infection by the two strains than by visual symptoms assessment, the fungal biomass was quantified by measuring fungal genomic DNA by qPCR in early timepoints, until 7 dai (168 hai). As shown in Figure 3A, the amounts of fungal DNA in spikes inoculated by the *Fg* DON⁻ strain were much lower than for those found in the tissues infected by the *Fg* DON⁺ strain (*t* test, p -value ≤ 0.01), which well correlated with the histological observations presented above. For timepoints later than 7 dai, we quantified the ability of both strains to produce secondary inoculum, namely macroconidia, at the surface of infected spikes. These measures indicated that, even at 14 and 21 dai for which assessment of visual

symptoms does not allow clear distinction between the two strains, the *Fg* DON⁻ strain still exhibited a significant lower conidia production on infected plant tissues as compared with the *Fg* DON⁺ strain (Duncan test, p -value ≤ 0.01 ; Figure 3B).

Previous studies have shown that DON enables the fungus to colonize the rachis of wheat spikes [31,32]. To analyze the importance of DON in the colonization of the rachis, experiments were designed to detect the progress of *Fg* DON⁺ and *Fg* DON⁻ strains into the rachis. One-mm long transversal sections of the rachis in the vicinity of the inoculated spikelet were cut at different locations from 7 dai infected spikelet, surface sterilized and incubated on water agar for 48 h (Figure 3C, left). The presence of the fungal mycelium growing out of the sections was then recorded. Our results showed that the *Fg* DON⁺ strain is able to colonize the rachis, with more efficient growth in the acropetal direction (Figure 3C, right). On the contrary, the *Fg* DON⁻ strain, even if exhibiting the same acropetal preferential development, was only detected in sections in the immediate vicinity of the inoculated spikelet (Figure 3C, right).

Transcriptome analysis of *Bd* spikes infected by *Fusarium graminearum*

To analyze the responses of *Bd* to *Fg* infection and to discriminate the responses due solely to the DON mycotoxin, a transcriptome analysis was performed using the *Fg* DON⁺ and *Fg* DON⁻ strains. Affymetrix GeneChip® Brachypodium Genome Array was used to examine transcript accumulation in *Bd*21 ecotype inoculated spikelets 96 hai by either the *Fg* DON⁺ or the *Fg* DON⁻ strain and compared to the mock inoculated spikelets. The 96 hai timepoint was chosen as it corresponded to the early time point which best discriminated the extent of spikelet colonization between the two strains. The analyses of the GeneChip data are presented in the Methods section. In all, 4,633 transcripts exhibiting a significant differential expression between the different conditions were retrieved (p -value ≤ 0.05 after Bonferroni correction). In the following, we limited the biological interpretation to genes exhibiting an absolute value of \log_2 fold-change equal or more than 2.0. Thus, a total of 3,506 transcripts could be classified into three categories: (1) 3,304 transcripts showed a differential accumulation between the *Fg* DON⁺ strain- and mock-inoculated spikelets, (2) 596 transcripts showed a differential accumulation between the *Fg* DON⁻ strain- and mock-inoculated spikelets and (3) 1,878 transcripts showed a differential accumulation between the *Fg* DON⁺ strain- and *Fg* DON⁻ strain-inoculated spikelets. Of the 3,304 transcripts exhibiting differential accumulation between the *Fg* DON⁺ strain- and mock inoculated spikelets, 1,909 were up-regulated and 1,395 were down-regulated. Among the 596 transcripts differentially regulated

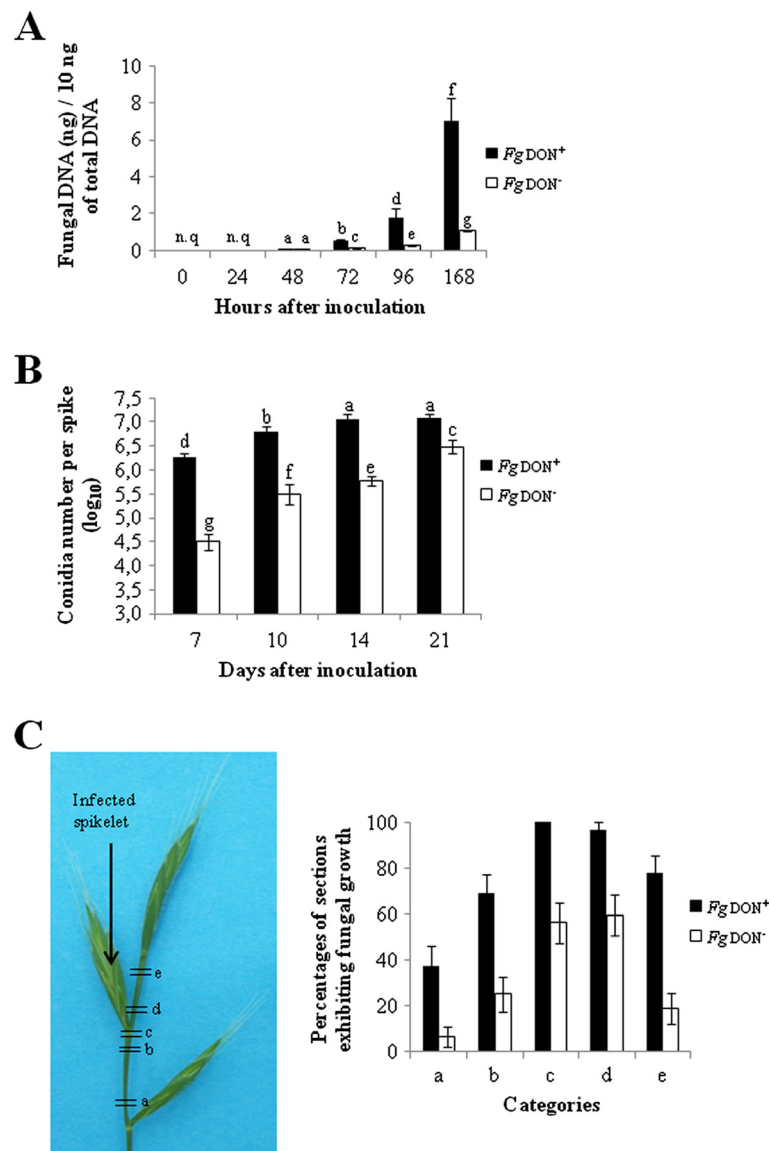
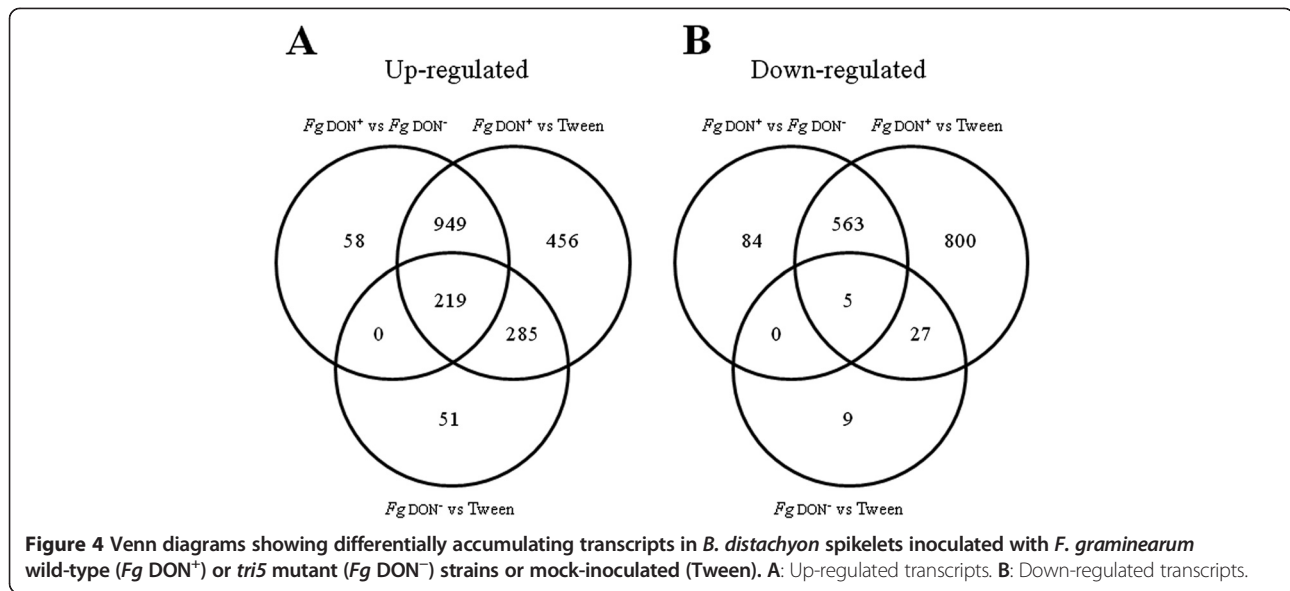


Figure 3 Estimation of *B. distachyon* spike (let)s colonization of *F. graminearum* *Fg* DON⁺ and *Fg* DON⁻ strains. **A:** Quantification of fungal DNA in infected spikelets (n.q. = not quantifiable, different letters indicate significant differences between conditions; t-test, p-value ≤ 0.01). **B:** Production of macroconidia on *B. distachyon* spikes infected by the *Fg* DON⁺ or the *Fg* DON⁻ strain; different letters indicate the significance of differences between conditions (Duncan test, p-value ≤ 0.01). **C:** Evaluation of *B. distachyon* rachis colonization by the *Fg* DON⁺ or the *Fg* DON⁻ strain on infected spikes collected 7 dai; left panel: localization of the different rachis sections collected, right panel: quantification of sections presenting out of which fungal growth was observed.

between *Fg* DON⁻ strain- and mock-inoculated spikelets, 555 were up-regulated and 41 were down-regulated. From the 1,878 differential transcripts detected between *Fg* DON⁺ strain- and *Fg* DON⁻ mutant strain-inoculated spikelets, 1,226 were up-regulated and 652 were down-regulated.

To better discriminate each treatment, we examined the potential overlaps between the different conditions. The resulting Venn diagrams (Figure 4) showed that most of the differentially accumulated transcripts could be associated with the infection by the *Fg* DON⁺ strain: 72.5%

and 97.2% of the up- or down-regulated transcripts, respectively, were significantly more abundant in the *Fg* DON⁺ strain-treated samples. 504 up-regulated and 32 down-regulated transcripts were associated with general fungal infection, independently of the fungal strain, while 1,405 genes were specifically induced by DON accumulation and 1,363 genes repressed. Finally, 60 transcripts are specific for the *Fg* DON⁻ inoculated plants: 51 are up-regulated and 9 are down-regulated. To validate the microarray results, we selected twenty candidate genes



and performed qRT-PCR analysis using the same RNA samples used for microarray analysis. These genes were chosen because encoding proteins potentially related to plant defense and general detoxification, but also as a representative sample of all differential regulation patterns detected following the analysis of microarray results. The results of the expression analysis strongly correlated (Table 1, $R^2 = 0.81$) with the microarray data in all three treatments.

Defense-related responses and signalling pathways in the *B. distachyon*-*F. graminearum* interaction

For further and more in depth analyses, we chose a gene subset consisting of 650 genes exhibiting a regulation with a \log_2 ratio equal or more than 3.0, corresponding to genes either up- (582 genes) or down-regulated (68 genes) following infection with the *Fg* DON⁺ strain as compared with infection with the *Fg* DON⁻ strain. A classification and more detailed functional annotation of these genes are presented in Table 2 and Additional file 2, respectively. The expression of the vast majority of these genes (459/650, 70.6%) was not significantly regulated following infection by the *Fg* DON⁻ indicating that this subset is of particular interest for the analysis of DON-regulated transcripts. Among the annotated transcripts exhibiting a down-regulation after challenging with the *Fg* DON⁺ strain, two main functional categories were over-represented (Additional file 2): (1) functions involved in photosynthesis (18 transcripts) and general metabolism, in particular glycolysis (4 transcripts). The annotated up-regulated transcripts fell into more diverse functional categories: plant defenses and associated signalling pathways, oxidative stress, secondary metabolism pathways, plant detoxification and signal transduction (Additional file 2).

Contrary to other categories, half of the defense-related genes (18/37 transcripts) were significantly induced in both infection conditions, with a higher induction following infection by the *Fg* DON⁺ strain. Among these genes, a number were related to general plant defenses (Additional file 2). In addition, in this category, *MLA6* (*Bradi2g11930*), an ortholog of the barley *MLA* resistance genes [33] is noteworthy as it was only induced by the *Fg* DON⁺ strain. Among the defense-associated signalling pathways, jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) biosynthesis and signalling pathways were shown to be induced upon infection by both *Fg* strain. A putative lipoxygenase (*LOX*) gene (*Bradi5g11590*) and a gene potentially encoding a 12-oxophytodienoate reductase (*Bradi1g45880*), two enzymatic activities known to be important for oxylipins biosynthesis [34], were more strongly induced by the *Fg* DON⁺ strain than by the *Fg* DON⁻ strain. Four genes encoding putative ZIM domain containing proteins related to JAI3 (JASMONATE-INSENSITIVE 3) [35] were also differentially induced, but only *Bradi3g23180* was specifically up-regulated by the *Fg* DON⁺ strain. Moreover, potential ET-responsive transcription factor-encoding genes appeared to be induced upon infection by both *Fg* strains, but some were only related to the *Fg* DON⁺ infection, such as the *Bradi2g25050* gene encoding a putative AP2/EREB (APETALA2/Ethylene Response Elements Binding) protein (Additional file 2).

Genes encoding proteins with known anti-oxidative activities were also highly induced. Among these, a number were significantly more induced following infection by the *Fg* DON⁺ producing strain (Table 2; Additional file 3), including genes encoding a putative ascorbate oxidase (*Bradi4g28950*), 2 potential glutaredoxins (*Bradi2g08400*; *Bradi2g46090*) and 5 oxido-reductases. Of

Table 1 qPCR validation of selected transcripts exhibiting differential accumulation in microarray

Gene	Comparison	Microarray		qPCR		Gene description
		Fold change (Log ₂)	P-val (Bonferroni)	Fold change (Log ₂)	Standard error	
<i>Bradi1g75310</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	6.93	0.00	14.40	0.26	Cytochrome P450 monoxygenase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	0.77	1.00	6.28	0.40	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	6.16	0.00	8.12	0.26	
<i>Bradi3g22880</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	7.44	0.00	10.24	0.08	MATE efflux
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.36	0.18	2.26	0.11	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	6.08	0.00	7.97	0.08	
<i>Bradi2g41010</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	9.30	0.00	12.93	0.15	Unknown
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	4.80	0.00	3.84	0.25	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	4.51	0.00	9.08	0.15	
<i>Bradi2g35930</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	8.19	0.00	10.09	0.07	Glutathione S-transferase GSTF1-like
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	4.15	0.00	3.46	0.45	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	4.05	0.00	6.63	0.07	
<i>Bradi4g39950</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	2.38	0.00	3.12	0.19	NADP-dependent alkenal double bond reductase P1
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	5.68	0.00	6.05	0.28	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	-3.29	0.00	-2.93	0.19	
<i>Bradi4g05040</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	2.25	0.00	3.35	0.06	PR10
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	7.48	0.00	8.42	0.27	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	-5.22	0.00	-5.08	0.06	
<i>Bradi4g36870</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	3.69	0.00	4.75	0.05	Ornithine decarboxylase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	0.90	1.00	1.59	0.50	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	2.77	0.00	3.16	0.05	
<i>Bradi4g36810</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	5.06	0.00	10.14	0.28	Ornithine decarboxylase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.37	0.15	5.55	0.26	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	3.69	0.00	4.59	0.28	
<i>Bradi1g50067</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	3.63	0.00	5.23	0.16	Arginine decarboxylase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.16	1.00	1.58	0.31	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	2.46	0.00	3.65	0.16	
<i>Bradi3g47110</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	5.86	0.00	11.99	0.34	Phenylalanine ammonia-lyase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	0.32	1.00	5.59	0.59	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	5.53	0.00	6.41	0.34	
<i>Bradi3g53227</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	3.56	0.00	6.94	0.14	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	0.17	1.00	1.77	0.15	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	3.40	0.00	5.17	0.14	
<i>Bradi2g13360</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	4.10	0.00	5.69	0.14	Mevalonate kinase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.93	0.00	2.26	0.36	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	2.17	0.00	3.43	0.14	
<i>Bradi5g02780</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	2.41	0.00	4.87	0.16	UDP-glycosyltransferase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.16	1.00	2.66	0.36	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	1.25	1.00	2.21	0.16	

Table 1 qPCR validation of selected transcripts exhibiting differential accumulation in microarray (Continued)

<i>Bradi5g03300</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	7.46	0.00	12.01	0.16	UDP-glycosyltransferase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	0.88	1.00	2.92	0.47	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	6.59	0.00	9.08	0.16	
<i>Bradi5g03370</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	6.61	0.00	9.51	0.19	UDP-glycosyltransferase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	2.09	0.00	3.29	0.44	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	4.52	0.00	6.22	0.19	
<i>Bradi5g03380</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	6.72	0.00	12.46	0.22	UDP-glycosyltransferase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.52	0.01	4.36	0.73	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	5.20	0.00	8.10	0.22	
<i>Bradi5g03390</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	4.34	0.00	6.23	0.08	UDP-glycosyltransferase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.86	0.00	2.15	0.44	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	2.49	0.00	4.08	0.08	
<i>Bradi5g03400</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	1.22	1.00	2.51	0.13	UDP-glycosyltransferase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.37	0.14	2.01	0.10	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	-0.16	1.00	0.50	0.13	
<i>Bradi2g04720</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	5.41	0.00	8.76	0.20	UDP-glycosyltransferase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	3.22	0.00	5.47	0.24	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	2.19	0.00	3.29	0.20	
<i>Bradi2g04760</i>	<i>Fg</i> DON ⁺ vs Tween	4.71	0.00	7.25	0.19	UDP-glycosyltransferase
	<i>Fg</i> DON ⁻ vs Tween	1.04	1.00	2.57	0.26	
	<i>Fg</i> DON ⁺ vs <i>Fg</i> DON ⁻	3.67	0.00	4.68	0.19	

interest is the presence of 7 members of the cupin superfamily related to the oxalate oxidase-like proteins generating hydrogen peroxide (H₂O₂) [36]. The *Bradi1g59440* gene induced in both infections, encodes a putative plant flavodoxin-like quinone reductase [37]. Quinone reductases are flavoproteins that protect plants from oxidative stress induced by necrotrophic fungi [37].

Pathogenesis-related proteins encoding genes revealed a more contrasted situation, some exhibiting a higher induction, while others were clearly repressed 96 hai by the *Fg* DON⁺ strain. The expression profile of a number of these genes was examined during infection time courses, from 0 to 168 hai, by either the *Fg* DON⁺ or the *Fg* DON⁻ strain (Additional file 3). Some genes, including those encoding a chitinase (*Bradi2g26810*) and a PR9-like peroxidase (*Bradi1g39190*), exhibited a significantly higher induction following infection by the *Fg* DON⁺ strain, likely reflecting the delayed colonization of the *Fg* DON⁻ strain (Additional file 3A). By contrast, others showed a higher induction by the *Fg* DON⁻ strain, such as those encoding PR1 (*Bradi1g12360*) - and PR10-like (*Bradi4g05040*) proteins (Additional file 3B).

Secondary metabolism and plant detoxification

Most genes involved in secondary metabolism pathways or plant detoxification exhibited a differential regulation of their expression between the different treatments

(Table 2), many of them being up-regulated following infection by both strains, but to a greater extent in the *Fg* DON⁺ strain treatment. In our conditions, the most induced genes were involved in the phenolic biosynthetic pathways, either the phenylpropanoid or phenolamide pathways (Additional file 2). The expression of two putative PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase) genes (*Bradi3g47110* and *Bradi3g49270*) was up-regulated during infection, both being specifically induced by the *Fg* DON⁺ strain. A number of genes identified as up-regulated were related to amino-acid metabolism, in particular to the tryptophan (Trp) metabolism (Table 2 and Additional file 2). Functional annotation using the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database allowed us to identify genes potentially encoding the enzymes in the metabolic pathway from anthranilate to serotonin (Figure 5A and Additional file 4) as those described in rice infected by *Bipolaris oryzae* [38]. More precisely, 4 genes encoding proteins related to the putative Trp decarboxylase (TDC) enzymes (*Bradi3g14730*; *Bradi3g14760*; *Bradi3g14750*; *Bradi3g14740*) and a gene encoding a putative indole-3-glycerol phosphate lyase (*Bradi1g05450*) were more induced after infection with the *Fg* DON⁺ strain compared to the infection with the *Fg* DON⁻ strain (Additional file 4). Particularly interesting was the *Bradi4g39240* gene encoding a cytochrome P450 monooxygenase (CYP71P1) that catalyzes the conversion

Table 2 Main characteristics of transcripts exhibiting an absolute value of \log_2 fold change ≥ 3.0 between the two infection conditions

Functional category	Number	Percentage	Main tendency*
Defense associated proteins	37	5.7	I (35/37)
Proteins involved in oxidative burst/redox status	17	2.6	I (14/17)
Cytochrome P450s	17	2.6	I (16/17)
UDP-glycosyltransferases	16	2.5	I (16/16)
Glutathion-S-transferases	9	1.4	I (8/9)
Transport	24	3.7	I (22/24)
Amino acid metabolism	11	1.7	I (11/11)
Hormones synthesis and response	35	5.4	I (34/35)
Secondary metabolism	10	1.5	I (10/10)
Ubiquitination	12	1.8	I (12/12)
Signal transduction	96	14.8	I (95/96)
Regulatory proteins	77	11.8	I (72/77)
Photosynthesis	22	3.4	R (18/22)
Translation/Ribosomes	12	1.9	I (10/12)
Lipid metabolism	7	1.1	I (6/7)
General metabolism	7	1.1	R (5/7)
Miscellaneous	102	15.5	I (87/102)
Unknown proteins	139	21.5	I (128/139)
Total	650	100	

*Numbers in brackets represent the number of transcripts showing induction (I) or repression (R) among the total number of transcripts in each functional category.

of tryptamine to serotonin in rice [39]. Finally, our data from the Additional file 2 pointed to 5 genes encoding putative hydroxycinnamoyl transferases classified into the phenolamide biosynthesis category. No genes belonging to the benzoxazinoid pathway could be retrieved from our transcriptomic analysis.

We then performed a metabolic profiling analysis of soluble metabolites on the same biological samples used for microarray and qRT-PCR analyses. A typical chromatogram obtained from *Fg* DON⁺ strain-infected plant tissues at 96 hai is shown in Figure 5B. In this chromatogram, 18 peaks could be clearly individualized (Additional file 5). Among these, 5 peaks exhibited significant difference both with the control samples and between the two infection treatments (*t* test, *p*-value ≤ 0.02). These peaks could be identified as Trp (peak 4) or Trp-derived compounds: tryptamine (peak 5), serotonin (peak 2) and coumaroyl (Cou)- and feruloyl (Fer)-serotonin (peaks 17 and 18, respectively). In order to compare the two infection treatments and the mock condition, relative quantifications were conducted on all compounds except for tryptamine, for which quantities were too low to be detected to perform proper relative quantification. As

shown in Figure 5C, all compounds accumulated following fungal infection, with higher increase folds for serotonin and Cou-serotonin. The higher increase was observed following infection by the *Fg* DON⁺ strain, while the *Fg* DON⁻-infected spikelets also exhibited an increased amount of the four compounds but to a lesser extent. Trp, tryptamine and serotonin absolute quantification was performed using UV-fluorescence detection. This analysis confirmed the previous results, showing an increased accumulation of the three compounds in infected spikelets, but with a significant difference between *Fg* DON⁺ and *Fg* DON⁻ infected plants (Additional file 6).

A number of genes differentially induced in the *Fg* DON⁺ infected spikelets were functionally related to general detoxification [10] (Table 2, Additional file 2). These included genes encoding UDP-glycosyltransferases (UGT, 16 genes), glutathione-S-transferases (GST, 8 genes), cytochrome P450 monooxygenases (CYP, 16 genes) as well as transporters such as pleiotropic drug resistance, ATP-Binding Cassette (ABC) and Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE) transporters (13 genes). More than 50% of these genes (31/53) showed no significant differential expression in the *Fg* DON⁻ strain-infected spikelets (Bonferroni correction, *p*-value > 0.05) suggesting their potential role in mycotoxin detoxification. In particular, the *Bradi3g31860* gene encoding a GST was specifically induced upon infection with the *Fg* DON⁺ strain. Interestingly, among the UGT-encoding genes, the most induced gene (*Bradi5g03300*) exhibiting a \log_2 fold change of more than 6.5 between the two infection conditions encodes a UGT already shown to be able to detoxify DON into DON-glucose [40]. In contrast, a gene encoding a NADP-dependent alkenal double bond reductase, an enzymatic activity previously shown to be involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants [41], exhibited a higher induction by the *Fg* DON⁻ strain (Additional file 3B).

Antimicrobial activity of serotonin against *Fusarium graminearum*

Serotonin has been reported in several plant species and associated with different processes including defense responses [38,42]. Recently, the production of serotonin has been shown to be induced in wheat by the toxin SnToxA from *Stagonospora nodorum* and serotonin has been shown to have antimicrobial properties [42]. To determine if this compound exhibited antimicrobial activities against *F. graminearum*, serotonin was applied *in vitro* at different developmental stages of the fungus. Two concentrations were used, 1 and 5 mM, which encompassed the amount of serotonin detected in infected spikelets (Additional file 6). As shown in Table 3, the higher serotonin concentration slightly reduced radial growth (Duncan test, *p*-value $\leq 1.10^{-4}$) as well as delayed conidia germination (*t* test, *p*-value ≤ 0.01). In contrast,

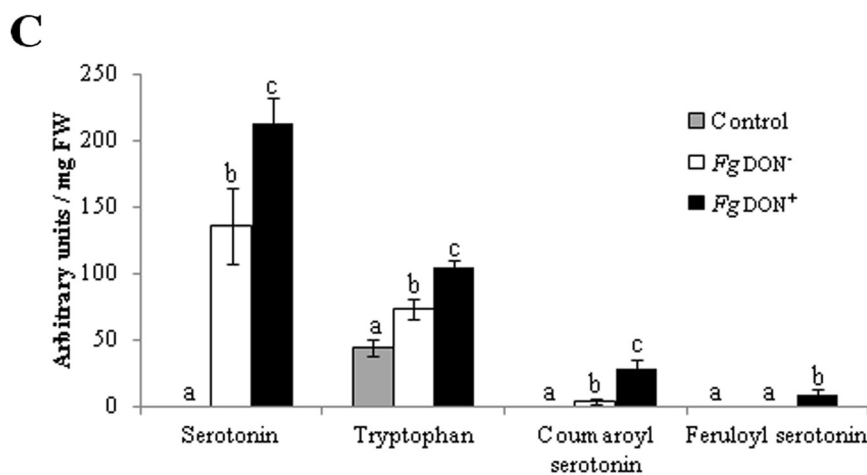
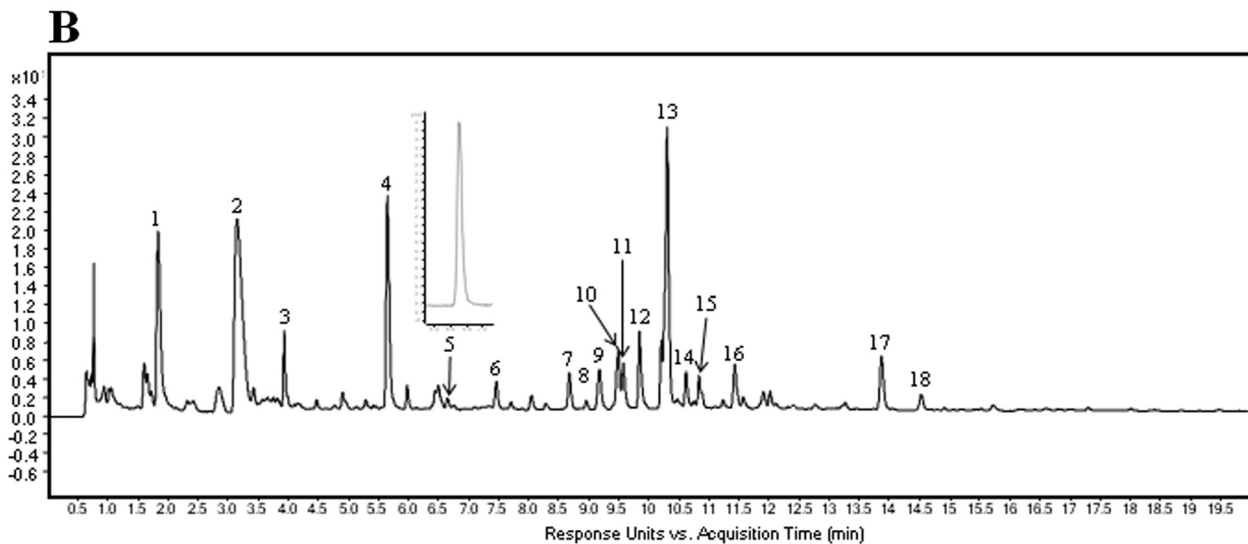
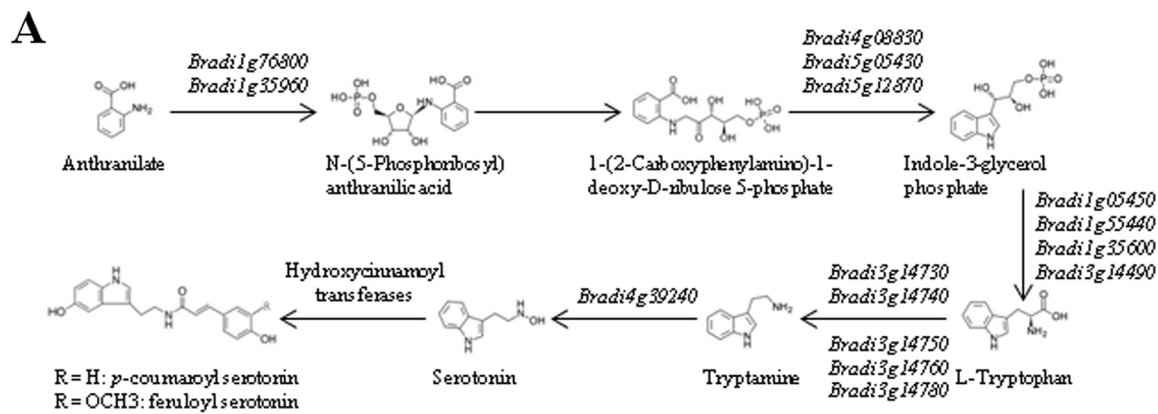


Figure 5 Induction of the tryptophan pathway during the interaction between *B. distachyon* and *F. graminearum*. **A**: Reconstructed tryptophan pathway in *B. distachyon*. The accession numbers of *B. distachyon* genes encoding enzymes potentially involved in the metabolic pathway and exhibiting a differential expression between the conditions used for transcriptome analyses are indicated over or next to each arrow (for more information see Additional file 4). **B**: Metabolic profiling of soluble secondary metabolites from *B. distachyon* spikelets 96 h after infection by the *F. graminearum* Fg DON⁺ strain. HPLC profiles were obtained from aqueous methanolic extracts. Chromatograms were analysed by UV detection at 280 nm. For a correspondence of peak numbers, see Additional file 5. **C**: Relative quantification of metabolites derived from the tryptophan pathway (different letters indicate significance of the difference between conditions; t-test p-value ≤ 0.02).

Table 3 Serotonin effect on radial growth, conidia production and germination of *Fusarium graminearum* (strain *Fg* DON⁺)

		Serotonin concentration		
		0 mM	1 mM	5 mM
Radial growth	24 h	2.58 ± 0.07 ^c	2.64 ± 0.11 ^c	2.23 ± 0.07 ^d
	48 h	4.81 ± 0.11 ^a	4.84 ± 0.12 ^a	4.43 ± 0.09 ^b
Conidial concentration (log ₁₀)	48 h	5.60 ± 0.12 ⁱ	5.94 ± 0.04 ^{gh}	5.95 ± 0.03 ^{gh}
	72 h	5.82 ± 0.08 ^{hi}	6.21 ± 0.02 ^{ef}	6.16 ± 0.08 ^{ef}
	96 h	5.93 ± 0.07 ^{gh}	6.26 ± 0.05 ^{de}	6.26 ± 0.06 ^{de}
	120 h	6.09 ± 0.08 ^{fg}	6.32 ± 0.07 ^{cd}	6.42 ± 0.04 ^{ab}
	144 h	6.18 ± 0.07 ^{ef}	6.37 ± 0.06 ^{bc}	6.45 ± 0.03 ^a
	168 h	6.22 ± 0.04 ^e	6.41 ± 0.05 ^{ab}	6.47 ± 0.03 ^a
Spore germination (percentage)	3 h	72.61 ± 5.02 ^b	72.87 ± 5.12 ^b	25.42 ± 2.02 ^c
	6 h	93.97 ± 2.35 ^a	91.7 ± 2.12 ^a	79.01 ± 1.41 ^b
	9 h	98.55 ± 0.95 ^a	97.35 ± 1.51 ^a	92.81 ± 1.68 ^a

Different letters indicate significance of the difference between conditions; Duncan test, p-value ≤ 0.01.

both concentrations of serotonin seemed to increase conidia production in liquid mung bean medium.

Discussion

Bd has emerged recently as a novel monocot model plant species in the last 15 years for functional genomics approaches in small-grain cereals [4,5,43]. The shortness of its developmental cycle [44], together with the amenability of genetic transformation [45-48] and the availability of mutant collections [49-52] and of the genome sequence [53] makes this plant species an easy model to work with as a host for the interaction with important cereal pathogens such as *Magnaporthe grisea* [54], *Pyrenophora teres* [55], *Puccinia graminis* [56], the *Panicum mosaic virus* [57] and *Fusarium* species [6,58]. This is of particular interest since this allows functional genomics studies to be performed to better understand cereals resistance mechanisms to important diseases. In the present study, we were interested in Fusarium Head Blight, one of the major small-grain cereals' diseases [59]. The objective was to gain insight into the *Bd-Fg* interaction using high throughput methods.

We first characterized the interaction of *B. distachyon* ecotype Bd21 with two *F. graminearum* strain: a wild-type strain PH-1, *Fg* DON⁺, producing deoxynivalenol (DON) and a near-isogenic strain, *Fg* DON⁻, unable to produce the mycotoxin, following inactivation of the gene encoding the trichodiene synthase, the first enzyme of DON biosynthetic pathway [60]. DON accumulated to similar levels in inoculated spikes as those detected in wheat and barley infected by *Fg* [11,14]. We showed that overall, the absence of DON production leads to a dramatically delayed infection, exemplified by a strong decrease

of both the fungal biomass *in planta* and the production of secondary inoculum over infected heads by the mutant strain as compared with its wild-type relative. The infection delay can be explained by the impairment of the mutant strain in rachis colonization. Even if less clear-cut, our observations are highly reminiscent to the situation in wheat in which fungal strains impaired in mycotoxin production were shown to be blocked at the initial inoculated spikelet, due to the development of important cell-wall thickenings at the rachis node [31,32]. The delay rather than complete blocking of fungal colonization from the inoculation site is most likely due to the size and architecture of *Bd* spikelets and spikes. Peraldi et al. [6] also showed that *Bd* was susceptible to *Fg* and *Fusarium culmorum* in a similar manner to that observed in wheat, but the authors did not provide conclusive evidence on the role of DON in fungal virulence. Here we genetically demonstrated that *Fg* uses its main mycotoxin, DON, as a virulence factor during *Bd* infection.

While resistance to Fusarium Head Blight in wheat and barley is quantitative [7,61], so far, no quantitative resistance traits to *Fg* have been described in *Bd*. Thus, we performed an RNA profiling approach to examine the *Bd-Fg* interaction. 1,878 transcripts differentially regulated in the two infection conditions were identified. Most of them were shown to be associated with the infection with the *Fg* DON⁺ strain, a condition correlated with the production of mycotoxin and with a more intense fungal colonization of the inoculated spikelets. For 20 of these genes, a comparative qRT-PCR analysis confirmed the transcriptomic data.

To better gain insight into the defense-associated and signalling pathways, and functions differentially regulated between the two infection conditions, we chose to focus on a subset of 650 genes consisting in transcripts showing a strain-specific regulation with an absolute value of the log₂ ratio equal or more than 3.0, on which we performed a detailed functional annotation (Additional file 2). We performed a classification of all these differentially expressed *Bd* genes into 18 categories (Table 2).

Beside genes encoding miscellaneous and unknown proteins which were the most numerous, genes related to defense-associated proteins and hormonal synthesis and response, were well represented. Particularly, the defense response class contained a putative MLA6-like encoding gene solely induced during infection by *Fg* DON⁺ strain (Additional file 2). The *Mla6* gene belongs to the barley *Mla* (mildew-resistance locus A) *R* locus [33]. Given, the specific induction pattern of the corresponding gene in our study, one could hypothesize that the MLA6-like protein might function as a DON receptor. JA biosynthesis and signalling were shown to be induced upon infection by both *Fg* strains. A putative *LOX* gene and a gene potentially encoding a 12-oxophytodienoate

reductase, both belonging to the JA pathway [34], were specifically and strongly induced by the *Fg* DON⁺ strain, indicating that oxylipins are important players in the interaction of toxicogenic strains of *Fg* with the susceptible host *Bd* ecotype Bd21. Moreover, four genes encoding putative ZIM domain containing (JAZ) proteins related to JAI3 [35] were also differentially induced, three of which (*Bradi3g23180*, *Bradi3g23190* and *Bradi1g72590*) being specifically up-regulated by the *Fg* DON⁺ strain. In tomato, JAZ proteins regulate the progression of cell death in response to the phytotoxin coronatine produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 [62]. Whether DON interferes directly with the JA pathway as coronatine by suppressing the plant defense responses would deserve attention.

A number of ET-responsive transcription factor-encoding genes appeared to be induced upon infection and particularly the AP2/EREB family of transcription factors, for which induction was mainly observed after *Fg* DON⁺ infection (Additional file 2). Among these, the most induced was the *Bradi2g25050* gene. There are 132 genes encoding the AP2/EREB superfamily in the *Bd* genome (<http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/itak/index.cgi>). *Bradi2g25050* is homologous to the Arabidopsis *AP2/EREB* gene *At1g22810* induced by 12-oxophytodienoic acid, a precursor of JA [63]. The induction of specific elements of the JA/ET pathways clearly appears to be a hallmark of DON production in *Bd* infected with *Fg*. JA and ET are generally accepted as molecules involved in the defense response towards necrotrophic pathogens [64]. Our results suggest that at the time point considered for the transcriptome analysis (96 hai), *Fg* behaves as a necrotroph on *Bd* spikes. Such findings are in accordance with previous results obtained in wheat, indicating that the fungus most likely behaves as a hemibiotroph, growing intercellularly at the front of colonization without altering the viability of plant cells at early steps of the infection process then inducing cell death in more colonized tissues [65]. The involvement of DON in the switch to necrotrophy, although likely, remains unclear. Similarly, Ding et al. [66] found that both JA and ET biosynthesis and signalling were specifically induced in late time points of the infection of the resistant wheat cultivar Wangshuibai they used in their work. JA and ET signalling were also involved in the induction of several defense genes in the resistant wheat cultivar Dream [15].

Genes encoding proteins with antioxidant functions or involved in the redox balance including a putative ascorbate oxidase and glutaredoxins, were retrieved from our data (Table 2, Additional file 2). Most of these genes exhibit a higher induction following infection by the *Fg* DON⁺ strain. In wheat, DON production during infection has been shown to induce ROS, which could be involved in promoting fungal necrotrophic growth [67]. Our results

suggest that a similar process occurs in *Bd* following infection by a *Fg* toxicogenic strain.

Detoxification of xenobiotics in plants involves chemical modifications by enzymes such as UGTs, GSTs or CYPs and further steps of transport or compartmentation [10]. DON detoxification has frequently been proposed as one of the resistance mechanisms of small grain cereals to FHB [68]. Among the detoxification processes, glucosylation of DON into DON-3Glc is the most documented mechanisms [8,69]. Glutathionylation has been proposed as an alternative detoxification process [13] and glutathione-conjugates of DON have been recently detected in DON-treated wheat spikes [70], indicating that plants may process the mycotoxin *via* various detoxification pathways. As expected in the design of our experiments, a number of genes potentially involved in detoxification processes were identified among the genes differentially regulated between the two infection treatments. These include genes encoding putative UGTs and GSTs suggesting that DON detoxification mechanisms in *Bd* are very similar to those observed in wheat and barley. Most interestingly, the most induced UGT-encoding gene in our data does correspond to the *Bradi5g03300* gene, recently shown to be involved in DON glucosylation [40], further reinforcing this mechanism as a major DON detoxification process in *Bd*. Analysis of the 8 GST-encoding genes exhibiting differential induction by the two *Fg* strains also pointed out exciting results. Among these, 5 belong to a cluster of 16 GST-encoding genes on chromosome 3. In this cluster, the *Bradi3g31860* gene is an interesting candidate for further studies on DON detoxification as it is specifically induced by the *Fg* DON⁺ strain.

Metabolomic analyses of the interaction of barley with *Fg* have allowed the identification of constitutive or induced resistance-related metabolites belonging to different chemical groups, fatty acids, phenylpropanoids and flavonoids, and confirmed that DON-3Glc is a robust resistance indicator metabolite [16,17,71,72]. Two metabolomic studies have been performed in *Bd* in interaction with the fungal pathogen *M. grisea* [73,74]. In Parker et al. [74], in particular, targeted metabolite profiling using GC-MS showed that a metabolic re-programming occurred upon fungal infection in *Bd* and that it was similar to what observed in two other host plants, rice and barley. No secondary metabolite profiling was performed so far in *Bd* interacting with *Fg*. Our metabolite profiling analysis confirmed our transcriptome data, and especially the involvement of the Trp pathway in *Bd* response to *Fg* infection. Most interestingly, the most up-regulated metabolites were Trp and Trp-derived compounds as tryptamine, serotonin, Fer-serotonin and Cou-serotonin. Trp-derived secondary metabolites have been described as mediating the outcome of plant-pathogen interactions in cereals [75], and genes encoding enzymes involved in the

biosynthesis of tryptophan and tryptamine have been shown to be up-regulated in the barley/*Fg* interaction [12]. The most widely distributed ones are benzoxazinoids which have been shown to be produced by maize, rye, wheat and wild barley species [76]. A recent phylogenetic study of the benzoxazinoid biosynthetic pathway of Poaceae suggested that, as for rice and *Setaria italica*, *Bd* would not produce benzoxazinoids [77]. Our results show that, similarly to rice, *Bd* produces other indole-derived compounds, such as serotonin and its hydroxycinnamic acid conjugates, Cou-serotonin and Fer-serotonin. In rice, serotonin has been shown to delay leaf senescence [78] and to be involved in defense responses against *Bipolaris oryzae*, the causal agent of rice brown spot [38]. More recently, this secondary metabolite was postulated to be a novel wheat phytoalexin and shown to strongly inhibit the sporulation of the necrotrophic wheat pathogen *S. nodorum* [79]. Here we show that serotonin has a slight but significant negative effect on *Fg*-*in vitro* radial growth and conidia germination. Our results need to be completed to determine the precise role of serotonin in the *Bd*/*Fg* interaction as our metabolite profiling was performed on soluble metabolites, but it may be involved in the restriction of fungal growth through incorporation into cell walls, as already shown in rice [38,42].

Conclusion

The objective of this work was to gain insight, using high throughput methods, into the possibility of using *Bd* as a good model plant species for studying the interaction with *Fg*, the causal agent of Fusarium head blight. We showed that *Fg* uses its main mycotoxin, DON, as a virulence factor. Our transcriptomic data are reminiscent of what was previously found in wheat and barley. Particularly, the JA- and ET-signalling pathways are important for the plant response to the pathogen. Moreover, the resistance mechanisms to *Fg* and particularly to DON, involve multiple mechanisms and especially those related to detoxification of xenobiotics similar to what has been described in other monocots, with the exception of benzoxazinoids which appear not to be produced by *Bd*. Altogether, our results show that *Bd* exhibits many defense hallmarks to *Fg* reminiscent of those already identified in cereal crop species. Together with its amenability in laboratory conditions, this makes this plant species a very good model to study cereal resistance mechanisms towards the major disease FHB.

Additional files

Additional file 1: List and efficiency of primer pairs used in qPCR experiments.

Additional file 2: Functional annotation of genes exhibiting an absolute value of \log_2 ratio ≥ 3.0 between *Fg* DON⁺ (PHI_WT) and *Fg* DON⁻ (PHI_dTri)-infected spikelets.

Additional file 3: Fold change in accumulation of six *B. distachyon* defense-related genes following inoculation with *F. graminearum*.

A: Genes for which expression is more induced following infection by the *Fg* DON⁺ strain than by the *Fg* DON⁻ strain. B: Genes for which expression is more induced following infection by the *Fg* DON⁻ strain than by the *Fg* DON⁺ strain. qRT-PCR was performed on samples from the *B. distachyon* Bd21 ecotype at 0, 24, 48, 72, 96 and 168 hai with either the *Fg* DON⁺ (black bars) or the *Fg* DON⁻ (white bars) strain. The relative quantity of target gene transcripts was calculated using the comparative cycle threshold method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). The infected samples were quantified relatively to the Tween-treated controls at the same time points. The *B. distachyon* *UBC18* gene (*Bradi4g00660*) was used as an endogenous control to normalize the data for differences in input RNA between the different samples. Data represent mean values of three independent biological experiments, error bars are representing the standard deviation.

Additional file 4: Functional annotation and transcriptional regulation of genes encoding enzymes potentially involved in *B. distachyon* tryptophan pathway following mock- (Tween), *Fg* DON⁺ (PHI_WT) or *Fg* DON⁻ (PHI_dTri) inoculation.

Additional file 5: Description of the different peaks identified in HPLC-MS chromatogram.

Additional file 6: Absolute quantification of serotonin, tryptophan and tryptamine in spikelets 96 h after infection by *F. graminearum* *Fg* DON⁺ and *Fg* DON⁻ strains. Data represent mean values of three independent biological experiments, error bars are representing the standard deviation. Letters indicate the significance of the difference between conditions (*t* test *p*-value ≤ 0.02).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

JCP, SC, SB, MLMM, FB, VT, DH, PS and MD conceived and designed the experiments, JCP, SC, SB, SH, MLMM, FB, CM, DH and MD conducted the experiments and analyzed the data, JCP, SB, MLMM, DH, PS and MD drafted the manuscript, SB, PS and MD supervised the project. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

This work was funded by the National Centre of Scientific Research (CNRS) and a grant "Attractivité" from Université Paris-Sud obtained by MD. JCP has a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors are particularly grateful to Martin Urban for supplying the MU102 (*tri5* or *Fg* DON⁻) mutant strain.

Author details

¹Institut de Biologie des Plantes, Unité Mixte de Recherche 8618, Saclay Plant Sciences, Université Paris-Sud, Orsay 91405, France. ²INRA/CNRS/UEVE – URGV, Saclay Plant Sciences, 2, rue Gaston Crémieux, CP5708, Evry cedex 91057, France. ³INRA-AgroParisTech, MIA 518, 16 rue Claude Bernard, Paris Cedex 75005, France. ⁴Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés – INSA, UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792, 135 Avenue de Rangueil, Toulouse cedex 4 31077, France. ⁵Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Unité Propre de Recherche du CNRS, UPR 2357, Plateforme Métabolomique, 28 rue Goethe, Strasbourg 67083, France.

Received: 26 March 2014 Accepted: 18 June 2014

Published: 25 July 2014

References

1. Kazan K, Gardiner DM, Manners JM: On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Mol Plant Pathol* 2012, **13**:399–413.
2. Rocha O, Ansari K, Doohan FM: Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam* 2005, **22**:369–378.
3. Yazar S, Omurtag GZ: Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *Int J Mol Sci* 2008, **9**:2062–2090.

4. Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH: *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends in Plant Sci* 2008, **13**:1360–85.
5. Mur LAJ, Allainguillaume J, Catalan P, Hasterok R, Jenkins G, Lesniewska K, Thomas I, Vogel J: *Tansley review: exploiting the brachypodium toolbox in cereal and grass research*. *New Phytol* 2011, **191**:334–347.
6. Peraldi A, Beccari G, Steed A, Nicholson P: *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study Fusarium head blight and other Fusarium diseases of wheat. *BMC Plant Pathol* 2011, **11**:100–113.
7. Buerstmayr H, Ban T, Anderson JA: QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breed* 2009, **128**:1–26.
8. Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, Dall'Asta C, Koutnik A, Schuhmacher R, Adam G, Buerstmayr H, Mesterhazy A, Kriska R, Ruckebauer P: The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for Fusarium head blight resistance in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 2005, **18**:1318–1324.
9. Walter S, Brennan JM, Arunachalam C, Ansari KI, Hu X, Khan MR, Trognitz F, Trognitz B, Leonard G, Egan D, Doohan FM: Components of the gene network associated with genotype-dependent response of wheat to the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol. *Funct Integr Genomics* 2008, **8**:421–427.
10. Coleman JOD, Blake-Kalff MMA, Davies TGE: Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci* 1997, **2**:144–151.
11. Boddu J, Cho S, Muehlbauer GJ: Transcriptome analysis of trichothecene-induced gene expression in barley. *Mol Plant Microbe Interact* 2007, **20**:1364–1375.
12. Boddu J, Cho S, Kruger WM, Muehlbauer GJ: Transcriptome analysis of the barley-Fusarium graminearum interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**:407–17.
13. Gardiner SA, Boddu J, Berthiller F, Hametner C, Stupar RM, Adam G, Muehlbauer GJ: Transcriptome analysis of the barley-deoxynivalenol interaction: evidence for a role of glutathione in deoxynivalenol detoxification. *Mol Plant Microbe Interact* 2010, **23**:962–976.
14. Jia H, Cho S, Muehlbauer GJ: Transcriptome analysis of a wheat near-isogenic line pair carrying Fusarium head blight-resistant and -susceptible alleles. *Mol Plant Microbe Interact* 2009, **22**:1366–1378.
15. Gottwald S, Samans B, Lück S, Friedt W: 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* 2012, **13**:369–400.
16. Bollina V, Kushalappa AC, Choo TM, Dion Y, Rioux S: Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against Fusarium graminearum, based on mass spectrometry. *Plant Mol Biol* 2011, **77**:355–370.
17. Kumaraswamy KG, Kushalappa AC, Choo TM, Dion Y, Rioux S: Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against Fusarium head blight (Fusarium graminearum). *J Chem Ecol* 2011, **11**:769–782.
18. Cuzik A, Urban M, Hammond-Kosack K: Fusarium graminearum gene deletion mutant map1 and Fg DON- reveal similarities and differences in the pathogenicity requirements to cause disease on Arabidopsis and wheat floral tissue. *New Phytol* 2008, **177**:990–1000.
19. Bai G, Shaner G: Variation in Fusarium graminearum and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Dis* 1996, **80**:975–979.
20. Cao H, Li X, Dong X: Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:6531–6536.
21. Mudge AM, Dill-Macky R, Dong Y, Gardiner DM, White RG, Manners JM: A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by Fusarium graminearum and Fusarium pseudograminearum. *Physiol Mol Plant Pathol* 2006, **69**:73–85.
22. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP: A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics* 2003, **19**:185–193.
23. Ge Y, Dudoit S, Speed TP: Resampling-based multiple testing for microarray data analysis. *TEST* 2003, **12**:1–44.
24. Gagnot S, Tamby JP, Martin-Magniette ML, Bitton F, Tacconat L, Balzergue S, Aubourg S, Renou JP, Lecharny A, Brunaud V: CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV CATMA platform. *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:D986–D990.
25. Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Edgar R: NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update. *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:D760–D765.
26. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389–3402.
27. Hong SH, Seo PJ, Yang MS, Xiang F, Park CM: Exploring valid reference genes for gene expression studies in Brachypodium distachyon by real-time PCR. *BMC Plant Biology* 2008, **8**:112.
28. Simon C, Langlois-Meurinne M, Bellvert F, Garnier M, Didierlaurent L, Massoud K, Chaouch S, Marie A, Bodo B, Kauffmann S, Noctor G, Saindrenan P: The differential spatial distribution of secondary metabolites in Arabidopsis leaves reacting hypersensitively to Pseudomonas syringae pv. tomato is dependent on the oxidative burst. *J Exp Bot* 2010, **61**:3355–3370.
29. Hagemeyer J, Schneider B, Oldham NJ, Hahlbrock K: Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in Arabidopsis thaliana leaves infected with virulent or avirulent Pseudomonas syringae pathovar tomato strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:753–758.
30. Goswami RS, Kistler HC: Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the Fusarium graminearum species complex on wheat and rice. *Phytopathol* 2005, **95**:1397–1404.
31. Jansen C, von Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk A, Maier FJ: Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase disrupted Fusarium graminearum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **46**:16892–16897.
32. Maier FJ, Miedaner T, Haderl B, Felk A, Salomon S, Lemmens M, Kassner H, Schäfer W: Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Fg DON-) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Mol Plant Pathol* 2006, **7**:449–461.
33. Bieri S, Mauch S, Shen QH, Peart J, Devoto A, Casais C, Ceron F, Schulze S, Steinbiss HH, Shirasu K, Schulze-Lefert P: RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance. *Plant Cell* 2004, **16**:3480–3495.
34. Gfeller A, Dubugnon L, Lietchi R, Farmer EE: Jasmonate biochemical pathway. *Sci Signal* 2010, **3**:cm3.
35. Kazan K, Manners JM: Jasmonate signaling: towards an integrated view. *Plant Physiol* 2008, **146**:1459–1468.
36. Dunwell JM, Purvis A, Khuri S: Cupins: the most diverse protein superfamily?. *Phytochemistry* 2004, **65**:7–17.
37. Heyno E, Alkan N, Fluhr R: A dual role for plant quinone reductases in host-fungus interaction. *Physiol Plant* 2013, **149**:340–353.
38. Ishihara A, Hashimoto Y, Tanaka C, Dubouzet JG, Nakao T, Matsuda F, Nishioka T, Miyagawa H, Wakasa K: The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant J* 2008, **54**:481–495.
39. Fujiwara T, Maisonneuve S, Isshiki M, Mizutani M, Chen L, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K: Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem* 2010, **285**:11308–11313.
40. Schweiger W, Pasquet JC, Nussbaumer T, Kovalski MP, Wiesenberger G, Macadré C, Ametz T, Berthiller F, Lemmens M, Saindrenan P, Mewes HW, Mayer KFX, Dufresne M, Adam G: Functional characterization of two clusters of Brachypodium distachyon UDP-glycosyltransferases encoding putative deoxynivalenol detoxification genes. *Mol Plant Microbe Interact* 2013, **26**:781–792.
41. Yamauchi Y, Hasegawa A, Taninaka A, Mizutani M, Sugimoto Y: NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. *J Biol Chem* 2011, **286**:6999–7009.
42. Ishihara A, Nakao T, Mashimo Y, Murai M, Ichimaru N, Tanaka C, Nakajima H, Wakasa K, Miyagawa H: Probing the role of tryptophan-derived secondary metabolism in defense responses against Bipolaris oryzae infection in rice leaves by a suicide substrate of tryptophan decarboxylase. *Phytochemistry* 2011, **72**:7–13.
43. Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge APM: Brachypodium distachyon. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Phys* 2001, **127**:1539–1555.
44. Hong SY, Park JH, Cho SH, Yang MS, Park CM: Phenological growth stages of Brachypodium distachyon: codification and description. *Weed Res* 2011, **51**:612–620.

45. Vogel J, Hill T: High-efficiency agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* 2008, **27**:471–478.
46. Vain P, Worland B, Thole V, McKenzie N, Alves SC, Opanowicz M, Fish LJ, Bevan MW, Snape JW: Agrobacterium-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnol J* 2008, **6**:236–245.
47. Pacurar DJ, Thordal-Christensen H, Nielsen KK, Lenk I: A high-throughput agrobacterium-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. *Transgenic Res* 2008, **17**:965–975.
48. Alves SC, Worland B, Thole V, Snape JW, Bevan MW, Vain P: A protocol for agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nat Protoc* 2009, **4**:638–649.
49. Thole V, Alves SC, Worland B, Bevan MW, Vain P: A protocol for efficiently retrieving and characterizing flanking sequence tags (FSTs) in *Brachypodium distachyon* T-DNA insertional mutants. *Nat Protoc* 2009, **4**:650–661.
50. Thole V, Peraldi A, Worland B, Nicholson P, Doonan JH, Vain P: T-DNA mutagenesis in *Brachypodium distachyon*. *J Exp Bot* 2012, **63**:567–576.
51. Bragg JN, Wu J, Gordon SP, Guttman ME, Thilmony R, Lazo GR, Gu YQ, Vogel JP: Generation and characterization of the Western regional research center brachypodium T-DNA insertional mutant collection. *PLoS One* 2012, **7**:e41916.
52. Dalmais M, Antelme S, Ho-Yue-Kuang S, Wang Y, Darracq O, D'Yvoire MB, Cézard L, Légée F, Blondet E, Oria N, Troade C, Brunaud V, Jouanin L, Höfte H, Bendahmane A, Lapierre C, Sibout R: A TILLING platform for functional genomics in *Brachypodium distachyon*. *PLoS One* 2013, **8**:e65503.
53. Initiative TIB: Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 2010, **463**:763–768.
54. Parker D, Beckmann M, Enot DP, Overy DP, Rios ZC, Gilbert M, Talbot N, Draper J: Rice blast infection of *Brachypodium distachyon* as a model system to study dynamic host/pathogen interactions. *Nat Protoc* 2008, **3**:435–445.
55. Liu Z, Ellwood SR, Oliver RP, Friesen TL: *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. *Mol Plant Pathol* 2011, **12**:1–19.
56. Figueroa M, Alderman S, Garvin DF, Pfender WF: Infection of *Brachypodium distachyon* by formae speciales of *Puccinia graminis*: early infection events and host-pathogen incompatibility. *PLoS One* 2013, **8**:e56857.
57. Mandadi KK, Scholthof KB: Characterization of a viral synergism in the monocot *Brachypodium distachyon* reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease. *Plant Physiol* 2012, **160**:1432–1452.
58. Lucas SJ, Baştaş K, Budak H: Exploring the interaction between small RNAs and R genes during *Brachypodium* response to *Fusarium culmorum* infection. *Gene* 2013. doi:10.1016/j.gene.2013.12.025.
59. Goswami RS, Kistler HC: Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol* 2004, **5**:515–525.
60. Foroud NA, Eudes F: Trichothecenes in cereal grains. *Int J Mol Sci* 2009, **10**:147–173.
61. Bai G, Shaner G: Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. *Annu Rev Phytopathol* 2004, **42**:135–161.
62. Ishiga Y, Ishiga T, Uppalapati SR, Mysore KS: Jasmonate ZIM-domain (JAZ) protein regulates host and nonhost pathogen-induced cell death in tomato and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One* 2013, **8**:e75728.
63. Taki N, Sasaki-Sekimoto Y, Obayashi T, Kikuta A, Kobayashi K, Ainai T, Yagi K, Sakurai N, Suzuki H, Masuda T, Takamiya K, Shibata D, Kobayashi Y, Ohta H: 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2005, **139**:1268–1283.
64. Robert-Seilantiantz A, Grant M, Jones JD: Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 2011, **49**:317–343.
65. Brown NA, Urban M, Van de Meene AML, Hammond-Kosack KE: The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonization in wheat ears. *Fungal Biol* 2010, **114**:555–571.
66. Ding L, Xu H, Yi H, Yang L, Kong Z, Zhang L, Xue S, Jia H, Ma Z: Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS One* 2011, **6**:e19008.
67. Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, Maclean DJ, Schenk PM, Gardiner DM, Munn AL, Kazan K: The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol Plant Pathol* 2008, **9**:435–445.
68. Boutigny AL, Richard-Forget F, Barreau C: Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. *Eur J Plant Pathol* 2008, **121**:411–423.
69. Schweiger W, Boddu J, Shin S, Poppenberger B, Berthiller F, Lemmens M, Muehlbauer GJ, Adam G: Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast. *Mol Plant-Microbe Interact* 2010, **23**:977–986.
70. Kluger B, Bueschl C, Lemmens M, Berthiller F, Häubl G, Jaunecker G, Adam G, Krska R, Schuhmacher R: Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Anal Bioanal Chem* 2013, **405**:5031–5036.
71. Bollina V, Kumaraswamy GK, Kushalappa AC, Choo TM, Dion Y, Rioux S, Faubert D, Hamzehzarghani H: Mass-spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistance-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Mol Plant Pathol* 2010, **11**:769–782.
72. Kumaraswamy GK, Bollina V, Kushalappa AC, Choo TM, Dion Y, Rioux S, Mamer O, Faubert D: Metabolomics technology to phenotype resistance in barley against *Gibberella zeae*. *Eur J Plant Pathol* 2011, **130**:29–43.
73. Allwood JW, Ellis DJ, Heald JK, Goodacre R, Mur LA: Metabolomic approaches reveal that phosphatidic and phosphatidyl glycerol phospholipids are major discriminatory non-polar metabolites in responses by *Brachypodium distachyon* to challenge by *Magnaporthe grisea*. *Plant J* 2006, **46**:351–368.
74. Parker D, Beckmann M, Zubair H, Enot DP, Caracul-Rios Z, Overy DP, Snowdon S, Talbot NJ, Draper J: Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *Plant J* 2009, **59**:723–737.
75. Du Fall LA, Solomon PS: Role of cereal secondary metabolites involved in mediating the outcome of plant-pathogen interactions. *Metabolites* 2011, **1**:64–78.
76. Niemeyer HM: Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* 1988, **27**:3349–3358.
77. Dutartre L, Hilliou F, Feyereisen R: Phylogenomics of the benzoxazinoid biosynthetic pathway of Poaceae: gene duplications and origin of the Bx cluster. *BMC Evol Biol* 2012, **12**:64.
78. Kang K, Kim YS, Park S, Back K: Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Phys* 2009, **150**:1380–1393.
79. Du Fall LA, Solomon PS: The necrotrophic effector SnToxA induces the synthesis of a novel phytoalexin in wheat. *New Phytol* 2013, **200**:185–200.

doi:10.1186/1471-2164-15-629

Cite this article as: Pasquet et al.: Differential gene expression and metabolomic analyses of *Brachypodium distachyon* infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics* 2014 **15**:629.

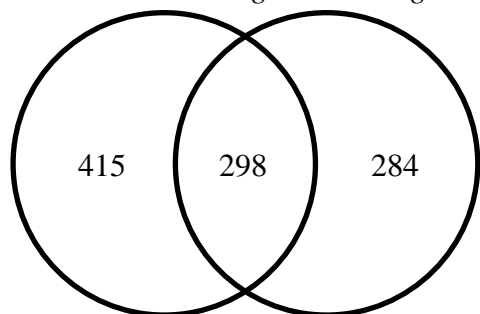
Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



A DON vs contrôle *FgDON*⁺ vs *FgDON*⁻



B DON vs contrôle *FgDON*⁺ vs *FgDON*⁻

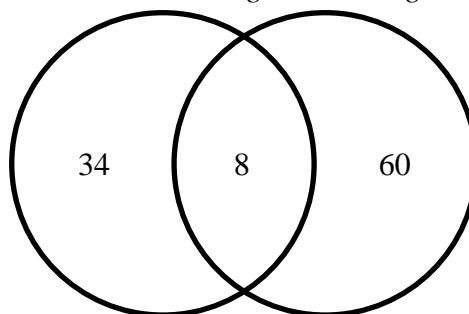


Figure 18 : Diagramme de Venn montrant l'accumulation différente de transcrits après application de DON ou dans la comparaison des infections par les souches *FgDON*⁺ et *FgDON*⁻. **A. Nombre de transcrits induits ; **B.** Nombre de transcrits réprimés. $|\text{Log}_2| \geq 2$ pour DON vs contrôle ; $|\text{Log}_2| \geq 3$ pour *FgDON*⁺ vs *FgDON*⁻ ; p-value $\leq 0,05$.**

Tableau 8 : Proportions relatives des catégories fonctionnelles représentées par les transcrits différentiellement accumulés selon les différentes conditions (en %).

	Spécifiques du DON		Communs DON et <i>FgDON</i> ⁺ vs <i>FgDON</i> ⁻		Spécifiques <i>FgDON</i> ⁺ vs <i>FgDON</i> ⁻	
	Induits	Réprimés	Induits	Réprimés	Induits	Réprimés
Défense, résistance, réponses aux stress	4.01	0.45	4.25	0	6.40	0.58
Stress oxydant, statuts redox	2.90	0.45	1.96	0	2.91	0.87
CYP	1.78	0	2.61	0	2.33	0.29
UGT	1.78	0	3.27	0	1.74	0
GST	2.23	0	0.98	0	1.45	0.29
Transport	4.68	0.22	3.92	0	3.20	0.58
Métabolisme des acides aminés	2.90	0.45	2.94	0	0.58	0.00
Biosynthèse et signalisation hormonales	4.45	0	6.86	0	4.07	0.29
Métabolisme secondaire	2.45	0	1.31	0	1.74	0
Protéasome, protéolyse, ubiquitination	2.90	0	1.96	0	2.03	0
Transduction de signal	9.80	0.22	16.34	0	13.66	0.29
Protéines régulatrices, facteurs de transcription	12.25	0.67	12.75	0	9.59	1.45
Chloroplaste, photosynthèse	1.34	0.45	0.33	0.98	0.87	4.65
Ribosomes, traduction	1.56	0.22	2.94	0	0.29	0.58
Métabolisme et signalisation des lipides	0.67	0	0.33	0	1.45	0.29
Métabolisme général	2.90	0.45	0.33	0.33	0.29	1.16
Divers	17.37	2.23	13.07	0.65	13.08	4.36
Inconnus	16.48	1.78	21.24	0.65	16.86	1.74

Résultats complémentaires

La réalisation du transcriptome de *B. distachyon* après infection par une souche productrice ($FgDON^+$) ou non ($FgDON^-$) de DON a mis en évidence de nombreuses dérégulations transcriptionnelles. La souche $FgDON^-$ n'est pas totalement bloquée dans son développement mais présente un retard de colonisation chez *B. distachyon*. Il est donc difficile de distinguer quelles sont les dérégulations transcriptionnelles liées au retard de colonisation ou celles liées à la non production de DON. Afin de renforcer ces résultats et d'avoir une vision plus précise de l'impact du DON lui-même sur ces modifications transcriptionnelles, nous avons réalisé un transcriptome 12 h après application de la mycotoxine. Ce transcriptome a été réalisé de la même façon que celui après infection mais avec une application de DON seul, comme décrit dans le **Matériel et Méthodes** partie **C.2**.

L'application de DON a montré une dérégulation de 755 transcrits ($|\text{Log}_2| \geq 2$; p-value $\leq 0,05$): 713 transcrits induits (**Figure 18A**) et 42 transcrits réprimés (**Figure 18B**). La comparaison de ces 755 transcrits avec les 650 identifiés dans la comparaison $FgDON^+$ vs $FgDON^-$ ($|\text{Log}_2| \geq 3$; p-value $\leq 0,05$) met en évidence 298 transcrits induits et 8 transcrits réprimés communs à ces deux conditions (**Figure 18**). L'annotation de l'ensemble des 755 gènes a permis de les regrouper en grandes catégories fonctionnelles (**Tableau 8**). Les catégories obtenues sont de même nature que celle obtenues précédemment dans la comparaison $FgDON^+$ vs $FgDON^-$. Nous constatons que les gènes codant des fonctions protéiques impliquées dans la photosynthèse sont majoritairement réprimés et présents dans les transcrits spécifiques de la comparaison $FgDON^+$ vs $FgDON^-$. Dans la catégorie fonctionnelle « biosynthèse et signalisation hormonales » pour les conditions « spécifiques du DON » et « communs DON et $FgDON^+$ vs $FgDON^-$ », 50% des transcrits sont associés à l'éthylène (**Figure 19**). L'ensemble de ces transcrits sont induits par le DON dans la comparaison $FgDON^+$ vs $FgDON^-$ sauf un gène spécifiquement induit par la mycotoxine. Il est également intéressant de noter que nous avons pu identifier quatre transcrits codant des protéines connues pour leur implication dans la répression de la PCD (**Figure 20**). Ces transcrits sont tous induits par le DON et deux d'entre eux le sont également dans la comparaison $FgDON^+$ vs $FgDON^-$. Le rôle des protéines codées par ces différents transcrits, dans l'interaction entre *B. distachyon* et *F. graminearum* sera abordé dans la discussion.

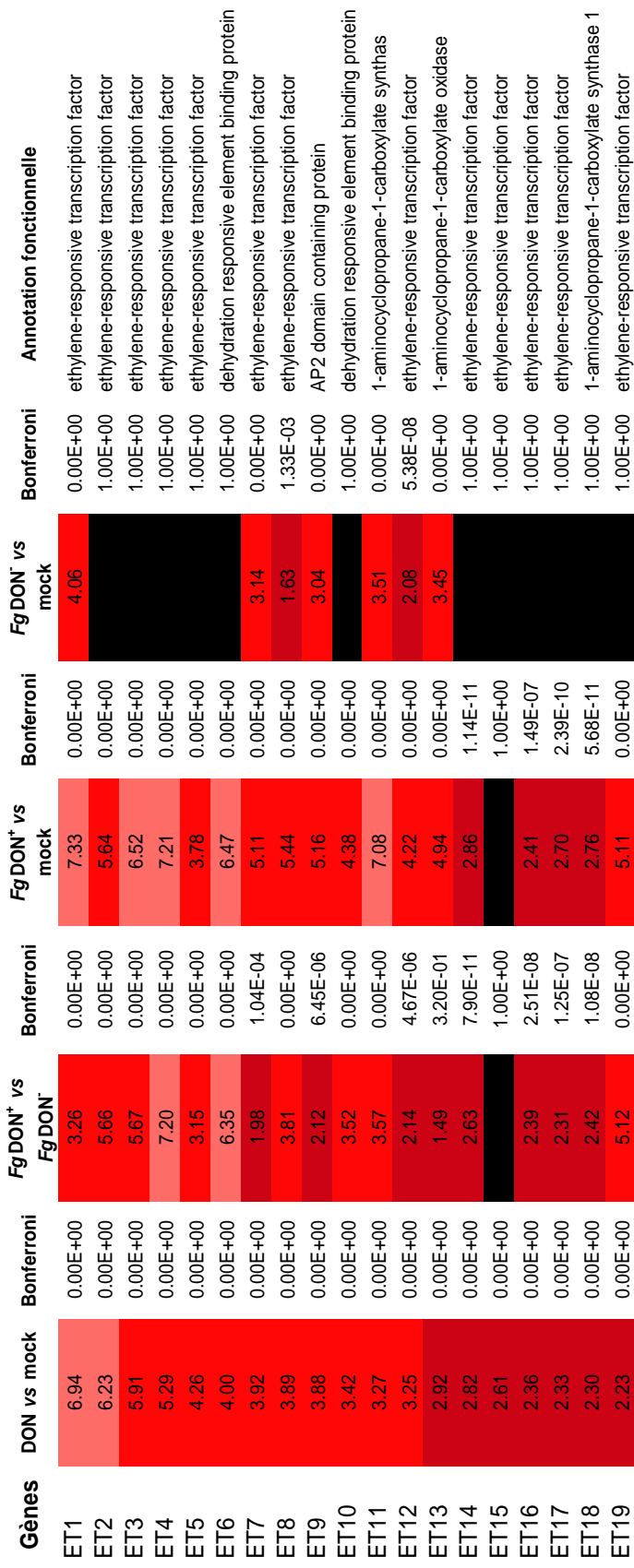


Figure 19 : Transcrits codant des protéines impliquées dans la biosynthèse de l'éthylène (ET) ou dans la réponse à l'ET.

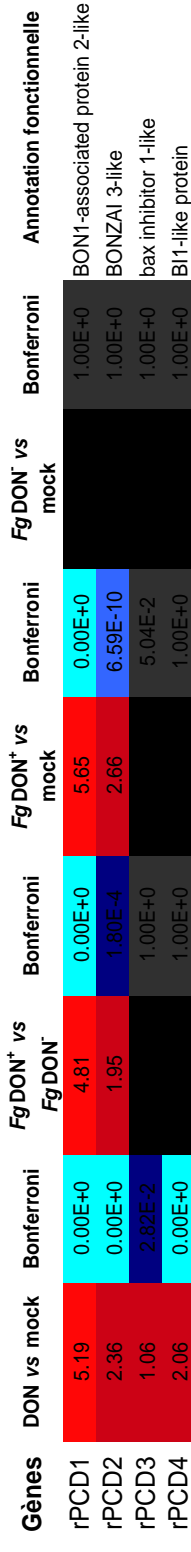


Figure 20 : Transcrits codant des protéines impliquées dans la répression de la mort cellulaire programmée.

Conclusion

La caractérisation de l'interaction entre *B. distachyon* et les deux souches de *F. graminearum* ($FgDON^+$ et $FgDON^-$) a mis en évidence des différences de développement de l'agent pathogène. Nous avons pu montrer que dès 48 hai, l'agent pathogène (quelque soit la souche) est détectable dans les stigmates plumeux de la plante mais pas dans les anthères. Dès 72 hai, une différence de réponse de la plante apparaît : sur les glumelles des cellules mortes ou en cours de mort cellulaire en réponse à la souche $FgDON^-$, mais pas en réponse à la souche $FgDON^+$, sont observables. La souche $FgDON^+$ provoque 96 hai des symptômes de blanchiment caractéristiques de la FHB s'accompagnant de la production de DON alors que la souche $FgDON^-$ provoque uniquement des brunissements. La quantification de la biomasse fongique de ces deux souches a également montré un retard de colonisation de la souche $FgDON^-$ en comparaison à la souche $FgDON^+$. Ce retard de colonisation est aussi observable à travers la capacité des deux souches à produire un inoculum secondaire dans des temps tardifs de l'infection. Cependant, cet écart, même s'il reste significatif 21 jai, tend à s'atténuer.

L'analyse transcriptomique de la réponse de la plante 96 hai par les souches $FgDON^+$ et $FgDON^-$ a mis en évidence la régulation de 3506 transcrits. 20 gènes différentiellement régulés nous ont permis de valider les données de microarrays en confirmant par qPCR les dérégulations observées. Parmi les 3506 transcrits différentiellement régulés, nous nous sommes particulièrement intéressés aux transcrits différentiellement exprimés entre les 2 souches (650 transcrits, $|\text{Log}_2| \geq 3$ et $p\text{-value} \leq 0,05$). L'organisation en catégories fonctionnelles de ces 650 transcrits a permis de mettre en évidence qu'ils appartiennent aux mêmes catégories que celles présentées dans les données obtenues chez le blé et l'orge. 459 de ces 650 transcrits ne sont pas régulés par la souche $FgDON^-$ ce qui rend cet ensemble de gènes particulièrement intéressant pour la recherche de gènes candidats codant des fonctions (UGTs, GST, CYPs et transporteurs) potentiellement impliquées dans les processus de détoxification du DON. La dérégulation d'expression de ces transcrits est donc soit spécifique de la production de DON par la souche $FgDON^+$ soit liée au décalage de colonisation observé entre les 2 souches. Ces résultats ne nous permettent pas de privilégier une hypothèse par rapport à l'autre. Afin de trancher entre les deux hypothèses, nous pouvons désormais utiliser les résultats de transcriptomique en réponse à l'application de DON. Le recoupement des 650 transcrits différentiels entre les deux souches avec ceux régulés par l'application de DON seul met en évidence 306 transcrits communs (298 induits et 8 réprimés), parmi lesquels nous

retrouvons des fonctions protéiques potentiellement liées aux processus de détoxification. Les données transcriptomiques en réponse à l'agent pathogène confirme l'implication de la voie éthylène dans l'interaction. Les données obtenues après application de DON démontrent que cette voie est également manipulée par la mycotoxine seule et met en évidence d'une répression de la PCD.

L'analyse métabolomique 96 hai par les deux souches a révélé d'importantes différences d'accumulation dans des métabolites issus de la voie du tryptophane (tryptophane, tryptamine, sérotonine, féruloylsérotonine et coumaroylsérotonine). *In vitro*, la sérotonine retarde la croissance mycélienne et la germination des spores de *F. graminearum*. En revanche, elle semble stimuler la production de spores en milieu liquide. Cette analyse métabolomique a également mis en évidence des différences d'accumulation dans des composés dérivés de l'acide férulique ou de l'acide coumarique.

L'ensemble de ces résultats désormais disponibles au laboratoire démontre que *B. distachyon* met en place des réponses macroscopiques, moléculaires et métaboliques à *F. graminearum* proches de celles observées chez le blé et l'orge. L'utilisation de cette plante modèle pour la réalisation d'analyses fonctionnelles en relation avec la résistance de la plante à la FHB est donc tout à fait pertinente.

Nous avons donc ainsi cherché à identifier dans le chapitre suivant un (ou des) gène(s) candidat(s) potentiellement impliqués dans le processus de conjugaison du DON en DON-3-*O*-glucoside.

**CHAPITRE 2 : Analyse phylogénétique des UGTs de *B. distachyon* et
recherche de candidats conjuguant le DON en D3G**

Introduction

Dans le précédent chapitre, nous avons pu montrer qu'un grand nombre de gènes sont différentiellement régulés chez *B. distachyon* en réponse à une souche de *F. graminearum* productrice ou non de DON. Parmi les fonctions codées par ces gènes, se trouvent des fonctions potentiellement impliquées dans les processus de détoxification (voir **Introduction**, partie **F.1.**) : UGTs, GSTs, CYPs et divers transporteurs. Les résultats obtenus précédemment sont en accord avec les données disponibles dans la littérature. En effet, la régulation de gènes codant des fonctions potentiellement impliquées dans la conjugaison du DON n'est pas nouvelle et est bien documentée (Boddu et al., 2006; Boddu et al., 2007; Walter et al., 2008; Jia et al., 2009; Steiner et al., 2009; Gardiner et al., 2010; Buerstmayr et al., 2012; Foroud et al., 2012; Al-Taweel et al., 2014). Dans certains cas, la régulation transcriptionnelle a été renforcée soit par la détection des métabolites résultant de l'activité protéique codée par les gènes régulés soit par la réalisation d'analyses fonctionnelles sur ces gènes en systèmes hétérologues. La détection du D3G (Lemmens et al., 2005; Schweiger et al., 2013) et du DON-GSH (Kluger et al., 2013) met en évidence la possible conjugaison du DON avec le glucose ou le glutathion suite à l'action d'UGTs ou de GSTs, respectivement. Une première analyse fonctionnelle par expression dans un système hétérologue levure du gène codant UGT73C5 d'*A. thaliana* et par surexpression de ce gène dans *Arabidopsis* a mis en évidence l'implication de cette UGT dans la conjugaison du DON en D3G (Poppenberger et al., 2003). L'analyse fonctionnelle de quatre gènes d'orge (codant des UGTs) régulés transcriptionnellement en réponse à l'infection par *F. graminearum* (Gardiner et al., 2010) a montré que seul le gène codant HvUGT13248 confère une résistance au DON en système hétérologue levure (Schweiger et al., 2010). Récemment, la surexpression d'*Hv13248* chez *A. thaliana* a été réalisée et aboutit également à l'accumulation de D3G dans la plante après exposition au DON (Shin et al., 2012).

La résistance à la fusariose chez le blé a, à plusieurs reprises, été corrélée avec la capacité de la plante à former du D3G (Lemmens et al., 2005; Schweiger et al., 2013). Cependant, *A. thaliana* n'étant pas un hôte naturel de *F. graminearum*, les analyses fonctionnelles d'UGT73C5 et d'HvUGT13248 ne peuvent en aucun cas être mises en relation avec le développement de la maladie. C'est pourquoi l'objectif de ce chapitre a été d'identifier un ou des gènes candidats codant des UGTs capables de conjuguer le DON en D3G chez *B. distachyon*, plante hôte de *F. graminearum* (Peraldi et al., 2011).

Les gènes codant les UGTs sont connus pour être organisés en familles multigéniques chez les plantes (Gachon et al., 2005). Malgré la disponibilité du génome de *B. distachyon*, aucune étude sur ces gènes n'avait été conduite.

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier l'ensemble des gènes codant des UGTs dans le génome de *B. distachyon* grâce à la présence du motif PSPG (voir **Introduction**, partie **F.2.**) dans les séquences protéiques correspondante, ce motif étant caractéristique de ces enzymes chez les plantes (Paquette et al., 2003). L'ensemble des séquences protéiques identifiées ont été alors organisées entre elles par le biais d'une analyse phylogénétique avec l'ensemble des UGTs d'*A. thaliana*.

Les UGTs UGT73C5 d'Arabidopsis et HvUGT13248 d'orge ayant au préalable montré leur capacité à conjuguer le DON en D3G, nous avons cherché à identifier leurs orthologues respectifs chez *B. distachyon* en remplaçant ces séquences protéiques sur l'arbre phylogénétique obtenu.

Comme nous avons pu le voir dans l'**Introduction** (partie **F.2.**), la spécificité de substrat des UGTs reste très complexe à déterminer pour diverses raisons. Le motif impliqué dans la fixation du substrat (localisé en N terminal de la protéine) n'est actuellement pas identifiable par des analyses *in silico* (Osmani et al., 2009). De plus, des UGTs appartenant au même groupe phylogénétique peuvent ne pas prendre en charge les mêmes substrats (Lim et al., 2003). Etant donné que les gènes codants des UGTs appartiennent à une famille multigénique, il est probable de voir apparaître des gènes organisés en cluster avec une très forte similarité voire une identité de séquences. Dans ce cas, il risque d'être impossible d'identifier un seul candidat distinctement.

Les gènes codant des UGTs sont connus pour être inductibles en présence de leur substrat. Afin d'essayer de compléter l'approche phylogénétique, nous avons choisi de suivre les profils d'expression des gènes candidats en réponse à l'application de DON au niveau des épillets. Les profils d'expression des différents candidats ont été également déterminés en réponse à l'infection par deux souches de *F. graminearum* : l'une productrice de DON (*FgDON*⁺) et l'autre non productrice de DON (*FgDON*⁻) (voir **Chapitre 1**). La souche *FgDON*⁻ nous a permis d'évaluer la spécificité de la régulation transcriptionnelle des différents candidats en réponse à l'infection en présence de DON.

Enfin, le système hétérologue levure ayant au préalable montré des résultats prometteurs (Poppenberger et al., 2003; Schweiger et al., 2010), celui-ci a été utilisé pour déterminer si l'expression des ADNc correspondants confère la résistance à *S. cerevisiae* et si

cette résistance s'accompagne de la formation de D3G. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Gerhard Adam (BOKU, Tull'n, Autriche)

Article 2 : Functional Characterization of Two Clusters of *Brachypodium distachyon* UDP-Glycosyltransferases Encoding Putative Deoxynivalenol Detoxification Genes

Wolfgang Schweiger, Jean-Claude Pasquet, Thomas Nussbaumer, Maria Paula Kovalsky Paris, Gerlinde Wiesenberger, Catherine Macadré, Christian Ametz, Franz Berthiller, Marc Lemmens, Patrick Saindrenan, Hans-Werner Mewes, Klaus F. X. Mayer, Marie Dufresne, and Gerhard Adam

Molecular Plant-Microbe Interactions (2013) **26**, 781–792

Functional Characterization of Two Clusters of *Brachypodium distachyon* UDP-Glycosyltransferases Encoding Putative Deoxynivalenol Detoxification Genes

Wolfgang Schweiger,¹ Jean-Claude Pasquet,² Thomas Nussbaumer,³ Maria Paula Kovalsky Paris,¹ Gerlinde Wiesenberger,¹ Catherine Macadré,² Christian Ametz,⁴ Franz Berthiller,⁵ Marc Lemmens,⁴ Patrick Saindrenan,² Hans-Werner Mewes,³ Klaus F. X. Mayer,³ Marie Dufresne,² and Gerhard Adam¹

¹Department of Applied Genetics and Cell Biology, University of Natural Resources and Life Sciences, A-3430 Tulln, Austria; ²Institut de Biologie des Plantes, Bâtiment 630, Université Paris Sud, F-91405 Orsay Cedex France; ³Munich Information Center for Protein Sequences/Institute for Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Center Munich, D-85764 Neuherberg, Germany; ⁴Institute for Biotechnology in Plant Production and ⁵Christian Doppler Laboratory for Mycotoxin Metabolism, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Life Sciences, A-3430 Tulln, Austria

Submitted 28 August 2012. Accepted 26 March 2013.

Plant small-molecule UDP-glycosyltransferases (UGT) glycosylate a vast number of endogenous substances but also act in detoxification of metabolites produced by plant-pathogenic microorganisms. The ability to inactivate the *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol (DON) into DON-3-O-glucoside is crucial for resistance of cereals. We analyzed the UGT gene family of the monocot model species *Brachypodium distachyon* and functionally characterized two gene clusters containing putative orthologs of previously identified DON-detoxification genes from *Arabidopsis thaliana* and barley. Analysis of transcription showed that UGT encoded in both clusters are highly inducible by DON and expressed at much higher levels upon infection with a wild-type DON-producing *F. graminearum* strain compared with infection with a mutant deficient in DON production. Expression of these genes in a toxin-sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae* revealed that only two *B. distachyon* UGT encoded by members of a cluster of six genes homologous to the DON-inactivating barley HvUGT13248 were able to convert DON into DON-3-O-glucoside. Also, a single copy gene from *Sorghum bicolor* orthologous to this cluster and one of three putative orthologs of rice exhibit this ability. Seemingly, the UGT genes undergo rapid evolution and changes in copy number, making it difficult to identify orthologs with conserved substrate specificity.

The fungal hemibiotrophic pathogen *Fusarium graminearum* and closely related species (Sarver et al. 2011) are able to infect a broad range of crop plants (Goswami and Kistler 2004; Kazan et al. 2012), most importantly wheat (*Triticum aestivum*) and

Current address for W. Schweiger: Institute for Biotechnology in Plant Production, Department for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Life Sciences, A-3430 Tulln, Austria.

Corresponding author: W. Schweiger;
E-mail: wolfgang.schweiger@boku.ac.at

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates seven supplementary tables and four supplementary figures are published online.

barley (*Hordeum vulgare*) but also maize (*Zea mays*). In addition, dicotyledonous hosts ranging from potato (*Solanum tuberosum*) (Delgado et al. 2010) to sugar beet (*Beta vulgaris*) (Christ et al. 2011) and *Arabidopsis thaliana* (Urban et al. 2002) can also be infected. Presumably, the fungus can suppress resistance in a broad range of host plants by either effector proteins or small molecule effectors. Little is known about the role of the numerous potential secondary metabolites that the fungus seems to be able to produce, as revealed by the genome sequence (Cuomo et al. 2007). According to the *F. graminearum* database (Wong et al. 2011), it contains 15 predicted genes encoding polyketide synthases, 19 nonribosomal peptide synthetases, and 21 putative genes involved in biosynthesis of terpenoids (17 terpenoid synthases [IPR008949] and four terpenoid cyclases/protein prenyltransferases [IPR008930]). For only a small fraction of these genes, corresponding metabolites are known (Hansen et al. 2012). Deoxynivalenol (DON) is a sesquiterpene and prominent member of the class of trichothecene mycotoxins, which inhibit eukaryotic protein synthesis (Cundliffe and Davies 1977). DON attracted broad scientific interest because it is also highly toxic to humans and animals consuming *F. graminearum*-infected and DON-contaminated grain (European Commission 1999; Pestka 2010). To protect consumers, harsh maximum tolerated levels of DON in cereals and commodities intended for human consumption were enacted in Europe (European Commission 2006). The biosynthetic pathway for DON production has been, for the most part, elucidated (McCormick et al. 2011).

Disruption of the *TRI5* gene encoding trichodiene synthase, the first dedicated step in DON biosynthesis, results in reduced virulence of the fungal pathogen on wheat (Proctor et al. 1995). The *tri5* mutants can still infect but are challenged in their ability to spread from the infection site to other spikelets in wheat (Bai et al. 2002). It has been demonstrated (Jansen et al. 2005) that, in a susceptible wheat cultivar, spreading of a *tri5* mutant to neighboring spikelets was blocked by cell wall thickenings in the rachis nodes, and that this process was suppressed during infection with the toxin producing wild-type *F. graminearum*. Resistance to *F. graminearum* head blight in wheat and other cereals is a complex, polygenically inherited trait (Buerstmayr et al. 2009). A major quantitative trait locus in wheat, *Qfhs.ndsu-3BS* (containing the hypothetical *F. gra-*

minearum resistance gene *Fhb1*) restricts the spread of disease symptoms (Buerstmayr et al. 2002; Waldron et al. 1999). In a wheat population segregating for *Fhb1*, lines containing the *Fhb1* resistance allele were shown to efficiently conjugate DON to the less toxic DON-3-O-glucoside (D3G) (Lemmens et al. 2005). Recently, it has been shown by comparison of near-isogenic lines differing in *Fhb1* that the rachis of the resistant line contained much higher levels of various phenylpropanoids and, in particular, phenylpropanoid amides (Gunnaiyah et al. 2012). These authors did not find significantly different levels of DON and D3G in the infected spikelet and, therefore, repudiated the hypothesis that *Fhb1* is based on increased glycosylation capacity leading to increased DON resistance. Yet, this is difficult to reconcile with results of studies using pure toxin (Horevavaj et al. 2012; Lemmens et al. 2005). The seemingly conflicting results can be explained by the hypothesis that, in the heavily inoculated spikelet, resistance is overwhelmed but that DON diffusing ahead of the fungus induces UDP-glycosyltransferases (UGT) in neighboring tissue in the resistant line, eventually antagonizing the virulence factor. Potentially, there could also be differences between cultivars in the further metabolism of D3G to other metabolites, such as DON-malonylglucoside and the recently described DON-di/tri/tetra-glucosides (Zachariasova et al. 2012).

The first UGT gene (*DOG1*, *AtUGT73C5*) encoding an enzyme capable of DON detoxification was identified by selection of an *A. thaliana* cDNA clone that rescued a toxin-sensitive yeast strain on DON-containing media (Poppenberger et al. 2003).

UGT are encoded by a very large gene family, with well over 100 members in different plant species (Bowles et al. 2005). Identification of specific UGT from crop plants such as wheat, which conjugates DON to D3G, turned out to be very difficult (Schweiger et al. 2011). Numerous candidate UGT genes and gene fragments that are induced during *F. graminearum* infection were identified in different studies (Desmond et al. 2008; Hill-Ambroz et al. 2006; Lulin et al. 2010; Steiner et al. 2009; Walter et al. 2008). Transcriptomic studies in barley have led to the identification of candidate genes, which are induced by DON application and by infection with a DON-producing wild-type *F. graminearum* but not with a DON-deficient *tri5* mutant (Boddu et al. 2006, 2007; Gardiner et al. 2010). Nine of these barley UGT were tested by heterologous expression in a DON-sensitive yeast strain but only one gene, designated *HvUGT13248*, could be validated and was able to confer DON resistance via the conjugation of DON to D3G (Schweiger et al. 2010; M. P. Kovalsky Paris, unpublished data). Theoretically, the same resistance mechanism should operate in different crop plants and contribute to the complex trait *F. graminearum* resistance by antagonizing the virulence factor DON. Orthologs of the genes identified in *A. thaliana* or barley are obvious candidates to play such a role. Because the genomes of wheat and barley are not sequenced yet, we de-

cidated to analyze the architecture of the UGT gene family from the closely related monocot model plant *Brachypodium distachyon*, for which the genome sequence is available (International Brachypodium Initiative 2010). The goal of our study was to functionally test genes with the highest similarity to the previously identified *A. thaliana* and barley UGT encoding DON detoxification enzymes (*AtUGT73C5* and *HvUGT13248*). We also tested putative orthologs of candidates from the more distantly related and sequenced crop plants rice (*Oryza sativa*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). Our results indicate that translational research with the goal to identify corresponding DON detoxification genes across a range of crop plants is nontrivial due to the rapid changes in copy number of clusters of UGT and changes in substrate specificity of highly similar genes.

RESULTS

Architecture of the UGT gene family of *B. distachyon*.

Small-molecule-conjugating UGT, also known as family 1 UGT, are a very large gene family in plants that has been characterized phylogenetically and, in part, functionally in *A. thaliana* (Paquette et al. 2003; Ross et al. 2001), and to a limited extent in other species (Gachon et al. 2005). Information on UGT of crop species is generally scarce. *B. distachyon* is the closest sequenced relative of wheat and barley. Therefore, we decided to characterize the *B. distachyon* small-molecule UGT gene family. A hallmark of these enzymes is a motif called PSPG-box (Gachon et al. 2005; Vogt and Jones 2000), which is part of the region interacting with the UDP-sugar co-substrate. Using the sequence WAPQVEVLAHPAVGCFVTHCGWNSTLESISAGVPMVAWPPFADQ (Vogt and Jones 2000) as a query with the BlastP algorithm (E value < e^{-10}), 144 putative UGT genes were identified in the *Brachypodium* genome database (gene model version 1.2) hosted by the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS). A query for the corresponding entry in the Pfam protein family database (PF00201, UDP-glucuronosyl, and UGT) yielded 166 gene models. Searching for the InterPro domain motif IPR002213 (UDP-glucuronosyl/UGT) identified 178 gene models.

The *B. distachyon* UGT gene loci predicted by InterPro are dispersed throughout all five chromosomes (Supplementary Fig. S1) but frequently form clusters of up to seven genes. We denoted 13 gene models as probable pseudogenes. Compared with other genes they seem to encode N- or C-terminally truncated and, therefore, nonfunctional proteins (Supplementary Table S1). In contrast, Bradi2g34500.1, spanning a predicted 2,844-bp open reading frame (ORF), is considered to be a pseudogene due to its unusually large size. The remaining 164 UGT genes range in ORF length between 1,152 and 1,836 bp. The average gene length of 1,450 bp is consistent with the average UGT ORF length calculated for barley (1,452 bp) from a set of 76 UGT coding sequence that have been made publicly available with a library of full-length cDNAs (Matsumoto et al. 2011). For four genes, at least one alternative gene model is predicted, differing in the presence or absence of a hypothetical intron. We chose the versions with the highest confidence class for further analysis (Bradi1g27290.2, Bradi2g49057.1, Bradi2g47420.1, and Bradi3g07997.4). In summary, by subtracting 14 pseudogenes and five hypothetical alternative splicing forms of four different genes from the identified 178 predicted gene models, we concluded that the *B. distachyon* genome contains 159 genes encoding potentially functional UGT.

The *B. distachyon* UGT amino acid sequences were submitted to the UDP-Glucuronosyltransferase Nomenclature Committee, which provided systematic names (Supplementary Table S2) following the published guidelines (Mackenzie et al. 1997).

Table 1. Systematic names of UDP-glycosyltransferase gene loci characterized in this study

Locus name	Clade	Systematic name
Bradi2g04700.1	D1	UGT99B5
Bradi2g04720.1	D1	UGT98B5
Bradi2g04747.1	D1	UGT98B6
Bradi2g04760.1	D1	UGT98B7
Bradi5g02780.1	L1	UGT74J7
Bradi5g03300.1	L1	UGT74J9
Bradi5g03370.1	L1	UGT74J12
Bradi5g03380.1	L1	UGT74J8
Bradi5g03390.1	L1	UGT74J10
Bradi5g03400.1	L1	UGT74J11

For UGT described in more detail, the systematic names are given in Table 1. To assess the evolutionary relationship between *B. distachyon* UGT and the already established UGT-phylogeny of *A. thaliana*, the 159 *B. distachyon* UGT amino acid sequences were compared with 122 *A. thaliana* UGT amino acid sequences listed currently in the *A. thaliana* cytochrome 450 and UGT database in a combined multiple alignment and phylogenetic analysis (ClustalW2, neighbor-joining, 1,000 bootstrap iterations). The results are shown in Figure 1. In *B. distachyon*, we identified 24 clades that, based on this combined phylogeny, share ancestral genes with 22 orthologous groups in *A. thaliana*. Within most clades, UGT from *A. thaliana* and *B. distachyon* form distinct groups, suggesting

that these have evolved separately in both species. The *B. distachyon* clades were denominated after the nomenclature introduced for *A. thaliana* by Ross and associates (2001). Subgroups (e.g., clades L1 and L2) were added when *B. distachyon* clades were more differentiated than the original *A. thaliana* clades.

Most *B. distachyon* UGT genes contain either no intron (96 gene models) or only one (50 models). Eleven gene models harbor two or three introns and only Bradi2g56102.1 and Bradi3g07997.4 exhibit a more complex intron/exon structure, with 13 or 14 introns, respectively. These genes are most similar to sterol-UGT, which also contain an exceptionally high number of introns and splice variants in other species, including *A. thaliana* (DeBolt et al. 2009).

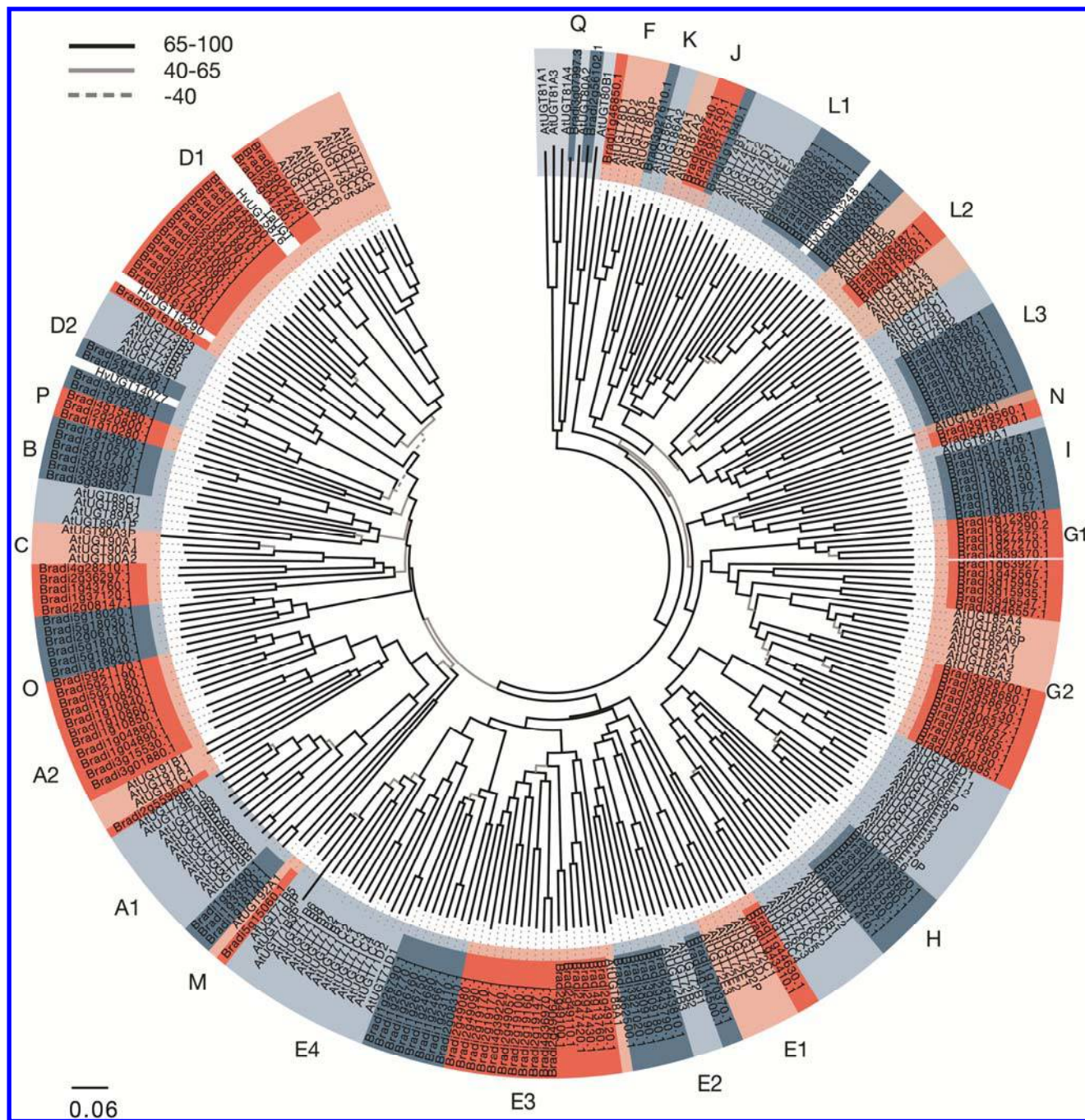


Fig. 1. Combined phylogenetic analysis of *Brachypodium distachyon* and *Arabidopsis thaliana* UDP-glycosyltransferase (UGT) amino acid sequences. Evolutionary related clades are colored in alternating blue and red. *Arabidopsis* UGT are shaded in light colors and *B. distachyon* UGT in dark colors. Bootstrap (1,000×) confidence values lower than 65 are given in gray and values lower than 40 in dashed gray lines. Cluster denomination for *B. distachyon* has been adapted from *Arabidopsis* (Ross et al. 2001). Individual subgroups have been further separated (e.g., A1 and A2). Deoxynivalenol (DON)-responsive genes reported by Schweiger and associates (2010) have been integrated into the phylogeny (no colored background, clades D1, D2, and L1).

Excluding the sterol-UGT, we identified a minimum of 23 intron insertion events and five intron losses by comparing the distribution of introns with the phylogenetic analysis based on the amino acid sequences (Supplementary Fig. S2). Although many introns are specific for single genes or are only shared

by few paralogous genes, one intron was found conserved across 36 genes in seven clades (F, K, J, G, H, N, and I): all but one of these introns share the same intron phase (the position of the intron within a codon) and all introns reside at approximately the same position (478 to 562 bp), suggesting a

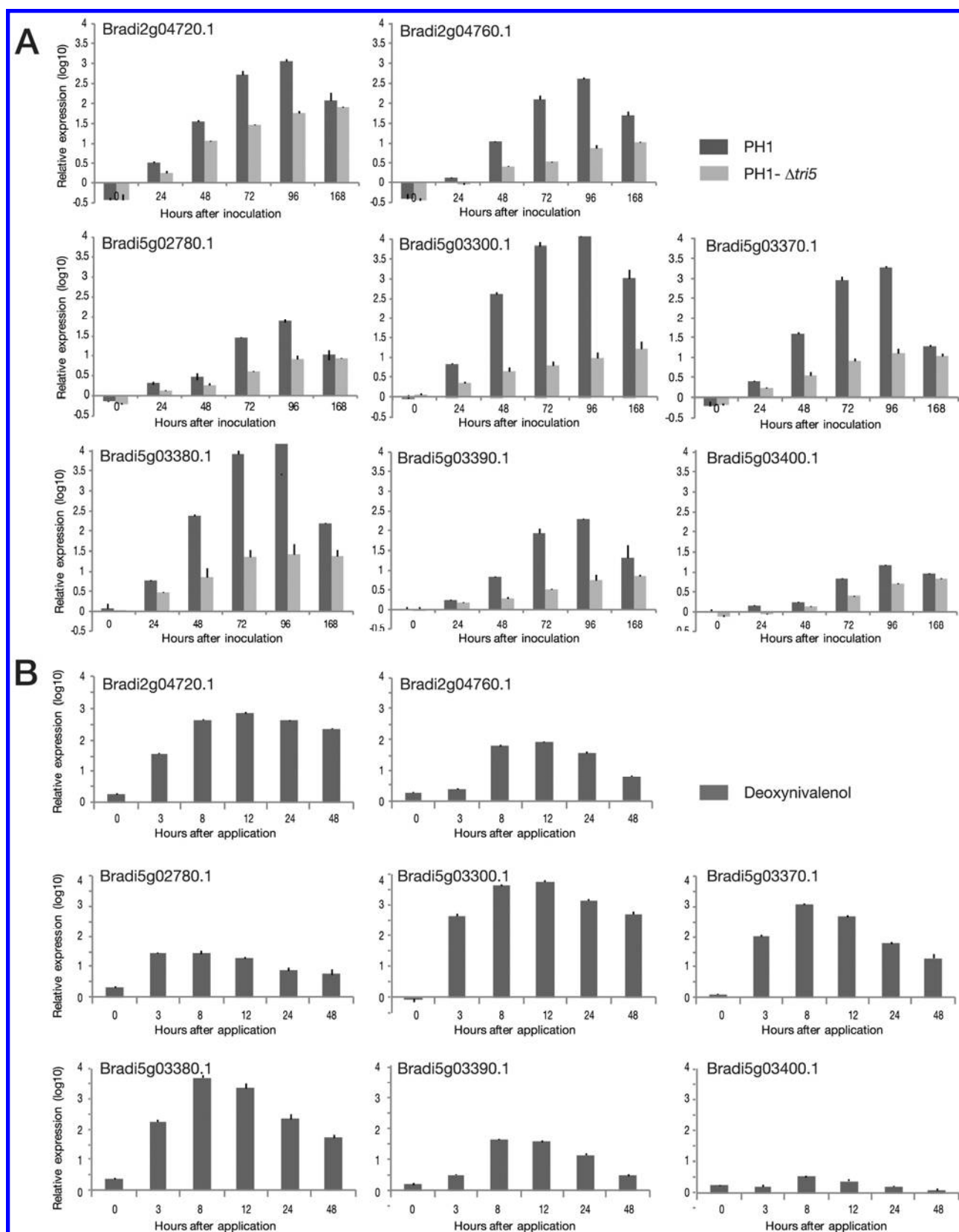


Fig. 2. Induction of *Brachypodium distachyon* UDP-glycosyltransferase (UGT) genes by either **A**, *Fusarium graminearum* wild-type strain PH-1 and the $\Delta tri5$ -mutant MU102, which has lost the ability to produce deoxynivalenol (DON); or **B**, treatment with DON.

single insertion event in an ancestral monocot gene. Orthologous genes to these *B. distachyon* UGT genes in *A. thaliana* also harbor a conserved intron but at a different position (at approximately 279 bp) (Paquette et al. 2003). The *B. distachyon* UGT genes of clade L1 located on chromosomes 4 and 5 share an ancestral intron (starting approximately 680 bp downstream of the ATG) and apparently a second, more recent insertion event occurred in a subclade on chromosome 5. All other introns are, in most cases, present in only one single gene. A detailed comparison of intron positions and phases of *B. distachyon* UGT is given in Supplementary Table S3.

Genes encoding enzymes conferring the ability to inactivate toxins may be under positive selection to allow adaptation to new pathogens. The sesquiterpenoid toxins of the class of trichothecenes, which are produced mainly by plant-pathogenic fungi, are highly diverse; at least 217 naturally occurring compounds have been described (Grovey 2007). *F. graminearum*, for instance, may produce either DON or the structurally similar nivalenol, which has one additional hydroxyl group at carbon four. Despite this similarity, the *A. thaliana* UGT73C5 is unable to inactivate nivalenol. The C-terminal domain of UGT required for binding the co-substrate UDP-sugar (UDP-glucose in most cases) might evolve at a much slower pace than N-terminal domains responsible for specific interaction with the substrate. To investigate whether there is evidence for selective pressure in UGT gene families, we calculated ω , the ratio of nonsynonymous (dN) to synonymous (dS) nucleotide changes for alignments of individual domains and also single-codon sites, taking into account potential false-positive interferences as a result of recombination. None of the groups of UGT domains showed a dN/dS ratio higher than 1—the commonly used threshold for positive selection. N termini (average $\omega = 0.242$) and C termini (average $\omega = 0.245$) exhibited a similarly conserved pattern, which was also true for the average ω calculated for the conserved signature PSPG motif ($\omega = 0.16$). The only exception was clade L2, for which ω of the N-terminal domain (0.54) was approximately 2.6-fold higher than ω of the C-terminal domain. However, no single-codon sites under positive selection have been identified for L2. In contrast, clades B, H, E2, and especially D2 harbor up to seven sites under positive selection (Supplementary Table S4). Neither clade L1, which contains genes most similar to *HvUGT13248*, nor clade D1, containing genes most similar to *AtUGT73C5* (*DOG1*), showed signs of diversifying selection.

***B. distachyon* homologs to the *A. thaliana* DON-UGT *AtUGT73C5* (*DOG1*) are responsive to DON but their products do not inactivate the toxin.**

The close relatedness of *B. distachyon* to cereal crop species should allow us to gain insights into the evolutionary history of candidate genes based on the phylogeny. We identified *B. distachyon* orthologous gene clusters to the *F. graminearum*/DON-responsive UGT from barley and wheat that have been functionally characterized (Schweiger et al. 2010) by adding the protein sequences encoded by these genes to the combined *A. thaliana*/*B. distachyon* UGT phylogeny (Fig. 1; *HvUGT5876*, *HvUGT13248*, *HvUGT19290*, *HvUGT14077*, and *TaUGT3*). In all cases, the cereal UGT are interspersed within *B. distachyon* clades, reflecting the expected more distant relationship to the dicot *A. thaliana*.

The gene products of *TaUGT3* and *HvUGT5876*, which are both induced by DON (Gardiner et al. 2010; Lulin et al. 2010) but lack the ability to conjugate the toxin (Schweiger et al., 2010), are closely related to *B. distachyon* clade D1 and, thus, are putative orthologs. The closest homologous group in *A. thaliana* is cluster 73C (with average sequence identities between 36.4 and 42%) containing the DON-inducible and DON-

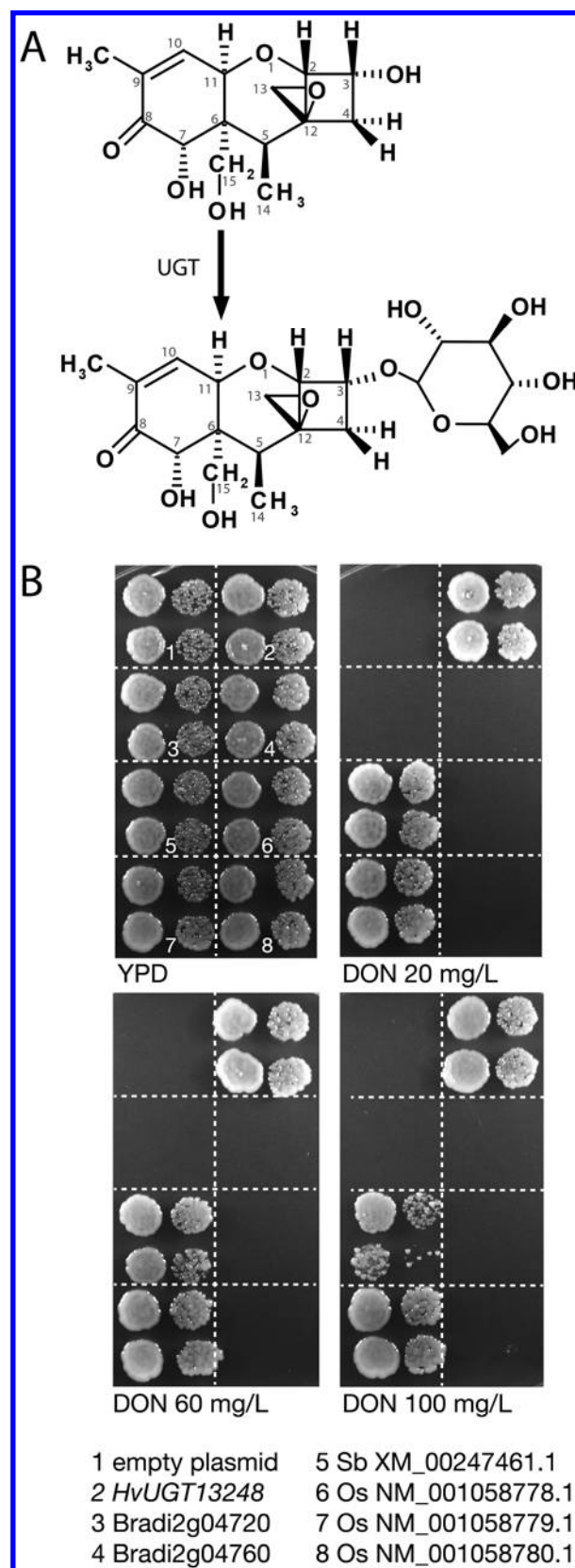


Fig. 3. A, UDP-glucosyltransferase (UGT) activity catalyzes the transfer of glucose from UDP-glucose to the 3-OH position of deoxynivalenol (DON), forming DON-3-O-glucoside. **B**, Spotting of independent yeast transformants expressing *Brachypodium distachyon* UGT homologous to the DON-inactivating *AtUGT73C5* (3 and 4), and UGT syntenous to the *B. distachyon* UGT family L1 of sorghum (5) and rice (6–8) on plates containing increasing concentrations of DON. Strains harboring the empty plasmid (1) or expressing the previously reported UGT from barley with the ability to inactivate DON (2, *HvUGT13248*) were used as controls.

inactivating UGT AtUGT73C4 and AtUGT73C5 (Poppenberger et al. 2003; Schweiger et al. 2010). Clade D1 in *B. distachyon* comprises four genes: Bradi2g04720.1, Bradi2g04747.1, Bradi2g04760.1, and Bradi2g04700.1 (Table 1). These genes are located on chromosome 2 and share a common intron. With the exception of the more distantly related Bradi2g04700.1 (maximum sequence identity 36.1%), the UGT show a high level of amino acid sequence similarity (at least 80% identity, ClustalW) within the *B. distachyon* group and also with the barley and wheat UGT HvUGT5876 and TaUGT3. Yet, Bradi2g04747.1 seems to be a nonfunctional gene. The gene model predicts an additional intron to maintain the ORF, leading to a shorter UGT, which lacks an internal stretch of 56 amino acids compared with other UGT in the family. Therefore, we focused on the two remaining UGT most similar to AtUGT73C5, HvUGT5876 and TaUGT3. We performed quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) for Bradi2g04720.1 and Bradi2g04760.1 to test whether these genes showed a response to *F. graminearum* stress or DON application similar to that of the reported barley gene and the wheat gene, which has only been tested regarding its inducibility by DON. We inoculated single spikes of *B. distachyon* ecotype Bd21 plants with *F. graminearum* strains PH-1 (wild type, DON-producer) and MU102, a $\Delta tri5$ mutant lacking the ability to produce DON (Cuzick et al. 2008). Both UGT genes were highly expressed in response to either *F. graminearum* strain but inoculation with the DON-producing wild-type strain led to a much higher transcript accumulation (Fig. 2A). We found transcripts corresponding to Bradi2g04720.1 approximately 20-fold and Bradi2g04760.1 approximately 52-fold more abundant at 96 h after inoculation (hai) in samples treated with PH-1, compared with samples inoculated with the DON-deficient mutant MU102.

In a separate experiment, we treated plants with 2 μg of DON per spikelet. This led to highly elevated transcript levels compared with mock-treated samples. At 12 hai, Bradi2g04720.1 was 700-fold more abundant and Bradi2g04760.1 more than 80-fold (Fig. 2B).

In an effort to test whether these *Brachypodium* genes would be able to form the detoxification product D3G (Fig. 3A), we cloned and expressed the cDNAs of both genes in the toxin-sensitive *Saccharomyces cerevisiae* strain YZGA515. The expression cassette of the yeast plasmid contains a strong constitutive *ADH1* promoter with an N-terminal c-Myc epitope tag in frame with the cDNA insert (Schweiger et al. 2010). The DON-sensitive yeast strain YZGA515 (relevant genotype: *pdr5*

pdr10 pdr15 ayt1) was transformed and biological replicates were spotted on yeast peptone dextrose (YPD) plates containing increasing amounts of DON. Presence of both UGT gene products could be confirmed by immunodetection of the c-Myc tag (Supplementary Fig. S3). Neither of the strains developed a resistant phenotype even on low concentrations of DON as compared with the control strain harboring only the empty plasmid (Fig. 3B).

Two *B. distachyon* UGT similar to HvUGT13248 inactivate DON by formation of D3G.

The DON-inactivating barley UGT HvUGT13248 clusters with a family of six UGT within *B. distachyon* clade L1 (Fig. 1). This gene family comprises Bradi5g02780.1, Bradi5g03300.1, Bradi5g03370.1, Bradi5g03380.1, Bradi5g03390.1, and Bradi5g03400.1 (Table 1). The genes form a cluster on chromosome 5 with a core region of 60 kb, with the exception of Bradi5g03400.1, which is located approximately 800 kb upstream of this region (Fig. 4). Members of the gene cluster share 51.6 to 83.3% amino-acid sequence identity. The gene products with the highest similarity to HvUGT13248 are Bradi5g03300.1 and Bradi5g03390.1, with 71.6 and 71.8% amino acid sequence identity, respectively (Fig. 5A). All UGT genes in the cluster contain two introns separating an N-terminal 684-bp exon from two C-terminal exons of 385- and 334-bp average lengths. The annotation for Bradi5g03400.1 predicts an additional 179-bp exon at the N terminus of the protein and also a 5' truncated exon 3, when compared with the respective exons 2 of the other family members. The missing homologous fragment of 219 bp in length is found in the 5' intronic sequence. Available expressed sequence tag data are inconsistent as to the reliability of this gene model. However, no in-frame splice site consensus sequences exist in the region that would support an alternative gene model. The cluster furthermore harbors two UGT pseudogenes (Bradi5g03310.1 and Bradi5g03320.1), which are remnants of the N- and C-terminal part of a UGT gene that has been disrupted by an insertion event.

In qRT-PCR experiments, all six UGT showed a moderate to high response to DON and were more responsive to wild-type PH-1 than to the DON-minus *tri5* mutant strain MU102 (Fig. 2A and B). The lowest expression changes were observed for Bradi5g03400.1. As shown before for the *AtUGT73C5* orthologous BdUGT genes, the highest transcript abundances in response to *F. graminearum* infection for all investigated genes were observed 96 hai. Bradi5g03300.1 was induced 1,100-fold,

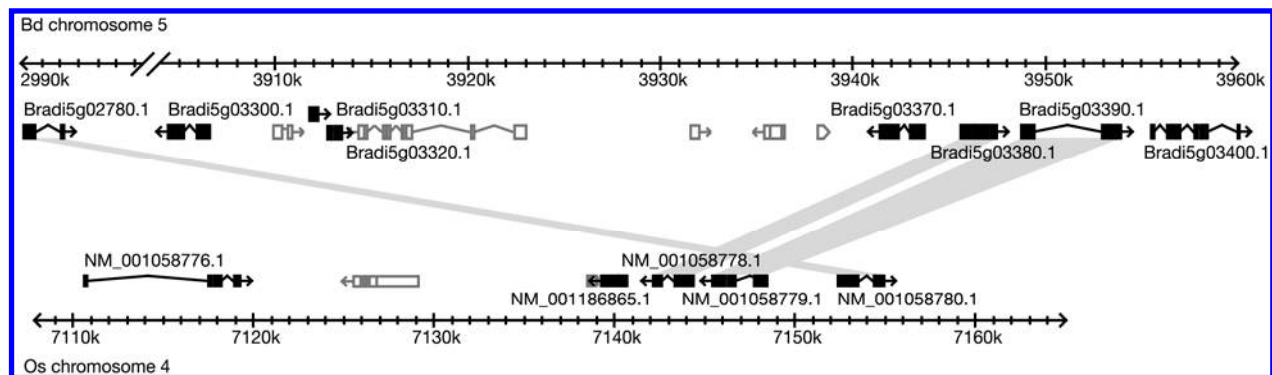


Fig. 4. Comparative genomic organization of the deoxynivalenol (DON) or *Fusarium graminearum*-responsive *Brachypodium distachyon* UDP-glycosyltransferase (UGT) gene cluster with the syntenous gene family in rice. Top row illustrates a region of chromosome 5 of *B. distachyon* harboring UGT genes Bradi5g02780.1, Bradi5g03300.1, Bradi5g03370.1, Bradi5g03380.1, Bradi5g03390.1, and Bradi5g03400.1. The two putative pseudogenes Bradi5g03310.1 and Bradi5g03320.1 are also indicated. Bottom row represents the syntenous gene region on chromosome 4 of rice, including five UGT gene models. The putative ortholog of Bradi5g02780.1 is NM_001058780.1 (78.0% identity). Bradi5g03380.1 is related to NM_001058778.1 (74.7%), and Bradi5g03390.1 to NM_001058779.1 (68.9%, ClustalW protein alignment). All annotated UGT gene models are denominated and represented in black. Gene models encoding for genes other than UGT are shaded in gray. Bars linking single gene loci across species indicate the putative orthologous pairs.

Bradi5g03370.1 150-fold, and Bradi5g03380.1 560-fold. Dramatic changes were also observed after DON treatment, with the highest ratios between DON and mock treatment at 8 or 12 hai. Bradi5g02780.1 had the highest increase in transcript abundance at the earlier time point (3 hai, 28-fold induction).

For functional testing by heterologous expression in yeast, the coding sequences of all six paralogous genes in clade L1 were recoded for optimal expression in yeast, custom synthesized, and transformed into strain YZGA515. The spotting assays showed that two of the six UGT tested conferred higher resistance to DON compared with strains containing only the empty vector control (Fig. 5B). Transformants expressing Bradi5g03300.1 conferred a high level of resistance, similar to that of the positive controls expressing *HvUGT13248* or *DOG1*, whereas transformants expressing Bradi5g02780.1 could only grow on plates containing DON at 40 mg/liter or less. Again, presence of UGT proteins was confirmed by immunodetection.

To confirm that resistance is caused by the ability of both *B. distachyon* UGT to convert DON into D3G, liquid cultures of strains expressing either gene or *HvUGT13248* as a positive control were incubated with DON at 500 mg/liter. Samples of culture supernatants taken at different time points were examined using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), as previously described (Berthiller et al. 2009). Strains expressing Bradi5g03300.1 and *HvUGT13248* accumulated intracellular D3G at similar amounts (average of 701 and 641 µg/liter, respectively, after 24 h of incubation) (Supplementary Fig. S4). The majority of the D3G was already formed after 8 h of incubation. Transformants expressing Bradi5g02780.1 were also able to produce D3G, yet the glucoside was only detected after 16 and 24 h of incubation and the D3G levels were lower (535 µg/liter in average) at the end point of 24 h of incubation.

Synteny of the *B. distachyon* UGT cluster to rice and sorghum.

To estimate the extent to which this gene family has evolved differently in other related grass species, we searched for homologous loci to the six *B. distachyon* genes using CrowsNest—a comparative mapviewer hosted by MIPS. The analysis is based on transcript annotation of rice and *B. distachyon* derived from the MIPS PlantsDB. We identified a syntenic region comprising a cluster of five UGT genes on chromosome 4 of rice (Fig. 4). The core cluster is formed by four genes, three of which are most likely functional (NM_001058778.1, Os04g0206500; NM_001058779.1, Os04g0206600; and NM_001058780.1, Os04g0206700) plus a 374-amino-acid gene fragment (NM_001186865.1, Os04g0206450), which is C-terminally truncated and devoid of an initiation codon. Meanwhile, a hypothetical N-terminally truncated pseudogene now considered to be a genome assembly artifact, (NM_001058775.1, Os04g0205900) is removed from most databases.

The three rice UGT genes (NM_001058778.1, NM_001058779.1, and NM_001058780.1) exhibited a higher similarity to the *B. distachyon* homologs than to any of the rice paralogs, suggesting that these pairs form true orthologs. A similar analysis for *Sorghum bicolor* identified XM_002447461.1 (Sb06g002180) as the only putative orthologous gene. The sorghum gene as well as the three rice genes (NM_001058778.1, NM_001058779.1, and NM_001058780.1) were custom synthesized for expression in yeast and functionally tested with the yeast-spotting assay. We found that only one of the rice genes, NM_001058779.1 (short designation OsUGT79) and the sorghum gene conferred resistance to DON at a level similar to that of the barley *HvUGT13248* gene (Fig. 3B).

DISCUSSION

In this study, we have characterized the large gene family of *Brachypodium* small-molecule conjugating glycosyltransferases using bioinformatic tools. According to our analysis, the

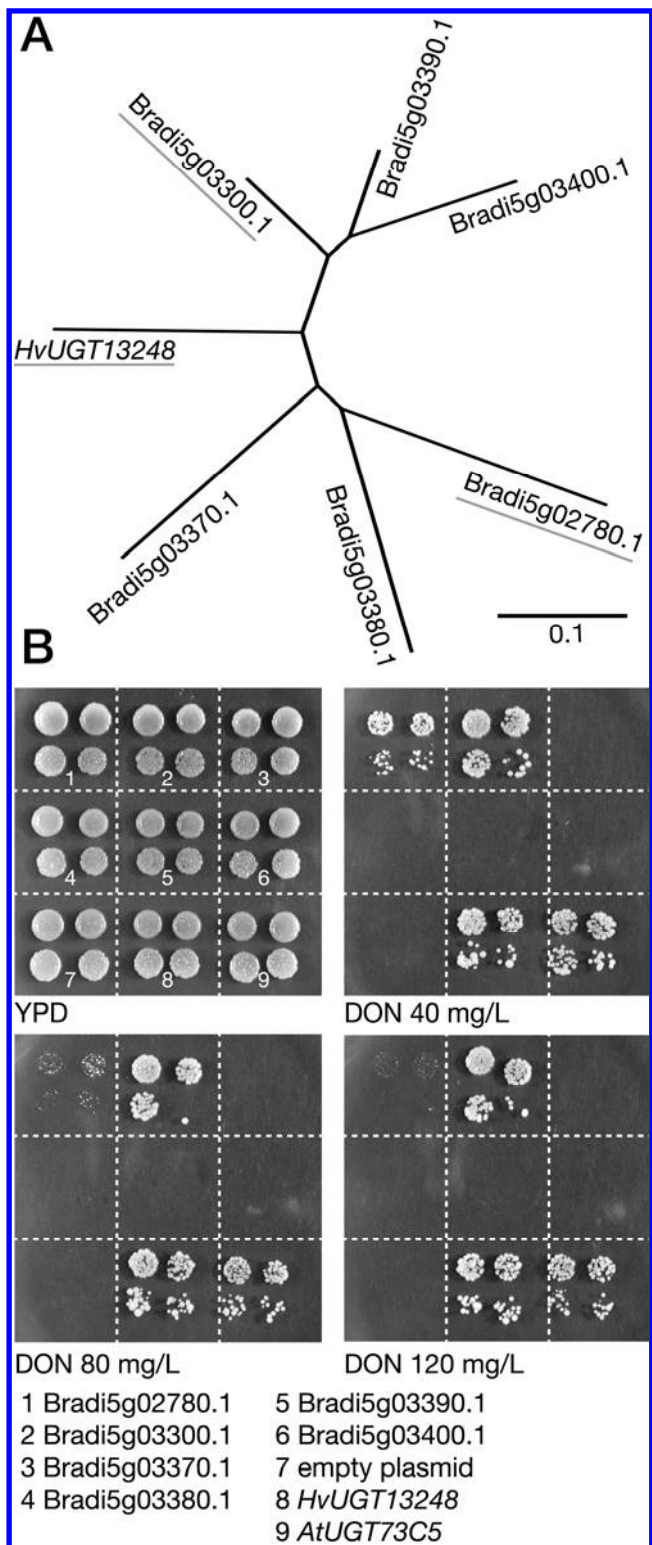


Fig. 5. A, Phylogenetic relationship of the deoxynivalenol (DON)-responsive *Brachypodium distachyon* UDP-glycosyltransferase (UGT) genes of clade L1 located on chromosome 5 (ClustalW protein alignment, neighbor-joining, 1,000× bootstrap). DON-inactivating UGT are underlined. **B**, Spotting of two individual yeast transformants expressing either of these genes or controls from barley (*HvUGT13248*), *Arabidopsis* (*AtUGT73C5*), or the empty vector on plates containing the indicated concentration of DON.

178 predicted gene models constituting this gene family include 159 genes with the capacity to encode proteins of the typical size characteristic for the known functional UGT. We excluded Bradi2g04747.1 from the functional analysis because it seemed to contain an internal deletion resulting in a protein, which is shorter than the other cluster members, but retained Bradi5g03400.1, although the gene model seemed suspicious because parts of the predicted intron contained sequences with similarity to coding sequences in closely related genes. Phylogenetic analyses identified 24 clades, 22 of which share a common ancestor with those previously identified in *A. thaliana*. Within common clades, sequences from the two species are well separated, revealing that sequence divergence occurred before speciation. We identified two *B. distachyon* clades that contain homologs of the DON-inactivating UGT from the dicot model plant *A. thaliana* (Poppenberger et al. 2003) or barley (Schweiger et al. 2010), respectively. All candidate genes tested showed in planta inducibility by DON and higher induction upon infection with a DON-producing wild-type *F. graminearum* than infection with a *tri5* mutant.

Despite the responsiveness to DON (Fig. 2), only two of the eight tested genes conferred DON resistance when tested by heterologous expression in yeast. The finding that none of the *B. distachyon* genes in clade D1 is able to detoxify DON is in line with the recent experiments performed with wheat and barley orthologs (Schweiger et al. 2010) as well as the corresponding rice candidate genes (Schweiger et al. 2011), all of which were unable to confer DON resistance. The *A. thaliana* DON-UGT AtUGT73C5 is the closest homolog to these genes, yet shares only approximately 40% sequence identity. A possible explanation for this observation is that ancestral monocot UGT of clade D1 have lost the ability to inactivate the toxin—a role that was taken over by a member of clade L1 and possibly other untested genes. Alternatively, these results could reflect independent evolution of the ability to detoxify DON in different plant species.

Sequence diversification in gene clusters maintaining DON inducibility but leading to loss of the ability to glycosylate DON in different members is obviously occurring: in the cluster carrying the six L1-type *B. distachyon* UGT on chromosome 5, only two confer DON resistance but all show DON inducibility. Yet, these genes are not simply alleles with a loss of function. Bradi5g02780.1, for instance, which confers resistance only to low levels of DON, results in high-level resistance to a different trichothecene toxin when expressed in yeast (W. Schweiger, unpublished data). Similarly, one of the DON-induced UGT from barley that is inactive on DON (Schweiger et al. 2010) can glycosylate another *F. graminearum* metabolite, which is structurally unrelated to trichothecenes (M. P. Kovalsky Paris, unpublished data). DON-induced transcription of genes lacking DON-detoxification capability might have a biological purpose, by priming defense against other unconsidered or unknown metabolites. It may also be biologically relevant that the *B. distachyon* gene Bradi5g03300.1 showing the highest and most rapid induction upon challenge with the fungus in this study confers resistance against the highest DON concentrations. In *A. thaliana*, genes clustering in clade L1, such as AtUGT74B1 and 74E2, have no known effect on DON but do have functions related to auxin-conjugation (indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid) (Grubb et al. 2004; Tognetti et al. 2010). Overexpression of members of the neighboring clade L2 also affects auxin homeostasis (AtUGT84B1) (Jackson et al. 2002). These data further reflect how substrate specificity of UGT is difficult to predict based only on phylogenetic-based homology. It remains a matter of speculation as to why the UGT detoxifying DON have very low basal expression levels. It is obvious that simultaneous overexpression of

many UGT in the same cell would be counterproductive, mainly because they would compete for the co-substrate which, in most cases of plant glycosyltransferases, is UDP-glucose. Due to the broad substrate-specificity of UGT, they would potentially conjugate other endogenous substrates: constitutive overexpression of *AtUGT73C5* leads to glycosylation of brassinosteroids and, consequently, to dwarfing (Poppenberger et al. 2005). However, this is not the case for *A. thaliana* plants overexpressing *HvUGT13248*, which show high-level DON resistance without displaying unwanted side effects regarding plant anatomy (Shin et al. 2012). Nevertheless, tissue-specific and developmental regulation of expression might be crucial to diminish interference with endogenous metabolites, especially growth hormones and defense signal molecules such as salicylic acid (e.g., AtUGT74F1 in clade L1) (Song et al. 2008). It is conceivable that gene products with an original role in plant secondary metabolism have some side activity providing a low level of resistance against a new microbial toxin. The simplest way to increase the detoxification capability would be amplification of such a gene, followed by sequence diversification and functional specialization of cluster members.

In analogy to the leucine-rich repeat (LRR) disease-resistance gene clusters, which show diversifying selection in the domain, presumably interacting with the rapidly changing effector protein repertoire of pathogens (Meyers et al. 1998), one would expect that diversifying selection might also be detected in UGT that interact with “small-molecule effectors” of plant pathogens. In the case of UGT, the C-terminal part containing the sugar-co-substrate binding domain is more conserved, whereas the N-terminal part is mainly responsible for substrate binding, as revealed by hybrid proteins (Osmani et al. 2009; Schweiger et al. 2010). If UGT gene cluster members are under diversifying selection, one would expect to observe differences in the rate of synonymous to nonsynonymous changes. From our results, we conclude that this scenario is rather unlikely in some clusters. No evidence for diversifying selection was found in the L1 gene cluster containing the DON-detoxification genes. Therefore, the interaction of grasses with trichothecenes seems to be a case of trench warfare (Friedman and Baker 2007; Theis and Stahl 2004), predating speciation in cereals and *F. graminearum* (Ward et al. 2002), rather than of a rapid arms race with massive changes in the toxin spectrum.

Like the nucleotide-binding site LRR disease-resistance genes, the UGT seem to undergo rapid changes in copy number. In the case of the genes most similar to *HvUGT13248*, we found six homologous candidate genes in *B. distachyon* and three genes and one gene in the corresponding syntenic regions of rice and *S. bicolor*, respectively. Gene copy-number variation has also been observed for other grass gene families such as the prolamine genes, where evidence for gene birth by insertion of copies in other chromosomal regions, formation of clusters by tandem duplications, and gene death by unequal crossing over and truncation by insertion events were also reported (Xu et al. 2012). Such deletions of genes may be without consequences as long as functional copies remain in the genome. Therefore, which of the paralogous genes of a cluster remains active (or loses this function and gains others) may be largely unpredictable, especially in genomes of allopolyploid plants such as hexaploid wheat. Large gene families also seem to be prone to genome asymmetries, where orthologous genes are located in different chromosomal positions in different cultivars (Ding et al. 2007). It has been proposed that the region spanning the *Fhb1* locus should contain a UGT-inactivating DON (or a regulator) (Lemmens et al. 2005). No small-molecule UGT was found in the sequenced region of the susceptible ‘Chinese Spring’ (Choulet et al. 2010). It remains

to be determined whether the corresponding region in resistant cultivars contains one or several UGT genes.

As shown for the animal chemosensory receptors, the number of genes encoding functional receptors and the number of pseudogenes vary enormously between genomes of different animals. Genomic drift generating copy-number variation by gene duplication and inactivation seems to be important for evolution of chemosensation (Nei et al. 2008). The situation with UGT in plants might be similar. Assuming that the endogenous secondary metabolism in plants is the main force driving the evolution of UGT, large species differences can be expected. Gene families that are rapidly evolving such as the terpene synthases (Chen et al. 2011) and, especially, the cytochrome P450 (Nelson and Werck-Reichhart 2011) will create a challenge for plants to also evolve UGT conjugating new metabolites to prevent self toxicity. In the case of rice and *B. distachyon*, the CYP gene numbers are 329 and 226, respectively. Some families are expanding more rapidly than others: in the CYP71 gene family, 190 genes are present in rice and 113 in *B. distachyon*, with only less than 20% seemingly orthologous genes. The differences in the metabolome that are expected to be caused by this difference in cytochrome P450 repertoire should also have an impact on the evolution of the UGT gene family, most likely to a much higher extent than xenobiotics such as the *F. graminearum* toxins.

In conclusion, this study has identified a UGT gene family in monocotyledonous species, which contains genes that encode the ability to metabolize the *Fusarium* toxin DON. Although all of these genes are induced by the toxin, only two of the six genes in this gene family conjugate DON to D3G. Potentially, other DON-responsive genes could accept related xenobiotics as substrates, which induce a similar response in gene expression. We show that not necessarily the closest homologs share the same substrate specificity. However, the proposed function of UGT can be easily tested by heterologous expression in yeast.

MATERIALS AND METHODS

Cloning and heterologous expression of UGT genes in yeast.

Coding sequences of *B. distachyon* UGT genes Bradi5g-02780.1, Bradi5g03300.1, Bradi5g03370.1, Bradi5g03380.1, Bradi5g03390.1, and Bradi5g03400.1 predicted by the MIPS Brachyopodium database; the *O. sativa* UGT NM_001058778.1, NM_001058779.1, and NM_001058780.1; and the *S. bicolor* UGT XM_002447461.1 were optimized for expression in *Saccharomyces cerevisiae* by reverse translating the amino acid sequence utilizing the codon usage table for *S. cerevisiae* (according to codon tables provided by the Kazusa DNA Research Institute). Codon optimized genes were custom synthesized (*B. distachyon* UGT: MrGene, Regensburg, Germany, now Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.; and rice or sorghum UGT: Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany), including flanking 5' *Hind*III and 3' *Not*I restriction sites (Supplementary Table S5). ORF were cloned into the *Hind*III/*Not*I cloning sites of yeast expression vector pYAK7 in frame behind the N-terminal c-Myc epitope tag (2 μ -*P*_{ADHI}-*C-Myc-MCS-T*_{ADHI}, *LEU2*) (Poppenberger et al. 2003). Yeast strain YZGA515 was transformed with each of the constructs and additionally with the previously reported DON-UGT genes *DOG1* (pBP868) (Poppenberger et al. 2003) and *HvUGT13248* (pWS1921) (Schweiger et al. 2010) in the same vector backgrounds as positive controls. As a negative control, we transformed YZGA515 with the empty pYAK7 plasmid pBP910. Transformants were selected on synthetic complete medium lacking leucine. Bd2g04720.1 and Bd2g04760.1 were PCR amplified from *B. distachyon* cDNA using primers that

extended the PCR product at both ends with approximately 50 bp of sequence identical to the region flanking the multiple cloning site of pYAK7. The plasmids were generated by homologous recombination in vivo. Strain YZGA515 was transformed with a *Not*I-linearized pYAK7-derived vector (200 ng, pGW1013), which harbors the yeast *sup4-o* gene in the multiple cloning site together with each fragment in equimolar amounts or higher ratios (1:1, 1:2, 1:10, and 1:40). The recombinant plasmids were recovered from yeast and the correct recombination event was confirmed by restriction digest of the isolated plasmids. The presence of the transfer (t)RNA suppressor allowed phenotypic selection of strains harboring successful recombination events directly on the transformation plate. If the amber suppressor tRNA was not removed by the recombination event, the *ade2-101* allele present in the yeast host was suppressed by *sup4-o* and white colonies were formed. The *sup4-o* in the high-copy plasmid is toxic for yeast, leading to a small number of transformants yielding small white colonies, whereas large red colonies were formed if the desired recombination event replaced the *sup4-o* insert. A list of the constructs and the corresponding primers is given in Supplementary Table S6. Immunodetection was conducted using a primary mouse anti-c-Myc antibody (1:5000, clone 9E10; Invitrogen) and a horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-mouse antibody (Jackson, West Grove, PA, U.S.A.). The SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate was used for signal detection (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.).

Phenotypic testing and feeding experiments.

Crystallized DON was dissolved in water to a stock concentration of 10 g/liter. YPD plates containing different amounts of DON were used to spot dilutions of individual transformants expressing either UGT or vector controls. For this purpose, freshly transformed strains were grown in synthetic complete media lacking leucine to exponential phase (optical density at 600 nm [OD₆₀₀] of 0.7) and diluted to OD₆₀₀ of 0.05 and 0.01 with fresh selective medium. Cell suspensions (3 μ l) were spotted onto plates and incubated at 30°C for 3 days.

Strains conferring resistance to DON in the plate assay were again cultivated in larger volumes of liquid selective media in five biological replicates. Cells were harvested in exponential phase and washed repeatedly in fresh medium. For each sample 5 ml of cell suspension with an OD₆₀₀ of 4 was incubated at 30°C with DON at 200 mg/liter. DON concentration was raised to 350 mg/liter after 1 h and to a final concentration of 500 mg/liter 2 h after the start of the experiment. In total, 400 μ l was collected by centrifugation 8, 16, and 24 h after the first DON addition. Cells were washed twice with ice-cold distilled water and extracted by adding 1.25 ml of a 4°C methanol/H₂O (4:1, vol/vol) mix. Samples were frozen at -80°C for 15 min and sonicated on ice for 15 min. After centrifugation, both the supernatant and 500 μ l of the extract were stored at -20°C. For HPLC/MS-MS analysis, thawed samples were diluted with 10% aqueous methanol. The intra- and extracellular contents of DON and D3G were measured as described by Berthiller and associates (2009) using electrospray negative ionization on a 4000 QTrap HPLC/MS-MS system (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.).

Plant growth conditions.

B. distachyon ecotype Bd21 was cultivated in a growth chamber under a 20-h light period at 23 \pm 2°C under fluorescent light (265 μ E m⁻² s⁻¹ at the soil level and approximately 315 μ E m⁻² s⁻¹ at the spike level). Prior to sowing, seed were surface sterilized by incubation in a 0.6% sodium hypochlorite solution for 10 min with gentle shaking, followed by three rinses in sterile distilled water. Sterilized seed were subse-

quently incubated for 5 days at 4°C in the dark. Plants were grown routinely on a 3:1 mixture of compost (Tref terreau P1; Jiffy France SARL, Trevoux, France) and standard perlite (Sinclair, Gainsborough, UK), soaked with an aqueous solution containing a carbamate fungicide (Previcur at 2 ml/liter; Bayer Crop Sciences, Lyon, France) and a larvicide (Hortigard at 1 g/liter; Syngenta France, Guyancourt, France). Plants were usually watered at 2- to 3-day intervals using a standard nutritional solution and were never allowed to stand in water.

***F. graminearum* strain maintenance and spore production.**

F. graminearum strains PH-1 and *Δtri5* (MU102 mutant strain) (Cuzick et al. 2008) were maintained on potato dextrose agar (PDA) plates. To obtain spores, 2- to 4-mm² plugs from 15-day-old PDA plates were inoculated in liquid mung bean medium (10 plugs for 20 ml) (Bai and Shaner 1996) and incubated at 150 rpm at room temperature for 5 to 6 days. The resulting spore suspension was then diluted 10 times in fresh liquid mung bean medium and further incubated for five to six additional days under the same conditions. For pathogenicity assays, spores were further filtrated onto sterile Miracloth (Calbiochem, Toulouse, France) and resuspended in 0.01% Tween 20 at a final concentration of 10⁵ spores/ml.

Pathogenicity assays and DON application.

Inoculation was performed by pipetting 300 spores (3 μl of a 10⁵ spores/ml suspension) into a central floral cavity of the second spikelet starting from the top of the spike of Bd21 plants at mid-anthesis (approximately 30 to 35 days after sowing). A single spike was inoculated per plant to further guarantee the independence of the samples. Inoculated plants were covered with clear plastic bags sprayed with distilled water beforehand. For the first 24 h, inoculated heads were kept in the dark, then incubated with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness at 20°C with light intensities similar to those used for plant development (discussed above). Similarly, DON was applied as an acetonitrile solution (2 μg/cavity) and plants were incubated as after fungal inoculation, except that they were placed directly in light or dark conditions. Applications of 0.01% Tween 20 or acetonitrile were performed as control conditions for fungal infection or DON treatment, respectively.

RNA extraction.

Three experimental repetitions were performed, differentiated by different sowing dates. In each experimental repetition, up to six inoculated spikelets per time point were collected at 0, 3, 8, 12, 24, and 48 h after DON application or at 0, 24, 48, 72, 96, and 168 h after fungal inoculation (PH-1 or *Δtri5* strain). Spikelets originated from independent plants and were pooled for RNA extraction. For each sample, spikelets were ground in liquid nitrogen and total RNA was extracted from 0.1 g of the resulting powder using TRIzol (Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France) followed by an RNase-free DNase I step (Ambion; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturers' instructions. Total RNA was further purified using the NucleoSpin RNA Clean-up XS kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

Real-time PCR.

cDNA synthesis was performed on 1 μg of total RNA using the ImProm-II reverse-transcription system (Promega France, Melun-les-Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. The resulting product was diluted 10 times in nuclease-free water. Primers were designed to amplify 10 gene transcripts, including two reference genes Bradi4g00660 (*UBC18*) and Bradi4g41850 (*ACT7*, now referred to as *ACT3*-like under accession number XM_003578821 in the nucleotide

National Center for Biotechnology Information database) as previously determined by Hong and associates (2008) (Supplementary Table S7). qPCR reactions were performed on 2 μl of the diluted cDNA product using 800 pmoles of each specific primer and 10 μl of SYBRGreen Master Mix in a final volume of 20 μl. Reactions were performed in a Light Cycler LC480 Real-time PCR system (Roche Diagnostics, Meylan, France). All qRT-PCR reactions were carried out on biological triplicates, each in technical duplicate. The final threshold cycle (Ct) values were the mean of six values (biological triplicates, each with technical duplicate). The comparative $\Delta\Delta C_t$ method was used to evaluate the relative quantities of each amplified product in the samples. The Ct was automatically determined for each reaction by the Light Cycler LC480 Real-time PCR system set with default parameters. The specificity of the qRT-PCR reactions was determined by melt curve analysis of the amplified products using the standard method installed in the system.

dN/dS-analysis.

To identify positively selected sites, homologous *B. distachyon* UGT were grouped based on the clusters identified via the phylogenetic comparison with *A. thaliana*. Gap-free codon alignments were generated using PAL2NAL (Suyama et al. 2006). In a prior analysis, we screened for possible recombination breakpoints that were taken into account in subsequent analyses (GARD algorithm) Kosakovsky Pond et al. 2006). Alignments of full-length genes and N- and C-terminal regions (each taking into account the terminal 250 amino acids) were first analyzed using PARRIS (Scheffler et al. 2006). Single sites under positive selection were identified using the SLAC/REL and FEL-algorithms (Kosakovsky Pond et al. 2005), which are all part of the computational phylogenetics software package HyPhy provided by the School of Medicine of the University of California, San Diego (Delpont et al. 2010; Pond et al. 2005). Codon positions with a dN/dS-ratio of 1 or higher identified with at least one of the applied algorithms were considered under positive selection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Austrian Science Fund (FWF) special research project F37, the Ministère de l'Éducation Supérieure et de la Recherche, and the Université Paris-Sud. We thank M. Urban for supplying the *F. graminearum* MU102 mutant strain; and A. Haynes and P. Mackenzie from the Department of Clinical Pharmacology, Flinders University, Adelaide, Australia for generating systematic names of the *B. distachyon* UGT gene family.

LITERATURE CITED

- Bai, G.-H., and Shaner, G. 1996. Variation in *F. graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Dis.* 80:975-979.
- Bai, G. H., Desjardins, A. E., and Plattner, R. D. 2002. Deoxynivalenol-nonproducing *F. graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153:91-98.
- Berthiller, F., Dall'asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., Adam, G., and Schuhmacher, R. 2009. Occurrence of deoxynivalenol and its 3-beta-D-glucoside in wheat and maize. *Food Addit. Contam. A* 26:507-511.
- Boddu, J., Cho, S., Kruger, W. M., and Muehlbauer, G. J. 2006. Transcriptome analysis of the barley-*F. graminearum* interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:407-417.
- Boddu, J., Cho, S., and Muehlbauer, G. J. 2007. Transcriptome analysis of trichothecene-induced gene expression in barley. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1364-1375.
- Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E.-K., and Poppenberger, B. 2005. Glycosyltransferases: Managers of small molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:254-263.
- Buerstmayr, H., Lemmens, M., Hartl, L., Doldi, L., Steiner, B., Stierschneider, M., and Ruckebauer, P. 2002. Molecular mapping of

- QTLs for *F. graminearum* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). *Theor. Appl. Genet.* 104:84-91.
- Buerstmayr, H., Ban, T., and Anderson, J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *F. graminearum* head blight resistance in wheat: A review. *Plant Breed.* 128:1-26.
- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., and Pichersky, E. 2011. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* 66:212-229.
- Choulet, F., Wicker, T., Rustenholz, C., Paux, E., Salse, J., Leroy, P., Schlub, S., Le Paslier, M.-C., Magdelenat, G., Gonthier, C., Couloux, A., Budak, H., Breen, J., Pumphrey, M., Liu, S., Kong, X., Jia, J., Gut, M., Brunel, D., Anderson, J. A., Gill, B. S., Appels, R., Keller, B., and Feuillet, C. 2010. Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *Plant Cell* 22:1686-1701.
- Christ, D. S., Märkländer, B., and Varelmann, M. 2011. Characterization and mycotoxigenic potential of *F. graminearum* species in freshly harvested and stored sugar beet in Europe. *Phytopathology* 101:1330-1337.
- Cundliffe, E., and Davies, J. E. 1977. Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:491-499.
- Cuomo, C. A., Güldener, U., Xu, J.-R., Trail, F., Turgeon, B. G., Di Pietro, A., Walton, J. D., Ma, L.-J., Baker, S. E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.-L., Decaprio, D., Gale, L. R., Gnerre, S., Goswami, R. S., Hammond-Kosack, K., Harris, L. J., Hilburn, K., Kennell, J. C., Kroken, S., Magnuson, J. K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.-W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Münsterkötter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Ouellet, T., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, M. I. G., Seong, K.-Y., Tetko, I. V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T. J., Yao, J., Birren, B. W., and Kistler, H. C. 2007. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317:1400-1402.
- Cuzick, A., Urban, M., and Hammond-Kosack, K. 2008. *F. graminearum* gene deletion mutants *map1* and *tri5* reveal similarities and differences in the pathogenicity requirements to cause disease on *Arabidopsis* and wheat floral tissue. *New Phytol.* 177:990-1000.
- DeBolt, S., Scheible, W.-R., Schrick, K., Auer, M., Beisson, F., Bischoff, V., Bouvier-Navé, P., Carroll, A., Hematy, K., Li, Yonghua., Milne, J., Nair, M., Schaller, H., Zemla, M., and Somerville, C. 2009. Mutations in UDP-glucose:sterol glucosyltransferase in *Arabidopsis* cause transparent testa phenotype and suberization defect in seeds. *Plant Physiol.* 151:78-87.
- Delgado, J. A., Schwarz, P. B., Gillespie, J., Rivera-Varas, V. V., and Secor, G. A. 2010. Trichothecene mycotoxins associated with potato dry rot caused by *F. graminearum*. *Phytopathology* 100:290-296.
- Delpont, W., Poon, A. F. Y., Frost, S. D. W., and Kosakovsky Pond, S. L. 2010. Datamonkey 2010: A suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26:2455-2457.
- Desmond, O. J., Manners, J. M., Schenk, P. M., Maclean, D. J., and Kazan, K. 2008. Gene expression analysis of the wheat response to infection by *Fusarium pseudograminearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73:40-47.
- Ding, J., Araki, H., Wang, Q., Zhang, P., Yang, S., Chen, J.-Q., and Tian, D. 2007. Highly asymmetric rice genomes. *BMC Genomics* 8:154.
- European Commission. 1999. Opinion on *F. graminearum* toxins Part 1: Deoxynivalenol (DON) Terms of reference. Off. J. Eur. Union Legislation SCF/CS/CNTM/MYC/19. Published online.
- European Commission. 2006. Commission recommendation (EC) no. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union Legislation 364:5-24.
- Friedman, A. R., and Baker, B. J. 2007. The evolution of resistance genes in multi-protein plant resistance systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17:493-499.
- Gachon, C. M. M., Langlois-Meurinne, M., and Saindrenan, P. 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: The emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* 10:542-549.
- Gardiner, S., Boddu, J., Berthiller, F., Hametner, C., Stupar, R. M., Adam, G., and Muehlbauer, G. J. 2010. Transcriptome analysis of the barley-deoxynivalenol interaction: Evidence for a role of glutathione in deoxynivalenol detoxification. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:962-976.
- Goswami, R. S., and Kistler, H. C. 2004. Heading for disaster: *F. graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5:515-525.
- Grovey, J. F. 2007. The trichothecenes and their biosynthesis. Pages 63-130 in: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. W. Herz, H. Falk, and G. W. Kirby, eds. Springer Vienna, Vienna.
- Grubb, C. D., Zipp, B. J., Ludwig-Müller, J., Masuno, M. N., Molinski, T. F., and Abel, S. 2004. *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J.* 40:893-908.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S., and Somers, D. J. 2012. Integrated metabolite-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (*Fhb1*) contributes to resistance against *F. graminearum*. *PLoS One* 7:e40695. Published online.
- Hansen, F. T., Sørensen, J. L., Giese, H., Sondergaard, T. E., and Frandsen, R. J. N. 2012. Quick guide to polyketide synthase and nonribosomal synthetase genes in *F. graminearum*. *Int. J. Food Microbiol.* 155:128-136.
- Hill-Ambroz, K., Webb, C. A., Matthews, A. R., Li, W., Gill, B. S., and Fellers, J. P. 2006. Expression analysis and physical mapping of a cDNA library of *F. graminearum* head blight infected wheat spikes. *Crop Sci.* 46:15-26.
- Hong, S.-Y., Seo, P. J., Yang, M.-S., Xiang, F., and Park, C.-M. 2008. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biol.* 8:112.
- Horevaji, P., Brown-Guedira, G., and Milus, E. A. 2012. Resistance in winter wheat lines to deoxynivalenol applied into florets at flowering stage and tolerance to phytotoxic effects on yield. *Plant Pathol.* 61:925-933. Published online.
- International Brachypodium Initiative. 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463:763-768.
- Jackson, R. G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G., and Bowles, D. J. 2002. Over-expression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: Phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J.* 32:573-583.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., and Maier, F. J. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:16892-16897.
- 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. *Mol. Plant Pathol.* 13:399-413.
- Kosakovsky Pond, S. L., and Frost, S. D. W. 2005. Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.* 22:1208-1222.
- Kosakovsky Pond, S. L., Posada, D., Gravenor, M. B., Woelk, C. H., and Frost, S. D. W. 2006. GARD: A genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22:3096-3108.
- Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterházy, A., Krška, R., and Ruckebauer, P. 2005. The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium graminearum* head blight resistance in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:1318-1324.
- Lulin, M., Yi, S., Aizhong, C., Zengjun, Q., Liping, X., Peidu, C., Dajun, L., and Xiu-E, W. 2010. Molecular cloning and characterization of an up-regulated UDP-glucosyltransferase gene induced by DON from *Triticum aestivum* L. cv. Wangshuibai. *Mol. Biol. Rep.* 37:785-795.
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalo, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F., and Nebert, D. W. 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7:255-269.
- Matsumoto, T., Tanaka, T., Sakai, H., Amano, N., Kanamori, H., Kurita, K., Kikuta, A., Kamiya, K., Yamamoto, M., Ikawa, H., Fujii, N., Hori, K., Itoh, T., and Sato, K. 2011. Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiol.* 156:20-28.
- McCormick, Susan P., Stanley, A. M., Stover, N. A., and Alexander, N. J. 2011. Trichothecenes: From simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3:802-814.
- Meyers, B. C., Shen, K. A., Rohani, P., Gaut, B. S., and Michelmore, R. W. 1998. Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. *Plant Cell* 10:1833-1846.
- Nei, M., Niimura, Y., and Nozawa, M. 2008. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: Roles of chance and necessity. *Nat. Rev. Genet.* 9:951-963.
- Nelson, D., and Werck-Reichhart, D. 2011. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J.* 66:194-211.
- Osmani, S. A., Bak, S., and Møller, B. L. 2009. Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* 70:325-347.
- Paquette, S., Møller, B. L., and Bak, S. 2003. On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* 62:399-413.
- Pestka, J. J. 2010. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch. Toxicol.* 84:663-679.
- Pond, S. L. K., Frost, S. D. W., and Muse, S. V. 2005. HyPhy: Hypothesis

- testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21:676-679.
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschig, C., and Adam, G. 2003. Detoxification of the *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 278:47905-47914.
- Poppenberger, B., Fujioka, S., Soeno, K., George, G. L., Vaistij, F. E., Hiranuma, S., Seto, H., Takatsuto, S., Adam, G., Yoshida, S., and Bowles, D. 2005. The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:15253-15258.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., and McCormick, S. P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:593-601.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E. K., and Bowles, D. J. 2001. Higher plant glucosyltransferases. *Genome Biol.* 2:3004-3011.
- Sarver, B. A. J., Ward, T. J., Gale, L. R., Broz, K., Kistler, H. C., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J., and O'Donnell, K. 2011. Novel *Fusarium graminearum* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genet. Biol.* 48:1096-1107.
- Scheffler, K., Martin, D. P., and Seoighe, C. 2006. Robust inference of positive selection from recombining coding sequences. *Bioinformatics* 22:2493-2499.
- Schweiger, W., Boddu, J., Shin, S., Poppenberger, B., Berthiller, F., Lemmens, M., Muehlbauer, G. J., and Adam, G. 2010. Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:977-986.
- Schweiger, W., Steiner, B., Limmongkon, A., and Brunner, K. 2011. Cloning and heterologous expression of candidate DON-inactivating UDP-glucosyltransferases from rice and wheat in yeast. *Plant Breed. Seed Sci.* 64:105-111.
- Shin, S., Torres Acosta, J. A., Heinen, S. J., McCormick, Susan P., Lemmens, M., Kovalsky Paris, M. P., Berthiller, F., Adam, G., and Muehlbauer, G. J. 2012. Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a barley UDP-glucosyltransferase exhibit resistance to the mycotoxin deoxynivalenol. *J. Exp. Bot.* 63:4731-4740.
- Song, J. T., Koo, Y. J., Seo, H. S., Kim, M. C., Choi, Y. D., and Kim, J. H. 2008. Overexpression of AtSGT1, an *Arabidopsis* salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry* 69:1128-1134.
- Steiner, B., Kurz, H., Lemmens, M., and Buerstmayr, H. 2009. Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theor. Appl. Genet.* 118:753-764.
- Suyama, M., Torrents, D., and Bork, P. 2006. PAL2NAL: Robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* 34:W609-W612.
- Theis, T., and Stahl, U. 2004. Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol. Life Sci.* 61:437-455.
- Tognetti, V. B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., Genty, B., Stubbs, K. A., Inzé, D., and Van Breusegem, F. 2010. Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *Plant Cell* 22:2660-2679.
- Urban, M., Daniels, S., Mott, E., and Hammond-Kosack, K. 2002. *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Plant J.* 32:961-973.
- Vogt, T., and Jones, P. 2000. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: Characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* 5:380-386.
- Waldron, B. L., Moreno-Sevilla, B., Anderson, J. A., Stack, R. W., and Frohberg, R. C. 1999. RFLP mapping of QTL for *F. graminearum* head blight resistance in wheat. *Crop Sci.* 39:805-811.
- Walter, S., Brennan, J. M., Arunachalam, C., Ansari, K. I., Hu, X., Khan, M. R., Trognitz, F., Trognitz, B., Leonard, G., Egan, D., and Doohan, F. M. 2008. Components of the gene network associated with genotype-dependent response of wheat to the *Fusarium graminearum* mycotoxin deoxynivalenol. *Funct. Integr. Genomics* 8:421-427.
- Ward, T. J., Bielawski, J. P., Kistler, H. C., Sullivan, E., and O'Donnell, K. 2002. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *F. graminearum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:9278-9283.
- Wong, P., Walter, M., Lee, W., Mannhaupt, G., Münsterkötter, M., Mewes, H.-W., Adam, G., and Güldener, U. 2011. FGDB: Revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Res.* 39:D637-D639.
- Xu, J.-H., Bennetzen, J. L., and Messing, J. 2012. Dynamic gene copy number variation in collinear regions of grass genomes. *Mol. Biol. Evol.* 29:861-871.
- Zachariasova, M., Vaclavikova, M., Lacina, O., Vaclavik, L., and Hajslova, J. 2012. Deoxynivalenol-oligoglycosides: New 'masked' *Fusarium graminearum* toxins occurring in malt, beer and breadstuff. *J. Agric. Food Chem.* 60:9280-9291.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

- The *Arabidopsis* Cytochrome P450, Cytochrome_{b5}, P450 Reductase, β -Glucosidase, and Glycosyltransferase database: www.p450.kvl.dk
- Kazusa DNA Research Institute Codon Usage database: www.kazusa.or.jp/codon
- The Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS): www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis
- OrthoMCLdatabase: www.orthomcl.org
- School Of Medicine of the University of California, San Diego
- Datamonkey server: www.datamonkey.org

Tableau 9 : Pourcentage d'identité/similarité des séquences protéiques de *Brachypodium distachyon* orthologues d'HvUGT13248.

	Bradi5g02780	Bradi5g03300	Bradi5g03370	Bradi5g03380	Bradi5g03390	Bradi5g03400	HvUGT13248
Bradi5g02780	100/100						
Bradi5g03300	63.5/75.7	100/100					
Bradi5g03370	66.1/66.1	66.1/77.5	100/100				
Bradi5g03380	65.9/78.0	62.7/73.5	63.6/75.8	100/100			
Bradi5g03390	63.9/75.4	82.2/88.1	63.4/76.2	62.1/73.7	100/100		
Bradi5g03400	47.6/56.4	59.7/64.8	48.2/57.1	46.8/55.1	62/66.5	100/100	
HvUGT13248	65.8/76.7	71.4/80.4	65.1/78.6	64.0/75.6	72.4/81.6	53.3/60.7	100/100

réalisé avec http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/

Conclusion

La recherche de l'ensemble des séquences protéiques portant le motif PSPG a permis d'identifier 178 modèles de gènes parmi lesquels se trouvent des pseudogènes (14) et 5 formes d'épissage alternatif de 4 gènes différents. Nous avons donc abouti à l'identification de 159 gènes codant des UGTs potentiellement fonctionnelles dans le génome de *B. distachyon*. Ces 159 gènes sont répartis en 16 groupes contre 14 groupes chez *Arabidopsis*, les groupes O et P étant absents chez cette dernière espèce (Caputi et al., 2012). Certains groupes ont été divisés en sous-groupes : c'est le cas du groupe D, avec D1 et D2, ou du groupe L, avec L1, L2 et L3.

Le positionnement sur cet arbre des UGTs d'*Arabidopsis* (UGT73C5) et d'orge (HvUGT13248) capables de conjuguer le DON en D3G a abouti à l'identification de 8 orthologues potentiels chez *B. distachyon*. Deux protéines (Bradi2g04720 et Bradi2g04760) codées par des gènes localisés sur le chromosome 2 sont les orthologues potentielles d'UGT73C5 et appartiennent au sous-groupe D1. Six protéines (Bradi5g02780, Bradi5g03300, Bradi5g03370, Bradi5g03380, Bradi5g03390 et Bradi5g03400) codées par des gènes localisés sur le chromosome 5 sont les orthologues potentielles d'HvUGT13248 et appartiennent au sous-groupe L1. L'organisation en clusters de ces candidats, notamment ceux du sous-groupe L1, ne permet pas de restreindre ce nombre étant donné la très forte similarité qui existe entre ces différentes séquences protéiques (**Tableau 9**).

Le profil d'expression des 8 gènes candidats en réponse à l'application de DON nous a permis de mettre en évidence 2 types de réponses : des gènes n'ayant qu'une très faible ou pas d'activation transcriptionnelle (*Bradi5g02780*, *Bradi5g03390* et *Bradi5g03400*) et des gènes induits avec un taux d'induction plus ou moins important dès 3 heures après application du DON. Les profils d'expression en réponse à la souche *FgDON*⁺ donnent des résultats similaires. La comparaison des profils d'expression des gènes en réponse à l'infection par les souches *FgDON*⁺ et *FgDON*⁻ nous a permis de mettre en évidence un très fort différentiel d'expression pour certains gènes (*Bradi5g03300*, *Bradi5g03370* et *Bradi5g03380*) dès 48 heures après infection (hai). Nous avons constaté que ce différentiel d'expression s'atténue 144 hai pour les gènes *Bradi5g03370* et *Bradi5g03380* mais que celui-ci est en partie maintenu pour le gène *Bradi5g03300*.

Enfin, l'expression des ADNc correspondants à ces 8 gènes candidats en système hétérologue levure a été conduite. Seul deux d'entre eux : *Bradi5g02780* et *Bradi5g03300* confèrent la résistance au DON. Cependant, l'expression du gène codant la protéine

Bradi5g02780 ne permet la résistance qu'à de faibles concentrations de DON jusque 40 mg/l. L'expression du gène *Bradi5g03300* permet au contraire l'acquisition de la résistance sur un milieu contenant 80 ou 120 mg/l de déoxynivalénol, des résultats similaires à ceux préalablement obtenus pour l'UGT d'*Arabidopsis* UGT73C5 (Poppenberger et al., 2003) et l'UGT d'orge HvUGT13248 (Schweiger et al., 2010). Les résistances observées sont accompagnées par la formation de D3G.

Compte-tenu du profil d'expressions du gène *Bradi5g03300* et de la forte capacité de la protéine correspondante à conférer une résistance en système levure, associée à la conjugaison du DON en D3G, nous avons estimé que ce gène était le meilleur candidat pour réaliser des analyses fonctionnelles *in planta* chez *B. distachyon*.

CHAPITRE 3 : Analyse fonctionnelle du gène *Bradi5g03300*

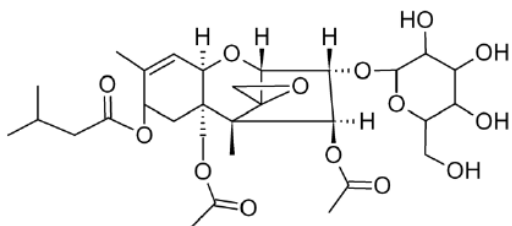
Introduction

Comme nous avons pu l'aborder dans l'**Introduction** (partie **F.1.**), la phase 2, dite de conjugaison, du processus de détoxification fait intervenir majoritairement des UDP-glycosyltransférases (Coleman et al., 1997) ou des glutathion-S-transférase (Dixon et al., 1998). La détoxification de mycotoxines fongiques par les plantes a été mise en évidence à plusieurs reprises (Berthiller et al., 2013). Dans le cas des TCT (A et B), les formes conjuguées connues à l'heure actuelle le sont soit avec un sucre, le glutathion ou des dérivés de ce dernier (**Figure 21**). Des formes diglucosides de TCT A existent également (Nakagawa et al., 2013).

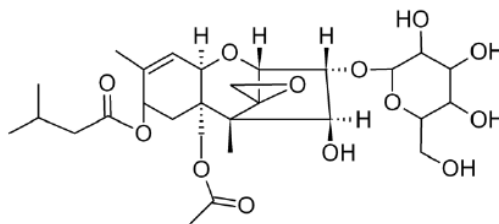
Chez le blé et l'orge les formes conjuguées identifiées du DON n'ont pour le moment pas été reliées directement par le biais d'analyses fonctionnelles *in planta* à la résistance à l'agent pathogène. Seules des relations indirectes ont pu être établies (Lemmens et al., 2005; Kumaraswamy et al., 2011a; Schweiger et al., 2013). La formation de D3G et le ratio D3G/DON sont considérés comme des indicateurs de résistance de la plante à l'infection par *F. graminearum* (Bollina et al., 2011; Kumaraswamy et al., 2011a). Il semble donc primordial de réaliser une analyse fonctionnelle sur un ou des gènes codant des UGTs capables de conjuguer le DON en D3G afin de voir si la conjugaison de la mycotoxine par la plante et sa possible détoxification ont un impact sur le développement de la maladie.

Afin de répondre à l'hypothèse d'une relation directe entre conjugaison/détoxification du DON par la plante et résistance à *F. graminearum* nous avons décidé de réaliser une analyse fonctionnelle sur le gène candidat de *B. distachyon* identifié dans le chapitre précédent. En effet le gène codant la protéine Bradi5g03300 répond transcriptionnellement au DON et à l'agent pathogène producteur de toxine. De plus, cette protéine est capable de conjuguer le DON en D3G chez la levure (**Chapitre 2**). Ce candidat remplit donc tous les critères préalables nécessaires à la réalisation d'une analyse fonctionnelle chez *B. distachyon*.

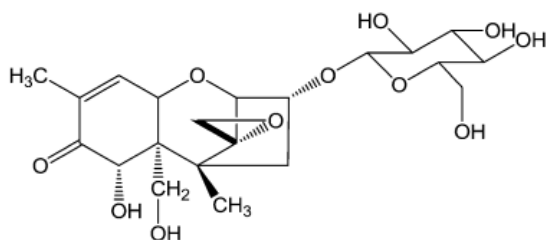
Pour réaliser cette analyse fonctionnelle, nous avons recherché ou construit dans un premier temps des lignées altérées dans l'expression du gène ou dans la protéine. Il n'existe pas pour le gène codant la protéine Bradi5g03300 de mutants insertionnels dans les banques T-DNA disponibles. Nous avons donc choisi de rechercher des mutations ponctuelles présentes dans ce gène dans la collection de mutants TILLING disponible à l'URGV d'Evry en ciblant la région du gène *Bradi5g03300* codant le motif PSPG. Le choix de ce motif est fondé sur la possibilité de l'identifier *in silico* (Gachon et al., 2005; Osmani et al., 2009) et par son importance dans la fixation du sucre donneur (Osmani et al., 2009). La construction de



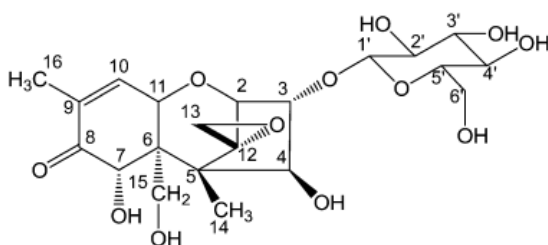
Toxine T-2-3-O-glucoside



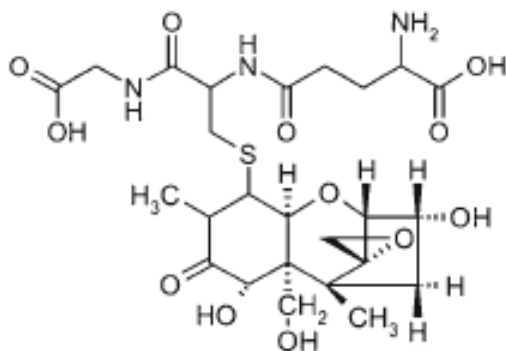
Toxine HT-2-3-O-glucoside



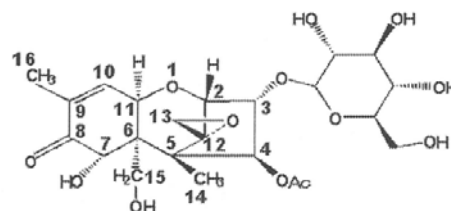
DON-3-O-glucoside



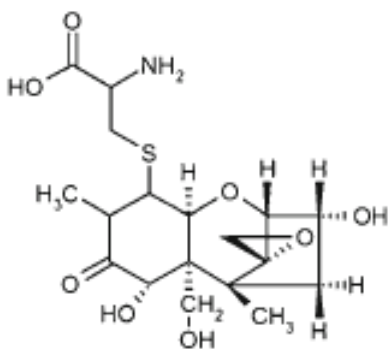
NIV-3-O-glucoside



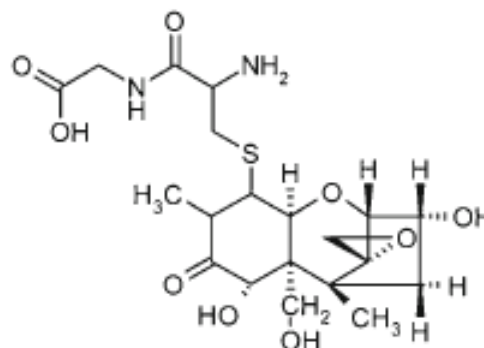
DON-glutathion



4-ANIV-3-O-glucoside



DON-S-cystéine



DON-S-cystéinyl-glycine

Figure 21 : Formes conjuguées des TCT A et B actuellement connues. DON : déoxynivalénol ; NIV : nivalénol (d'après Busman et al., 2011 ; Nakagawa et al., 2011 ; Kluger et al., 2013 et Yoshinari et al., 2014).

lignées surexprimant le gène candidat (lignées OE) a été réalisée en collaboration avec Oumaya Bouchabké-Coussa (IJPB, Versailles). L'ADNc de *Bradi5g03300* sous le contrôle du promoteur du gène *UBI* (ubiquitine) du maïs a été introduit dans l'écotype Bd21-3 de *B. distachyon* par agro-transformation.

L'impact potentiel des mutations ponctuelles (mutation silencieuse, faux sens, ou non-sens) obtenues dans les lignées mutantes (TILLING) a été évalué *in silico* sur la protéine. Le taux d'expression du gène *Bradi5g03300* a été déterminé par qPCR dans les lignées surexprimeurs (OE).

Ces lignées dans leur ensemble (TILLING et OE) ont ensuite été caractérisées pour leur sensibilité/tolérance au DON par l'intermédiaire de leur croissance racinaire sur un milieu gélosé contenant ou non la mycotoxine.

En parallèle de cette approche *in vitro*, des tests d'infection par les souches *FgDON*⁺ et *FgDON*⁻ ont été réalisés dans l'objectif d'évaluer l'impact des mutations dans la protéine *Bradi5g03300* ou de la surexpression du gène *Bradi5g03300* sur le développement de la maladie chez *B. distachyon*. Ces tests de pathogénie ont donné lieu à une quantification des symptômes macroscopiques observés et de la biomasse fongique par une approche de qPCR.

La détection de DON, D3G et 15-ADON *in planta* dans le cadre de l'interaction entre *B. distachyon* et *F. graminearum* (chénotype DON/15-ADON) a été réalisée afin d'évaluer s'il y a un lien direct entre sensibilité/tolérance à l'agent pathogène et formation de D3G. La détection de ces différents métabolites a été effectuée en collaboration avec Vessela Atanasova-Pénichon (MycSA, INRA Villenave d'Ornon) ce travail m'a permis de m'initier à la méthode de détection de métabolites secondaires par HPLC-MS/MS.

Dans l'objectif d'évaluer l'affinité de la protéine *Bradi5g03300* notamment pour le DON, nous avons développé une approche de protéine recombinante. Des résultats préliminaires seront présentés avec la scopolétine ou le DON comme substrat.

Enfin, afin d'essayer de déterminer si cette UGT est également impliquée chez *B. distachyon* dans la prise en charge d'autres TCT B de structure proche du DON (NIV, 3-ADON et 15-ADON) nous avons mis en place la même démarche scientifique que celle utilisée vis-à-vis du DON à savoir des tests de croissances racinaires *in vitro* et/ou des tests de pathogénie avec des souches de chénotype NIV/4-NIV (INRA162) et DON/3-ADON (*Fg3ADON*).

Article 3 : The UDP-glucosyltransferase Bradi5g03300 confers root tolerance to deoxynivalenol and resistance to *Fusarium graminearum* in *Brachypodium distachyon*.

Jean-Claude Pasquet, Catherine Macadré, Soulhat Camille, Oumaya Bouchabké-Coussa, Marion Dalmais, Vessela Atanasova-Pénichon, Patrick Saindrenan and Marie Dufresne

A soumettre à The Plant Cell.

Title: The UDP-glucosyltransferase Bradi5g03300 confers root tolerance to deoxynivalenol and resistance to *Fusarium graminearum* in *Brachypodium distachyon*.

Jean-Claude Pasquet¹, Catherine Macadré¹, Camille Soulhat², Oumaya Bouchabké-Coussa², Marion Dalmais³, Vessela Atanasova-Pénichon⁴, Patrick Saindrenan¹ and Marie Dufresne^{1*}.

¹Institut de Biologie des Plantes, Unité Mixte de Recherche 8618, Saclay Plant Sciences, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

²Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex France.

³INRA/CNRS/UEVE – URGV, Saclay Plant Sciences, 2, rue Gaston Crémieux, CP5708, 91057 Evry cedex, France.

⁴UR1264 MycSA Mycologie et Sécurité des Aliments, INRA Domaine de la Grande-Ferrade BP 81 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France.

*Corresponding author: marie.dufresne@u-psud.fr.

The authors responsible for distribution of materials integral to findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) are: Catherine Macadré (catherine.macadre@u-psud.fr) and Marie Dufresne (marie.dufresne@u-psud.fr).

Abstract

Fusarium Head Blight (FHB) is a cereal disease caused primarily by the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. This pathogen is characterized by the ability to produce type B trichothecenes on infected cereal spikes, including deoxynivalenol (DON), known to be harmful for human and animals. Resistance to FHB is merely quantitative and mechanisms underlying resistance are poorly understood. Resistance has been indirectly correlated to the ability to conjugate DON into a glucosylated form, DON-3-*O*-glucose. However, the direct relationship between this conjugation step and resistance to FHB could never be established because of the lack of functional studies in host plants. Here, using the model cereal species *Brachypodium distachyon*, we show that the Bradi5g03300 UGT converts DON into DON-3-*O*-glucose *in planta*. We also present evidence that a mutation in the corresponding gene increases both root sensitivity to DON and susceptibility to *F. graminearum* while overexpression of the gene confers both increased root tolerance to the mycotoxin and increased resistance to the fungal pathogen. A more detailed examination of the dynamics of expression and conjugation suggests that the earliness of increased DON conjugation rather than the increase by itself is likely responsible for the higher quantitative resistance of the overexpressing lines. These data highlight a novel strategy to promote FHB resistance in small-grain cereals.

INTRODUCTION

Fusarium Head Blight (FHB) is one of the more devastating diseases of small-grain cereals (Kazan et al., 2012). Besides direct losses due to alteration of grain filling, FHB constitutes a health threat due to the production of mycotoxins by the causal pathogens, which are harmful for human and animals (Rocha et al., 2005; Yazar and Omurtag, 2008). One of the main FHB causal agents is the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. The most prevalent mycotoxins produced by this fungus are type B trichothecenes (TCTB): these include deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and their acetyl derivatives, 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON), 4-acetylnivalenol (4-ANIV or fusarenon X) and 4,15-acetylnivalenol (4,15-ANIV) (Yazar and Omurtag, 2008). A *F. graminearum* strain is generally characterized by its chemotype and produces one main TCTB. Genes encoding enzymes involved in TCTB biosynthesis have been identified and most of them belong to the *Tri5* cluster (Kimura et al., 2003) named after the *Tri5* gene encoding the trichodiene synthase enzyme which catalyzes the first committed step of the biosynthetic pathway. TCTB are sesquiterpene secondary metabolites that inhibit protein synthesis in eukaryotic cells (Rocha et al., 2005). Animal toxicity has been well described and TCTB have been shown to induce appetite alterations but also immunotoxic effects. In plants, toxic effects have also been described following application of high concentrations of toxins. These include the production of reactive oxygen species, apoptotic-like processes such as nuclear DNA scaling, chlorotic and necrotic lesions and root growth inhibition (Masuda et al., 2007; Desmond et al., 2008).

The relationship between the ability to produce TCTB and pathogenicity has been investigated using mutant strains impaired in the *Tri5* gene and thus unable to produce TCTB. On wheat, a *tri5* mutant strain is unable to efficiently colonize the spike from a single inoculation site whereas on barley, both a wild-type strain and the near-isogenic *tri5* mutant strain are limited in their progression (Maier et al., 2006). These contrasted results were interpreted as likely reflecting the specificity of defense/resistance mechanisms of the host plants and led to the conclusion that TCTB may nevertheless be considered as aggressiveness factors.

Resistance of small-grain cereals towards FHB has been extensively investigated. No monogenic resistance has been identified but more than 100 quantitative trait loci (QTL) have been described so far (Buerstmayr et al., 2009). A number of studies using DON-producing

strains of *F. graminearum* have tried to understand the biological functions leading to quantitative resistance to FHB in wheat or barley, in particular using transcriptomic (Boddu et al., 2006; Gardiner et al., 2010; Gottwald et al., 2012; Kugler et al., 2013), proteomic (Zhang et al., 2013) or metabolomic approaches (Kumaraswamy et al., 2011a). These allowed determine that biosynthetic pathways leading to the production of secondary metabolites such as phenylpropanoids and flavonoids were significantly induced following infection by *F. graminearum*. However, full understanding of the genetic basis of such resistance reactions was complex due to the genetic diversity of the cultivars. One common feature of these analyses is the relationship between partial resistance and the production of DON-3-*O*-glucoside (D3G), now clearly considered as a resistance-related metabolite (Lemmens et al., 2005; Kumaraswamy et al., 2011a). Glucosylation is a well-known step in detoxification processes in plants, leading to more hydrophilic and generally less toxic compounds. This reaction is catalyzed by small molecules (or family 1) UDP-glucosyltransferases (UGT) which are encoded by large multigenic families in plants (Ross et al., 2001). These enzymes mediate the transfer of glycosyl residues from activated nucleotide sugars to acceptor molecules (aglycones), thus regulating properties of the acceptors such as their bioactivity, water solubility and transport within the cell and throughout the organism (Gachon et al., 2005). Plant UGTs able to conjugate DON into D3G have been identified in *Arabidopsis thaliana* (Poppenberger et al., 2003), barley (Schweiger et al., 2010) and more recently in wheat (Lulin et al., 2010; Schweiger et al., 2013a) However, *in planta* analyses could not be conducted in a host cereal species for *F. graminearum*, therefore avoiding the establishment of a functional relationship between DON glucosylation and resistance towards FHB.

In the last decade, *Brachypodium distachyon* has emerged as a model plant species for small-grain cereals because of interesting characteristics: a small size, a short life cycle avoiding vernalization under long day conditions, a small genome, a routine genetic transformation and the availability of a number of genetic and genomic resources (Mur et al., 2011). *B. distachyon* has been shown to be a host species for many cereal pathogens (Peraldi et al., 2011; Mandadi and Scholthof, 2012; Falter and Voigt, 2014; Peraldi et al., 2014; Sandoya and Buanafina, 2014). In particular, it has been shown to exhibit typical FHB symptoms following infection by *F. graminearum* and to accumulate DON on infected spikes (Peraldi et al., 2011; Pasquet et al., 2014), further demonstrating the potential of this model plant species to conduct functional genomics of FHB resistance. In a recent study, we performed a phylogenetic analysis of *B. distachyon* UGT protein sequences to identify potential

orthologous sequences to UGT known to be able to glucosylate DON, UGT73C5 from *Arabidopsis* (Poppenberger et al., 2003) and HvUGT13248 from barley (Schweiger et al., 2010). In this work, *B. distachyon* UGT Bradi5g03300 has been identified as a potential functional homolog of the barley HvUGT13248 and demonstrated to glucosylate DON, using yeast as a heterologous system (Schweiger et al., 2013b). The corresponding gene was also shown to be differentially induced following infection by *F. graminearum* strains producing or not DON (Schweiger et al., 2013b).

In the present work, we aimed at investigating the functional relevance between DON conjugation into D3G by the Bradi5g03300 UGT and resistance to *F. graminearum* using *B. distachyon* as a model host plant. We first selected or constructed *Bradi5g03300* mutant or overexpressing lines and then conducted functional analyses. Our results show unambiguously that conjugation of DON into D3G is functionally linked to root tolerance to the mycotoxin as well as to resistance towards FHB *in planta*.

RESULTS

Identification of *Brachypodium* lines mutated in the *Bradi5g03300* gene

UDP-glycosyltransferases (UGT) exhibit two important domains in their primary sequence. The first domain localized at the amino-terminus of the protein is involved in the interaction between the protein and its substrate but is not conserved at the amino-acid level (Osmani et al., 2009). The second domain located at the carboxy-terminus of the protein is involved in the binding of the sugar donor and is named Plant Secondary Product Glycosyltransferase (PSPG box). This 44 amino-acid motif is highly conserved in all plants UGTs of family 1 (or plant secondary metabolism glycosyltransferases, Gachon et al., 2005). The PSPG box of the *Bradi5g03300* UGT is encoded by exons 2 and 3 and is located between amino acids 345 and 388. The TILLING mutant collection of *Brachypodium* (BRACHYTIL, Dalmais et al., 2013) generated by sodium-azide mutagenesis allowed us to search for mutants in the *Bradi5g03300* gene. Screening of this collection was performed using specific primers (3300_N2Ft1 and 3300_N2Rt1) allowing amplification of a 964-bp DNA fragment surrounding the PSPG box-encoding region (see Material and Methods and Figure S1). 15 potential mutant families were identified (Table S1). Following sequencing of the corresponding mutant alleles, six were shown to carry mutations located in the region encoding PSPG box, three of which could potentially impact the protein activity (Table 1). In line 8637-12 a non synonymous substitution of serine 368 by a phenylalanine (S368F) was identified. In lines 6829-7 and 6491-12, tryptophan residues at positions 345 and 366, respectively, were replaced by a stop codon (W345*; W366*), resulting in both cases in the production of a truncated protein. As a control line for mutant family 6829, we selected a line, named 6829-3, carrying a wild-type *Bradi5g03300* allele. No control lines could be obtained for the two other mutant families.

Developmental criteria were observed and quantified: seed germination time and rate, emergence of the first three leaves, heading date, overall size of the mature plant and yield. For the three TILLING mutant lines, no major differences were observed as compared with the wild-type Bd21-3 line nor with the control line 6829-3 (Figure S2).

Construction of lines over-expressing the *Bradi5g03300* gene

In order to obtain lines over-expressing the *Bradi5g03300* gene, a pIPKb002-derived binary vector was constructed (Himmelbach et al., 2007, see Material and Methods). The resulting construct carrying both the *Bradi5g03300* cDNA under the control of the *Zea mays* ubiquitin (*ZmUBI*) promoter and a hygromycin-resistance cassette for the selection of transformants,

was named pIPKb002-Bradi5g03300 and used for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *B. distachyon* Bd21-3 embryogenic calli. Five independent homozygous lines, each carrying the corresponding T-DNA as a single insertion locus, were obtained. qRT-PCR experiments were conducted to identify lines exhibiting a high level of *Bradi5g03300* over-expression in spikelets (Figure 1A, Table 1). The over-expression rate was shown to be similar in leaves (Figure S3). For further functional analyses, three over-expressing (OE) lines (OE-9R5, OE-24R27 and OE-10R14) representing different rates of over-expression of the *Bradi5g03300* gene were used. In addition, a null segregant obtained following the same transformation experiment was kept as a control for these over-expressing lines.

As for TILLING mutant lines, no difference in developmental stages was observed for the three OE lines selected (Figure S2).

The *B. distachyon* *Bradi5g03300* gene is involved in root sensitivity/tolerance to DON

DON has already been reported to affect root growth (Masuda et al., 2007). To determine the involvement of the *Bradi5g03300* UGT on DON tolerance, seeds from the three mutant lines, the control line 6829-3 and the wild-type line Bd21-3 were germinated on agar medium with or without DON. While no difference of root development was observed between the lines on agar medium without DON, strong phenotypes were observed on 10 μ M DON. On this medium, whereas root growth inhibition was around 18% for the Bd21-3 and 6829-3 lines, it reached 90% for the three mutant lines (6829-7, 8637-12 and 6491-37) (Figure 2A) and was highly significant (Duncan test, p -value $\leq 1. 10^{-4}$). This strong root growth inhibition was accompanied in all mutant lines with an important swelling of the root apex (Figure 2B, magnified image at the bottom). In order to examine in more detail this phenotype, root apex from the wild-type line Bd21-3 and the mutant line 6829-7 grown without or with 10 μ M DON, were observed. As shown in Figure 3A and B, DON treatment of roots from the wild-type line did not induce major changes, apart for an apparent decrease of root hair development. In contrast, for mutant line 6829-7, DON induced important changes at the root apex (Figure 3D). Looking into more detail, an important reduction of the root apical meristem, an apparent disorganization of cell divisions and a global enlargement of cells at the root tip could be observed (Figure 3D). This effect was specific for DON as no difference was observed between the two lines on the medium without the mycotoxin (Figure 3A and 3C).

Similar tests were performed on OE lines, but DON concentration in the medium was increased to 50 μM in order to obtain observable effects. The OE lines exhibited root tolerance to DON (Figure 1B), with an apparent positive correlation with the level of *Bradi5g03300* over-expression (Figure 1A). The OE-10R14 line presented nearly full resistance to DON at this concentration, the reduction of root growth reaching only 10% whereas the null segregant showed 50% root growth inhibition (Figure 1B).

The *Bradi5g03300* UGT confers resistance to *F. graminearum* infection in *B. distachyon*

TILLING mutants and OE lines have shown an opposite root response to DON. In order to test if a plausible correlation between DON sensitivity / tolerance and susceptibility / resistance to FHB exists, pathogenicity assays were performed with a *Fusarium graminearum* strain producing DON (*FgDON*⁺). Two inoculation methods already described for other *F. graminearum* cereal hosts were used (Miedaner et al., 2003): spray inoculations with *FgDON*⁺ spores were used to observe both the primary infection (type I resistance) and the fungal spread in spikes (type II resistance) whereas point inoculations of individual florets with spores of the same *F. graminearum* strain were performed to observe specifically the fungal spread in spikes (type II resistance).

Mutant lines 6829-7, 8637-12 and 6491-37 as well as the wild-type line Bd21-3 and the control line 6829-3 were first spray-inoculated by *FgDON*⁺. In this experiment, an inoculated spikelet was considered as symptomatic if exhibiting full bleaching. Symptoms were scored 7 and 10 days after spraying. In the mutant lines, a significant increase of spikelets exhibiting bleaching symptoms was observed as compared with the wild-type and control 6829-3 lines (Figure 4A). 7 days after spray inoculation (dai), both the wild-type line Bd21-3 and the control line 6829-3 exhibited bleaching symptoms on 30% of the inoculated spikelets on average (Figure 4C). In contrast, in mutant lines this percentage reached 50 to 60% of overall inoculated spikelets. This differential between the wild-type line and the three mutants lines was significant (p-value ≤ 0.01) but no significant difference was observed between the three mutant lines (Figure 4C). Increased susceptibility of the mutant lines was still observed 10 dai. At this stage almost all inoculated spikelets of the mutant lines were fully symptomatic whereas only up to half the spikelets of the wild-type and control lines were symptomatic (Figure 4C).

Similar experiments were conducted on the three OE lines selected for functional analyses, OE-9R5, OE-24R27 and OE-10R14. Considering the potential resistance level of these lines, the scoring method was adapted: an inoculated spikelet was considered as symptomatic if

exhibiting bleaching symptoms on half or more of its florets (approximately 10 florets per spikelet). 7 days after spray inoculation strong differences in the extent of symptoms could be observed on OE lines as compared with the wild-type line Bd21-3 as well as with the null segregant (Figure 4B). For both control lines, 60% of the inoculated spikelets were found to be symptomatic 7 dai, and increased up to 90% at 14 dai (Figure 4D). In contrast, the OE lines exhibited a strong reduction of symptomatic spikelets at 7 (between 5 and 25%) and 14 dai (between 30 and 60%) (Figure 4D). As shown for root tolerance to DON, the OE-10R14 line was the most resistant line, exhibiting only very minor bleaching symptoms 7 and 14 dai (Figure 4B,D).

To strengthen symptoms observations, fungal DNA has been quantified by qPCR 7, 10 and 14 days after spray inoculation of the same infected plants for three lines: the wild-type line Bd21-3, the mutant line 6829-7 and the overexpressing line OE-10R14. After infection of the mutant line 6829-7 by *FgDON*⁺, plant tissues exhibited a significantly higher accumulation of fungal DNA, with 2.1 or 2.8 times more fungal DNA after 7 and 10 days, respectively as compared with the wild-type line Bd21-3 (Figure 5; Duncan test, p-value ≤ 0.01), which correlated well with the differential symptoms previously observed (Figure 4C). However, at 14 dai no difference was observed anymore between the two lines. After infection of the OE-10R14 line by *FgDON*⁺ 5.3, 2.7 and 3.8 times less fungal DNA was detected in comparison with Bd21-3 at 7, 10 and 14 dai, respectively (Figure 5). Again, these results were in accordance with previous symptoms estimations (Figure 4D).

DON production has been correlated with the ability of fungal colonization through the rachis in bread wheat (Maier et al., 2006) and more recently, in *B. distachyon* (Pasquet et al., 2014). In order to estimate more precisely the impact of the alteration of the *Bradi5g03300* gene or gene expression on fungal spread in infected spikes, point inoculations by the *FgDON*⁺ strain were performed on two mutant lines (8637-12 and 6829-7) as well as on the three overexpressing lines (OE-9R5, OE-24R27 and OE-10R14) and symptoms were compared to those obtained on the wild-type line Bd21-3, 7 and 14 dai. Both the wild-type line Bd21-3 and the mutant lines 8637-12 and 6829-7 exhibited bleaching symptoms on the entire inoculated spikelets that progressed to the most adjacent spikelet (Figure 6A). In contrast, 7 days after point inoculation, the three OE lines exhibited a high level of resistance to *F. graminearum*. The bleaching symptoms decreased (OE-9R5 line) or disappeared (OE-24R27 and OE-10R14 lines) on these lines in comparison with the symptoms observed on the Bd21-3 line (Figure 6A). These observations were supported by the semi-quantification of symptoms at 7 and 14

dai, using a scoring scale allowing to evaluate the extent of spikelets and spikes colonization (see Materials and Methods section). No significant difference was observed between the mutant lines and the wild-type line Bd21-3 but the differentials between the OE lines and the wild-type line were highly significant at 7 dai (Duncan test, $p\text{-value} \leq 1.10^{-4}$) (Figure 6B). At 14 dai, the OE-9R5 line did not exhibit resistance anymore but lines OE-24R27 and OE-10R14 lines remained highly tolerant to fungal infection (Figure 6B). As observed for root tolerance to DON, the higher resistance rate was observed for the line OE-10R14, exhibiting the strongest rate of *Bradi5g03300* over-expression.

The *Bradi5g03300* UGT conjugates DON into D3G *in planta*

We have demonstrated that mutant lines exhibited increased sensitivity to DON and susceptibility to *FgDON*⁺ and that overexpressing lines showed increased tolerance to DON and resistance to *FgDON*⁺. A glucosylated form of DON, DON-3-*O*-glucose, has been detected in studies conducted on wheat or barley (Lemmens et al., 2005; Kumaraswamy et al., 2011a) and Schweiger et al. (2013b) have recently demonstrated that expression of the *Bradi5g03300* cDNA in yeast conferred resistance to DON and allowed the conversion of DON into DON-3-*O*-glucose (D3G). In order to evaluate the role of the *Bradi5g03300* UGT in DON conjugation *in planta*, a quantification of DON, D3G as well as 15-ADON, a minor mycotoxin produced by the *FgDON*⁺ strain, was conducted following point inoculation. Two time and organ scales were used: the first one consisted in whole spikes at a late infection time point (14 dai); the second in infected spikelets during a shorter infection time-course, between 48 and 168 hours after inoculation (hai), used to better evaluate the dynamics of mycotoxin production and conjugation. For the first experiment, mutant lines 6829-7 and 8637-12 and the three overexpressing lines were used and compared with the Bd21-3 wild-type line. Mycotoxin production during the infection time-course was examined only in the mutant line 6829-7 and in the overexpressing line OE-10R14 and compared with that of the Bd21-3 wild-type line.

The situation at 14 dai was evaluated by measuring the D3G/DON ratios in whole infected spikes. The results revealed important differences between the lines. This ratio was 5.6 and 6.6% for 6829-7 and 8637-12 lines, respectively, and 18.4% for Bd21-3, this difference being significant (Figure 7A, Student t test, $p\text{-value} \leq 0.05$). In contrast, this ratio was significantly increased in the OE lines, with an average of 40% (Figure 7A) and was shown to be significantly different from that of the control line (Student t test, $p\text{-value} \leq 0.05$) but not between the three OE lines. Absolute quantification of DON, D3G and 15-ADON in all lines

was then performed at the same infection time point. An average of 56 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of total DON (DON + D3G) and a minor quantity of 15-ADON (around 1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) was quantified in infected spikes of the Bd21-3 line and of the two mutants lines (Figure 7B). No significant difference was observed between these three lines. In contrast, the quantities of total DON in infected spikes of over-expressing lines were drastically reduced with only 27.2, 29.0 and 9.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in OE-9R5, OE-24R27 and OE-10R14 lines, respectively (Figure 7B; Student t test, p-value \leq 0.01).

In order to better understand the dynamics of D3G formation during fungal infection, quantification of the same mycotoxins was performed during a shorter infection time-course of spikelets by *FgDON*⁺. Three time points were considered: 48, 96 and 168 hai. The calculation of the D3G/DON ratios showed important differences between the 6829-7, Bd21-3 and OE10R14 lines as soon as 48 hai. Indeed, this ratio was only 13.2% in mutant line 6829-7, 41.5% in the Bd21-3 wild-type line but was as high as 185.1% in the overexpressing line OE-10R14 (Figure 7C). Progressing in the infection time-course, this ratio remained at a lower level in the mutant line 6829-7: 10.5% and 2.5% respectively at 96 and 168 hai (Figure 7C). In the wild-type Bd21-3 line, we observed the same tendency, with a decrease of the D3G/DON ratio between 96 and 168 hai that reached 11.8% at final (Figure 7C). In the overexpressing line OE-10R14, even if the ratio decreased between 48 and 96 hai, it remained at a high level, 69%, even at 168 hai (Figure 8C). Ratios from the three different lines were always significantly different from each other at a same infection time point (Student t test, p-value \leq 0.05). Absolute quantification of DON, D3G and 15-ADON in infected spikelets of the three lines was then performed during the same infection time-course. Results are presented in Figure 7D. For the three time points, no significant difference could be detected between the mutant line 6829-7 and the Bd21-3 wild-type line (Figure 7D). In contrast, we observed a drastic reduction of total DON in the overexpressing line OE-10R14 with only 0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ at 48 hai, 10.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ at 96 hai and 22 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ at 168 hai, as compared with infected spikelets of the wild-type Bd21-3 line containing 1.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 35.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 113.9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively at the same time points.

Overexpression of the *Bradi5g03300* avoids transcriptional regulation of the endogenous copy following *FgDON*⁺ infection

The *Bradi5g03300* transcriptional regulation by *FgDON*⁺ strain and DON application have been demonstrated by Schweiger et al. (2013b) in the Bd21 wild-type line. In order to

understand the role of the conjugation process in the early development of resistance, the expression pattern of the *Bradi5g03300* gene was examined in line OE-10R14 in comparison with the wild-type line. For this purpose, RT-qPCR experiments were performed on spikelets of both lines either mock-inoculated or infected by the *FgDON*⁺ strain during an infection time-course and the ratios of relative expression between the overexpressing line and the wild-type line calculated for each time point in each condition. In mock-inoculated spikelets, the rate of overexpression is overall constant for all time points (approximately 1,000 times) (Figure 8). In contrast, after infection by *FgDON*⁺ strain, if the ratio is the same at 0 hai, it strongly decreases in the later time points (Figure 8). Considering that the primers used to monitor *Bradi5g03300* transcripts do not discriminate between the endogenous gene and the copy brought by the transgenic transcript, these results suggest that there is no induction of the endogenous gene in the OE-10R14 line.

Mutations or alteration of expression of the *Bradi5g03300* gene do not modify the interaction with a *F. graminearum* strain unable to produce DON (*FgDON*⁻)

Pasquet et al. (2014) have recently described the interaction between *B. distachyon* and a mutant *F. graminearum* strain unable to produce DON (*FgDON*⁻), because impaired in the *Tri5* gene encoding the first committed enzyme of the trichothecene biosynthetic pathway (Cuzick et al., 2008). This strain has been shown to be largely delayed in symptom development following point inoculation of *B. distachyon* spikes (Pasquet et al., 2014). In order to determine whether the differences observed between the mutant and overexpressing lines following inoculation with the *FgDON*⁺ strain are strictly correlated with DON conjugation, spray inoculations of the same three lines with the *FgDON*⁻ strain were performed. The resulting symptoms were observed 7, 10 and 14 dai and fungal DNA was quantified in order to better estimate the extent of colonization. No striking symptom differences could be observed 7, 10 or 14 days after spray-inoculation of spikes of the mutant line (6829-7) and over-expressing line (OE-10R14) as compared with the wild-type Bd21-3 line: contrary to symptoms obtained following inoculation by the *FgDON*⁺ strain, spikes inoculated by the *FgDON*⁻ strain only exhibited browning but not bleaching (data not shown). Quantification of fungal DNA on the same biological material did confirm the absence of significant differences between the three lines during infection by the *FgDON*⁻ with the exception of the last time point (14 dai) for which a slightly higher fungal development was observed for the mutant line (Figure 9). It is important to note that this slight differential was

much lower than the differences previously observed following spray inoculation of the same lines with the *FgDON*⁺ strain (Figure 5).

DISCUSSION

Plant secondary metabolism glycosyltransferases (or UDP-glycosyltransferases, UGTs) are encoded by large gene families (Li et al., 2001; Sado et al., 2009). Through their activity, they are presumed to regulate solubility, biological activity and transport of compounds within the plant cell and tightly regulate cellular homeostasis (Gachon et al., 2005). UGTs may act on endogenous compounds, such as defense (Chong et al., 2002; Jones et al., 2003; Grubb et al., 2004; Dean and Delaney, 2008; von Saint Paul et al., 2011), hormones or signaling molecules (Poppenberger et al., 2005; Priest et al., 2005; Jin et al., 2013; Tanaka et al., 2014). Glycosylation has also been identified as one of the major steps of detoxification of exogenous compounds in plants (Coleman et al., 1997). For example, some *Arabidopsis* UGTs have been shown to exhibit *in vitro* activities towards both endogenous compounds and a xenobiotic substrate, 2,4,5-trichlorophenol (Meßner et al., 2003).

Mycotoxins are among the toxic compounds imposed exogenously on plants, and more specifically on small-grain cereals (Miller, 2008). Type B trichothecenes produced by plant pathogenic fungi belonging to the *Fusarium* genus are among the most important mycotoxins worldwide (Foroud and Eudes, 2009). These sesquiterpene molecules, including the most studied deoxynivalenol (DON), have been shown to have phytotoxic effects on *Arabidopsis* (Masuda et al., 2007) and wheat (Desmond et al., 2008).

Previous studies have identified plant UDP-glycosyltransferases potentially involved in DON conjugation: the *Arabidopsis* UGT73C5 (Poppenberger et al., 2003) and HvUGT13248 in barley (Schweiger et al., 2010). Although very informative, these studies have not allowed correlate directly the ability to conjugate DON into D3G and the resistance/susceptibility to the fungal pathogen producing DON. In order to determine whether a true correlation between DON conjugation and resistance exists, we used the *B. distachyon* / *F. graminearum* interaction and identified a *B. distachyon* candidate gene, *Bradi5g03300*, orthologous to the barley *Hv13248* gene using a combined approach of phylogenetics, analysis of gene regulation and expression in a yeast heterologous system (Schweiger et al., 2013b). The present study describes the results obtained *in planta* following either gene mutation or gene overexpression.

The Bradi5g03300 UGT glucosylates DON *in planta*

Overexpression of the Arabidopsis *UGT73C5* and barley *Hv13248* genes in yeast or Arabidopsis, respectively, have shown to increase the ability of DON conjugation into D3G following DON application (Poppenberger et al., 2003; Shin et al., 2012). However, because the studies were conducted in heterologous systems, the conjugation of DON could not be demonstrated following *F. graminearum* infection, that is in the presence of fungal-derived mycotoxins. The Bradi5g03300 UGT has been previously shown to conjugate DON into D3G in a yeast heterologous system (Schweiger et al., 2013b). In the present work, the selection of *B. distachyon* lines carrying mutations in the *Bradi5g03300* gene as well as the generation of *B. distachyon* lines overexpressing the same gene, allowed us to establish the involvement of the UGT in DON conjugation *in planta* (Figure 7). Indeed, we showed that mutant lines exhibited a 60% reduction of their D3G/DON ratios 14 days after inoculation as compared with the wild-type line. In contrast, the lines overexpressing the *Bradi5g03300* gene showed a nearly two-fold increase of their D3G/DON ratio. Similar results were obtained when analyzing samples from a time-course covering 48h to 168 after inoculation: significant differences were observed between the lines as soon as 48 hai and throughout the infection time-course, the mutant line exhibiting a significant reduction and the overexpressing line a strong and significant increase of the D3G/DON ratio. These results demonstrate the involvement of the Bradi5g03300 UGT in DON conjugation *in planta*.

The Bradi5g03300 UGT is involved in root tolerance to DON

The use of *B. distachyon* mutant and overexpressing lines in the present study allowed us to establish a direct relationship between DON glucosylation and root sensitivity/tolerance to the mycotoxin. Mutant lines have been shown to exhibit a hypersensitivity to the mycotoxin (Figure 2) whereas overexpressing lines showed a strong tolerance to DON, as compared to the wild-type line (Figure 1). A previous study has reported the inhibitory effect of DON on root elongation in Arabidopsis and wheat plants (Masuda et al., 2007). The authors also mentioned an abnormal morphology of DON-treated Arabidopsis roots (Masuda et al., 2007). In our work, the observation of DON-treated roots of mutant lines allowed us to examine more precisely such effects. Root cells appeared largely disorganized, leading to the inability to distinguish root apex properly (Figure 3). These effects were not observed on the wild-type line even in the presence of the mycotoxin. Such observations are reminiscent of phenotypes due to hormonal deregulation, in particular of an auxin deficiency (Ubeda-Tomas et al., 2012). So far, *F. graminearum* has been shown to induce jasmonate and ethylene pathways

(Ding et al., 2011; Gottwald et al., 2012) but there are no reports of a modulation of other plant hormones biosynthesis and/or signaling pathway. More detailed experiments will have to be conducted in *B. distachyon* to decipher the mechanism(s) underlining this effect on root apexes.

The Bradi5g03300 UGT is involved in resistance to *F. graminearum*

Bradi5g03300 mutant and overexpressing lines were challenged with *F. graminearum* in order to determine whether DON glucosylation could be directly connected to resistance to FHB. As described in previous studies on FHB, we used two infection assays, point inoculations and spray inoculations (Medianer et al., 2003). Whereas the first one allows scoring for the extent of spikelets and spikes colonization (type II resistance), the second estimates both primary infection (type I resistance) and organ colonization. The lines overexpressing the *Bradi5g03300* gene were shown to exhibit increased tolerance to *F. graminearum* whatever inoculation method used. Moreover, the level of resistance correlated well with the level of *Bradi5g03300* overexpression (Figure 4 and Figure 6). DON-3-*O*-glucoside has been established as a resistance-related metabolite in a number of studies on wheat (Gunnaiah et al., 2012) or barley (Kumaraswamy et al., 2011a; Kumaraswamy et al., 2011b). In transcriptome studies, this has been evidenced by the up-regulation of genes encoding UGTs (Lemmens et al., 2005; Boddu et al., 2007; Gardiner et al., 2010; Lulin et al., 2010; Gottwald et al., 2012). However, in these works, the differences of gene expression patterns between FHB resistant and susceptible lines were partially due to their genetic background differences rather than the differences for specific resistance locus (Jia et al., 2009). In a recent study using wheat near-isogenic lines no differential induction of genes encoding UGTs could be detected, suggesting that glucosylation of DON may not be associated with resistance to FHB in any genetic background. Our work on *B. distachyon* lines differing by single mutations or inserted construct allowed us to determine unambiguously the direct relationship between the *in planta* formation of DON-3-*O*-glucoside and resistance to FHB.

The mutant lines isolated through TILLING showed a significant increased susceptibility in spray inoculation assays (Figure 4). In contrast, no significant differences were observed with the wild-type line after point inoculations (Figure 6), a method specifically testing for symptoms spread along the spikes. So far, DON production has been reported as a virulence factor that contributes to spikes colonization in wheat but not in barley, a host plant exhibiting a high level of type II resistance (Bai et al., 2002; Maier et al., 2006). We have previously

shown that in *B. distachyon*, a *F. graminearum tri5* mutant strain, unable to produce DON, was delayed in spike colonization (Pasquet et al., 2014), which suggests that DON is a virulence factor for *F. graminearum* to infect *B. distachyon* but to a lesser extent than for wheat. Two hypotheses could be raised to explain the results obtained on the mutant lines. The first one is that another *B. distachyon* UGT could, in the absence of a functional Bradi5g03300 UGT, glucosylate DON and therefore compensate any effect of the *Bradi5g03300* gene mutation. In a recent study, another UGT-encoding gene localized in the same genomic region, *Bradi5g02780*, has been shown to exhibit a slight activity on DON when expressed in a yeast heterologous system (Schweiger et al., 2013b) and could be a candidate enzyme. The second hypothesis is that DON may act as a virulence factor not only during the colonization phase but also for primary infection. If this second hypothesis is confirmed, our results show that, rather than DON glucosylation in itself, insufficient *per se* to establish a good level of quantitative resistance, an early conjugation of the mycotoxin, as soon as the fungus starts producing it, is essential to lead to a rapid arrest of the pathogen. Because of the complexity of the corresponding assays, type I resistance has been poorly investigated in selection processes of FHB-resistant cereal crops varieties (Gosman et al., 2010). These aspects are worth being reconsidered for improving resistance.

Is the Bradi5g03300 specific for DON?

The *B. distachyon* Bradi5g03300 UGT belongs to group L (subgroup L1) of secondary metabolism glycosyltransferases which includes Arabidopsis UGT74 sequences and the IAGlu protein from *Zea mays* (Schweiger et al., 2013b). UGT74B1 and UGT74C1 were both shown to be thiohydroximate *S*-glycosyltransferases thus involved in glucosinolate biosynthesis (Grubb et al., 2014), UGT74C1 being an accessory enzyme. In addition, insertional mutants of the *UGT74B1* gene exhibited strong developmental phenotypes linked to auxin accumulation (Grubb et al., 2004). Both Arabidopsis UGT74D1 (Jin et al., 2013; Tanaka et al., 2014), UGT74E2 (Tognetti et al., 2010) and *Z. mays* IAGLU (Szerszen et al., 1994) were demonstrated to catalyze the glucosylation of one or several auxins such as indole-3-butyric acid, indole-3-acetic acid and naphthaleneacetic acid. Arabidopsis lines overexpressing the *UGT74D1* gene exhibited a mutant phenotype reminiscent of a deficiency in auxin content (Jin et al., 2013). Dean and Delaney (2008) have shown that UGT74F1 and F2 both produce salicylic acid (SA) 2-*O*- β -D-glucose (SAG) and that UGT74F2 also forms SA glucose ester. Apart from metabolic differences, no phenotype was associated with the mutations in any of the two genes (Dean and Delaney, 2008).

In our work, neither the mutant lines nor the overexpressing lines used in our study were shown to exhibit any developmental phenotype (Figure S1). These observations suggest that the Bradi5g03300 UGT is not essential for the plant but could also be due to partial functional redundancy with other UGTs. Comparative large profiling metabolomic studies on wild-type and overexpressing lines should be conducted to determine more precisely whether Bradi5g03300 is specific for DON or may fulfill another role in *B. distachyon*.

METHODS

Plant material and growth conditions

B. distachyon lines (Table 1) were cultivated in a growth chamber under a 20 h light period at 23°C +/- 2°C under fluorescent light (265 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at the soil level and approx. 315 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at the spikes' level). Prior to sowing, seeds were surface sterilized by incubation in a 0.6% sodium hypochlorite solution during 10 min with gentle shaking followed by three rinses in sterile distilled water. Sterilized seeds were subsequently incubated for five days at 4°C in the dark. Plants were grown routinely on a 2:1 mixture of compost (Tref terreau P1, Jiffy France SARL, Trevoux, France) and standard perlite (Sinclair, Gainsborough, UK), soaked with an aqueous solution containing a carbamate fungicide (Previcur at 2 mL/L, Bayer Crop Sciences, Lyon, France) and a larvicide (Hortigard at 1 g/L, Syngenta France, Guyancourt, France). Plants were usually watered in two- to three-days intervals using a standard nutritional solution and were never allowed to stand in water.

Screening of TILLING mutants collection

We have screened the TILLING collection (<http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb>) available at Institut Jean-Pierre Bourgin (INRA, Versailles, France) for putative point mutations in a fragment of the *Bradi5g03300* gene encompassing the PSPG box-encoding region. Screening was conducted at the Unité de Recherche en Génomique Végétale, (INRA, Evry, France) as described in Dalmais et al. (2013). Specific primers used for the generation of the *Bradi5g03300* PCR product were the following: UGT33N1F2 (5'-GTC-ACT-ACC-ACC-AAA-TAT-TTG-GG-3') and UGT33N1R1 (5'-CAA-AGA-CCA-GAA-ATG-ATG-TAG-GAG-G-3') for the first amplification and 3300_N2Ft1 (5'-GGT-ACT-TGG-TTG-TTG-ATA-GTT-ATG-C-3') and 3300_N2Rt1 (5'-GTG-TGC-TCC-TTC-GGC-CC-3') for the second amplification (Figure S1).

Binary vector construction

The *Bradi5g03300* cDNA was amplified from spikelets cDNAs using the primers 5'-CGGGATCCCGATGGACAGCACAGGCAAATCGGTGATGGCGA-3' and 5'-GGATATCCTTAACTTGACGAATACTTAGCAGCGAATTCAGC-A-3', adding a *Bam*HI and an *Eco*RV restriction site, respectively (indicated in italics and underlines in the primers sequence). The PCR product was digested using the *Bam*HI and an *Eco*RV restriction enzymes, purified using a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel EURL,

Hoerdt, France) using the manufacturer's instructions then ligated into the pENTR1A plasmid linearized by the same restriction enzymes. The resulting pEntry-OE3300 plasmid was used to transfer *Bradi5g03300* cDNA fragment into the pIPKb002 binary vector (Himmelbach et al., 2007) by *in vitro* recombination using the Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen™, Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France).

***Brachypodium distachyon* transformation**

The pIPKb002-Bradi5g03300 binary vector was electroporated into *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1 strains). The Bd21-3 wild-type line was genetically transformed using a method adapted from that described by Vogel and Hill (2008) and Alves et al. (2009). After selection of transformants in Murashige & Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 50 mg/L hygromycin, segregation analysis was used to identify single locus insertion lines in the T2 generation.

***In vitro* root assays and observations**

For root test *in vitro* we have removed the palea of seeds and it was surface sterilized by incubation in a 0.6% sodium hypochlorite solution for 5 min with gentle shaking followed by three rinses in sterile distilled water. Sterilized seeds were subsequently incubated for five days at 4°C in the dark. Seeds were sown on Murashige & Skoog medium with 3% saccharose and vitamins (100 mg of myo-inositol and 0.1 mg of thiamin-HCl by liter of media) in Petri square (12*12) with or without deoxynivalenol (Sigma-Aldrich, Lyon, France). During two days, Petri squares were placed into darkness and then transferred to the light for five days (described photoperiod previously). Roots were protected from the light by application of a sheet of aluminum around the box.

After 7 days of growth, the root were fixed during 24 hours in a ethanol/acetic acid solution (3/1, v/v), washed 20 min in 70% ethanol solution and incubated overnight at room temperature in chloral hydrate solution (8 g of chloral hydrate (Sigma), 2 mL of 50% glycerol and 1 mL of water). The roots are observed in differential interference contrast, images were captured on a macroscope (AZ100, NIKON) with a video camera Nikon RI1.

***F. graminearum* strains maintenance and spore production**

F. graminearum strains PH-1 (*FgDON*⁺) and Δ *tri5* (*FgDON*⁻) (MU102 mutant strain, Cuzick et al., 2008) were maintained on PDA plates. To obtain spores, 2-4 mm² plugs from 15-day old PDA plates were inoculated in liquid mung bean medium (Bai and Shaner 1996, 10 plugs for 20 mL) and incubated at 150 rpm at room temperature for five to six days. The resulting spore suspension was then diluted ten times in fresh liquid mung bean medium and further incubated for five to six additional days under the same conditions. For pathogenicity assays, spores were further filtrated onto sterile Miracloth (Calbiochem, Toulouse, France) and resuspended in 0.01% Tween 20 at a final concentration of 10⁵ spores/mL.

Pathogenicity assays

Inoculation was performed by pipetting 300 spores (3 μ L of a 10⁵ spores/mL suspension) into a central floral cavity of the second spikelet starting from the top of the spike of different lines at mid-anthesis (approx. 30 to 35 days after sowing) or whole plants were sprayed until with fungal conidial suspension (1 \times 10⁵ conidia/mL), amended with 0.01% of Tween 20 (approximately 20 mL of fungal conidial suspension for one pot of five plants).

Inoculated plants were covered with clear plastic bags sprayed with distilled water beforehand. The first 24 h inoculated heads were kept in the dark, then incubated with a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness at 20°C with light intensities similar to the ones used for plant development (see section plant growth conditions). Applications of 0.01% Tween 20 was performed as control condition for fungal infection.

Symptoms evaluation

For spray inoculations, symptoms were observed at 7, 10 and 14 days after spraying of conidia suspension. For experiments with TILLING lines (6829-7, 6491-37 and 8637-12), a spikelet was considered as symptomatic if the whole spikelet, that is all florets, were symptomatic. For experiments conducted with overexpressing lines (OE-9R5, OE-24R27 and OE-10R14), a spikelet was considered as symptomatic if at least half of the florets were symptomatic.

For point inoculations, symptoms were evaluated 7 and 14 days after inoculation with a scoring scale for each inoculated spike, from 0 to 4: 0, no symptoms; 1, only the inoculated floral cavity symptomatic (most frequently, only browning); 2, extension of symptoms to additional florets of the inoculated spikelet (browning or bleaching); 3, the inoculated spikelet

in its whole is symptomatic; 4, extension of the symptoms to the whole inoculated spikelet and at least one adjacent spikelet.

RNA extraction

Either leaves from three 2-week old plants or five spikelets from independent plants were ground in liquid nitrogen and total RNA was extracted from 0.1 g of the resulting powder using TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France) followed by an RNase-free DNase I step (Ambion®, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to manufacturers' instructions. Total RNA was further purified using the NucleoSpin RNA Clean-up XS kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

DNA extraction and fungal DNA quantification by qPCR

For genomic DNA extraction, ten spikes spray-inoculated with either of the two *F. graminearum* strains used in this study were pooled. Genomic DNA was extracted as described by Atoui et al. (2012). Quantification of fungal DNA was realized by qPCR (see below) on 10 ng of total DNA using primers specific for the 18S ribosomal subunit-encoding genomic region (Mudge et al., 2006, Table S2).

Real-time PCR

cDNA synthesis was performed on 1 µg of total RNA using the ImProm-II™ reverse transcription system (Promega France, Melun-les-Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. The resulting product was diluted 10 times in nuclease-free water. Primers were designed to amplify 3 plant gene transcripts, including reference genes *Bradi4g00660* (*UBC18*) and *Bradi4g41850* (*ACT7*, now referred to as *ACT3*-like under accession number XM_003578821 in the nucleotide NCBI database) as previously determined by Hong et al. (2008) (Table S2). qPCR reactions were performed on 2 µL of the diluted cDNA product using 8 pmoles of each specific primer and 10 µL of SYBRGreen Master Mix in a final volume of 20 µL. Reactions were performed in a Light Cycler LC480 Real-time PCR system (Roche Diagnostics, Meylan, France). All qRT-PCR reactions were carried out on biological triplicates, each in technical duplicate. The final threshold cycle (Ct) values were the mean of six values (biological triplicates, each with technical duplicate). The comparative $\Delta\Delta C_t$ method was used to evaluate the relative quantities of each amplified product in the samples. The Ct was automatically determined for each reaction by the Light Cycler LC480 Real-time PCR system set with default parameters. The specificity of the qRT-

PCR reactions was determined by melt curve analysis of the amplified products using the standard method installed in the system.

Mycotoxin extraction and analysis

500 mg of fresh ground material (spikes or spikelets infected by PH1 strain) was extracted with 7 mL of acetonitrile/water (84/16, v/v) during one hour at room temperature on a tube rotator (50 rpm). Before extraction, 0.5 µg of fusarenon X (4-acetyl-nivalenol, Romers Lab, Tulln, Austria) was added in each sample for use as internal standard. After centrifugation (5 min at 5000 g), supernatant is purified on Trichotecenes P columns (P51 R-Biopharm) and 3 ml of filtrate were evaporated at 50°C dryness of nitrogen. The pellet was resuspended in 400 µl of methanol/water (50/50, v/v) and filtered through a 0.20 µM filter before analysis. DON, DON-3-O-glucose, 15-ADON and fusarenon X concentrations were determined using HPLC-MS/MS analyses. These analyses were performed using a QTrap 2000 LC/MS/MS system (Applied Biosystems) equipped with a 1100 Series HPLC system (Agilent), a reverse phase Kinetex™ 2.6 µm XB-C18 column (150x4.6 mm, Phenomenex) and a TurboIonSpray ESI source. Solvent A consisted of methanol/water (10/90, v/v) and solvent B consisted of methanol / water (90/10, v/v). The flow rate was kept at 700µL/min and was split so that 300µL/min went to the electrospray source. Gradient elution was performed with the following conditions: 8 min held at 80% A, 4 min with a linear gradient from 80% to 5% A, 4 min held at 5% A, 1 min linear gradient from 5% to 80% A. The injection volume was 10 µL. The electrospray interface was used in the negative ion mode at 400°C with the following settings: curtain gas, 20 p.s.i.; nebulizer gas, 30 p.s.i.; auxiliary gas, 70 p.s.i.; ion spray voltage, -4200 V; declustering potential, -30 V; entrance potential, -10 V; collision energy, -30 eV; collision-activated dissociation gas, medium. Quantification was performed using external calibration with DON (Sigma-Aldrich, Lyon, France), DON-3-O-glucose (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 15-ADON (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and fusarenon X standard solutions, ranging from 10 to 1000 ng/mL.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Bradi5g03300* gene.

Supplemental Figure 2. Phenotypes of the mutant line 6829-7 and overexpressing line OE-10R14 as compared with the wild-type line Bd21-3.

Supplemental Figure 3. Relative expression of the *Bradi5g03300* gene in leaves of overexpressing lines OE-9R5, OE-10R14, OE-18R22 and OE-24R27.

Supplemental Table 1. Characteristics of the mutant families identified in the *Bradi5g03300* gene following screening of the Bd21-3 TILLING collection.

Supplemental Table 2. List of primers used in qPCR experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the National Centre of Scientific Research (CNRS) and a grant “Attractivité” from Université Paris-Sud obtained by MD. JCP has a PhD fellowship from the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jean-Claude Pasquet, Oumaya Bouchabké-Coussa, Marion Dalmais, Vessela Atanasova-Pénichon and Marie Dufresne conceived and designed the experiments. Jean-Claude Pasquet, Catherine Macadré, Camille Soulhat, Oumaya Bouchabké-Coussa, Marion Dalmais, Vessela Atanasova-Pénichon and Marie Dufresne conducted the experiments and analyzed the data. Jean-Claude Pasquet, Patrick Saindrenan and Marie Dufresne drafted the manuscript and Marie Dufresne supervised the project. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Alves, S.C., Worland, B., Thole, V., Snape, J.W., Bevan, M.W., and Vain, P. (2009). A protocol for Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nat Protoc* **4**, 638-649.
- Atoui, A., El Khoury, A., Kallassy, M., and Lebrihi, A. (2012). Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *Int J Food Microbiol* **154**, 59-65.
- Bai, G.-H., and Shaner, G. (1996). Variation in *Fusarium graminearum* and Cultivar Resistance to Wheat Scab. *Plant Disease* **80**, 975-979.
- Bai, G.H., Desjardins, A.E., and Plattner, R.D. (2002). Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* **153**, 91-98.
- Boddu, J., Cho, S., and Muehlbauer, G.J. (2007). Transcriptome analysis of trichothecene-induced gene expression in barley. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1364-1375.
- Boddu, J., Cho, S., Kruger, W.M., and Muehlbauer, G.J. (2006). Transcriptome analysis of the barley-*Fusarium graminearum* interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 407-417.
- 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.
- Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B., and Saindrenan, P. (2002). Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* **14**, 1093-1107.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., and Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* **2**, 144-151.
- Cuzick, A., Urban, M., and Hammond-Kosack, K. (2008). *Fusarium graminearum* gene deletion mutants *map1* and *tri5* reveal similarities and differences in the pathogenicity requirements to cause disease on *Arabidopsis* and wheat floral tissue. *New Phytol* **177**, 990-1000.
- Dalmais, M., Antelme, S., Ho-Yue-Kuang, S., Wang, Y., Darracq, O., d'Yvoire, M.B., Cezard, L., Legee, F., Blondet, E., Oria, N., Troadec, C., Brunaud, V., Jouanin, L., Hofte, H., Bendahmane, A., Lapierre, C., and Sibout, R. (2013). A TILLING Platform for Functional Genomics in *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* **8**, e65503.
- Dean, J.V., and Delaney, S.P. (2008). Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **132**, 417-425.
- Desmond, O.J., Manners, J.M., Stephens, A.E., Maclean, D.J., Schenk, P.M., Gardiner, D.M., Munn, A.L., and Kazan, K. (2008). The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol Plant Pathol* **9**, 435-445.
- Ding, L., Xu, H., Yi, H., Yang, L., Kong, Z., Zhang, L., Xue, S., Jia, H., and Ma, Z. (2011). Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS ONE* **6**, e19008.
- Falter, C., and Voigt, C. (2014). Comparative Cellular Analysis of Pathogenic Fungi with a Disease Incidence in *Brachypodium distachyon* and *Miscanthus x giganteus*. *BioEnergy Research* **7**, 958-973.

- Foroud, N.A., and Eudes, F.** (2009). Trichothecenes in cereal grains. *Int J Mol Sci* **10**, 147-173.
- Gachon, C.M., Langlois-Meurinne, M., and Saindrenan, P.** (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci* **10**, 542-549.
- Gardiner, S.A., Boddu, J., Berthiller, F., Hametner, C., Stupar, R.M., Adam, G., and Muehlbauer, G.J.** (2010). Transcriptome analysis of the barley-deoxynivalenol interaction: evidence for a role of glutathione in deoxynivalenol detoxification. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 962-976.
- Gosman, N., Srinivasachary, Steed, A., Chandler, E., Thomsett, M., and Nicholson, P.** (2010). Evaluation of type I fusarium head blight resistance of wheat using non-deoxynivalenol-producing fungi. *Plant Pathology* **59**, 147-157.
- Gottwald, S., Samans, B., Luck, 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.
- Grubb, C.D., Zipp, B.J., Ludwig-Muller, J., Masuno, M.N., Molinski, T.F., and Abel, S.** (2004). Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J* **40**, 893-908.
- Himmelbach, A., Zierold, U., Hensel, G., Riechen, J., Douchkov, D., Schweizer, P., and Kumlehn, J.** (2007). A set of modular binary vectors for transformation of cereals. *Plant Physiol* **145**, 1192-1200.
- Hong, S.Y., Seo, P.J., Yang, M.S., Xiang, F., and Park, C.M.** (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology* **8**, 112.
- Jia, H., Cho, S., and Muehlbauer, G.J.** (2009). Transcriptome analysis of a wheat near-isogenic line pair carrying Fusarium head blight-resistant and -susceptible alleles. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 1366-1378.
- Jin, S.-H., Ma, X.-M., Han, P., Wang, B., Sun, Y.-G., Zhang, G.-Z., Li, Y.-J., and Hou, B.-K.** (2013). UGT74D1 Is a Novel Auxin Glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **8**, e61705.
- Jones, P., Messner, B., Nakajima, J., Schaffner, A.R., and Saito, K.** (2003). UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**, 43910-43918.
- 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. *Mol Plant Pathol* **13**, 399-413.
- Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T.J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., and Yamaguchi, I.** (2003). The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Lett* **539**, 105-110.
- Kugler, K.G., Siegwart, G., Nussbaumer, T., Ametz, C., Spannagl, M., Steiner, B., Lemmens, M., Mayer, K.F., Buerstmayr, H., and Schweiger, W.** (2013). Quantitative trait loci-dependent analysis of a gene co-expression network associated with Fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics* **14**, 728.
- Kumaraswamy, G.K., Kushalappa, A.C., Choo, T.M., Dion, Y., and Rioux, S.** (2011a). Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*). *J Chem Ecol* **37**, 846-856.

- Kumaraswamy, G.K., Bollina, V., Kushalappa, A., Choo, T., Dion, Y., Rioux, S., Mamer, O., and Faubert, D.** (2011b). Metabolomics technology to phenotype resistance in barley against *Gibberella zeae*. *European Journal of Plant Pathology* **130**, 29-43.
- Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterhazy, A., Krska, R., and Ruckebauer, P.** (2005). The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1318-1324.
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.K., and Bowles, D.J.** (2001). Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 4338-4343.
- Lulin, M., Yi, S., Aizhong, C., Zengjun, Q., Liping, X., Peidu, C., Dajun, L., and Xiu, E.W.** (2010). Molecular cloning and characterization of an up-regulated UDP-glucosyltransferase gene induced by DON from *Triticum aestivum* L. cv. Wangshuibai. *Mol Biol Rep* **37**, 785-795.
- Maier, F.J., Miedaner, T., Hadel, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H., and Schäfer, W.** (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* **7**, 449-461.
- Mandadi, K.K., and Scholthof, K.B.** (2012). Characterization of a viral synergism in the monocot *Brachypodium distachyon* reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease. *Plant Physiol* **160**, 1432-1452.
- Masuda, D., Ishida, M., Yamaguchi, K., Yamaguchi, I., Kimura, M., and Nishiuchi, T.** (2007). Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **58**, 1617-1626.
- Meßner, B., Thulke, O., and Schaffner, A.R.** (2003). *Arabidopsis* glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* **217**, 138-146.
- Miedaner, T., Moldovan, M., and Ittu, M.** (2003). Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to fusarium head blight in a multienvironment wheat trial. *Phytopathology* **93**, 1068-1072.
- Miller, J.D.** (2008). Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **25**, 219-230.
- Mudge, A.M., Dill-Macky, R., Dong, Y., Gardiner, D.M., White, R.G., and Manners, J.M.** (2006). A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **69**, 73-85.
- Mur, L.A., Allainguillaume, J., Catalan, P., Hasterok, R., Jenkins, G., Lesniewska, K., Thomas, I., and Vogel, J.** (2011). Exploiting the *Brachypodium* Tool Box in cereal and grass research. *New Phytol* **191**, 334-347.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Osmani, S.A., Bak, S., and Moller, B.L.** (2009). Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* **70**, 325-347.
- Pasquet, J.C., Chaouch, S., Macadre, C., Balzergue, S., Huguet, S., Martin-Magniette, M.L., Bellvert, F., Deguercy, X., Thareau, V., Heintz, D., Saindrenan, P., and Dufresne, M.** (2014). Differential gene expression and metabolomic analyses of *Brachypodium distachyon* infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics* **15**, 629.

- Peraldi, A., Beccari, G., Steed, A., and Nicholson, P.** (2011). *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study *Fusarium* head blight and other *Fusarium* diseases of wheat. *BMC Plant Biology* **11**, 100.
- Peraldi, A., Griffe, L.L., Burt, C., McGrann, G.R.D., and Nicholson, P.** (2014). *Brachypodium distachyon* exhibits compatible interactions with *Oculimacula* spp. and *Ramularia collo-cygni*, providing the first pathosystem model to study eyespot and ramularia leaf spot diseases. *Plant Pathology* **63**, 554-562.
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glossl, J., Luschnig, C., and Adam, G.** (2003). Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**, 47905-47914.
- Poppenberger, B., Fujioka, S., Soeno, K., George, G.L., Vaistij, F.E., Hiranuma, S., Seto, H., Takatsuto, S., Adam, G., Yoshida, S., and Bowles, D.** (2005). The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15253-15258.
- Priest, D.M., Jackson, R.G., Ashford, D.A., Abrams, S.R., and Bowles, D.J.** (2005). The use of abscisic acid analogues to analyse the substrate selectivity of UGT71B6, a UDP-glycosyltransferase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **579**, 4454-4458.
- Rocha, O., Ansari, K., and Doohan, F.M.** (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam* **22**, 369-378.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E., and Bowles, D.J.** (2001). Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3004.
- Sado, P.E., Tessier, D., Vasseur, M., Elmorjani, K., Guillon, F., and Saulnier, L.** (2009). Integrating genes and phenotype: a wheat-*Arabidopsis*-rice glycosyltransferase database for candidate gene analyses. *Funct Integr Genomics* **9**, 43-58.
- Sandoya, G.V., and Buanafina, M.M.d.O.** (2014). Differential responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to insect and fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **85**, 53-64.
- Schweiger, W., Boddu, J., Shin, S., Poppenberger, B., Berthiller, F., Lemmens, M., Muehlbauer, G.J., and Adam, G.** (2010). Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 977-986.
- Schweiger, W., Steiner, B., Ametz, C., Siegwart, G., Wiesenberger, G., Berthiller, F., Lemmens, M., Jia, H., Adam, G., Muehlbauer, G.J., Kreil, D.P., and Buerstmayr, H.** (2013a). Transcriptomic characterization of two major *Fusarium* resistance quantitative trait loci (QTLs), *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*, identifies novel candidate genes. *Mol Plant Pathol* **14**, 772-785.
- Schweiger, W., Pasquet, J.C., Nussbaumer, T., Paris, M.P., Wiesenberger, G., Macadre, C., Ametz, C., Berthiller, F., Lemmens, M., Saindrenan, P., Mewes, H.W., Mayer, K.F., Dufresne, M., and Adam, G.** (2013b). Functional characterization of two clusters of *Brachypodium distachyon* UDP-glycosyltransferases encoding putative deoxynivalenol detoxification genes. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 781-792.
- Shin, S., Torres-Acosta, J.A., Heinen, S.J., McCormick, S., Lemmens, M., Paris, M.P., Berthiller, F., Adam, G., and Muehlbauer, G.J.** (2012). Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a barley UDP-glucosyltransferase exhibit resistance to the mycotoxin deoxynivalenol. *J Exp Bot* **63**, 4731-4740.
- Szerszen, J.B., Szczyglowski, K., and Bandurski, R.S.** (1994). *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* **265**, 1699-1701.

- Tanaka, K., Hayashi, K., Natsume, M., Kamiya, Y., Sakakibara, H., Kawaide, H., and Kasahara, H.** (2014). UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **55**, 218-228.
- Tognetti, V.B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandenbroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., Genty, B., Stubbs, K.A., Inze, D., and Van Breusegem, F.** (2010). Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance. *Plant Cell* **22**, 2660-2679.
- Ubeda-Tomas, S., Beemster, G.T., and Bennett, M.J.** (2012). Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci* **17**, 326-331.
- Vogel, J., and Hill, T.** (2008). High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* **27**, 471-478.
- von Saint Paul, V., Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Kessler, T., Schmitt-Kopplin, P., and Schaffner, A.R.** (2011). The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell* **23**, 4124-4145.
- Yazar, S., and Omurtag, G.I.** (2008). Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences* **9**, 2062-2090.
- Zhang, X., Fu, J., Hiromasa, Y., Pan, H., and Bai, G.** (2013). Differentially expressed proteins associated with Fusarium head blight resistance in wheat. *PLoS ONE* **8**, e82079.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Overexpression of the *Bradi5g03300* gene is related to root tolerance to DON.

A. Ratio of expression of the *Bradi5g03300* gene in spikelets at mid-anthesis of OE lines as compared with the Bd 21-3 wild-type line. The relative quantity of gene transcripts was calculated using the comparative cycle threshold method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). The *B. distachyon UBC18* and *ACT7* gene (*Bradi4g00660* and *Bradi4g41850*) were used as endogenous controls to normalize the data for differences in input RNA between the different samples. Data represent mean values of three independent biological experiments, error bars represent the standard deviation. **B.** Percentage of root growth inhibition by 50 μ M DON measured on 7 days old seedling ($n > 30$, error bars represent the standard error, different letters indicate significant differences between conditions; Duncan test, $p\text{-value} \leq 1.10^{-4}$). NS: null segregant.

Figure 2. Mutations in the *Bradi5g03300* dramatically increase root sensitivity to DON.

A. Root length of Bd21-3 wild-type, 6829-3 control and the three mutant lines on medium with or without 10 μ M DON measured on 7 days old seedling ($n > 30$, error bars represent the standard error, different letters indicate significant differences between conditions; Duncan test, $p\text{-value} \leq 1.10^{-4}$). **B.** Photograph showing typical root development of plants from each line grown for 7 days on agar medium containing 10 μ M DON. Bars: 1 cm. The insert corresponds to a magnification of the 6829-7 plant.

Figure 3. DON induces root apex disorganization in *Bradi5g03300* mutant lines but not in the Bd21-3 wild-type line. Root apex of the wild-type line (**A, B**) and the mutant line 6829-7 (**C, D**) on agar medium without (**A, C**) or with 10 μ M DON (**B, D**). Bars: 2 mm.

Figure 4. Mutations in and overexpression of the *Bradi5g03300* gene increase susceptibility and resistance, respectively, to *F. graminearum* following spray inoculation. **A, B.** Typical FHB symptoms observed on mutant lines (**A**) or overexpressing lines (**B**) 7 days after spray inoculation by the *Fg* DON⁺ strain. Bars: 1 cm. **C.** Percentage of spikelets exhibiting FHB symptoms on the entire inoculated spikelet, 7 (grey bars) and 10 days (black bars) after spray inoculation by fungal strain *Fg* DON⁺ ($n > 30$, error bars represent standard deviation, different letters indicate significant differences between conditions; Duncan test, $p\text{-value} \leq 0.01$). **D.** Percentage of spikelets exhibiting FHB symptoms on half or more of the florets of the inoculated spikelet 7 (grey bars) and 14 days (black bars) after spray inoculation by fungal strain *Fg* DON⁺ respectively ($n > 30$, error bars represent standard

deviation, different letters indicate significant differences between conditions; Duncan test, p-value ≤ 0.01).

Figure 5. *Bradi5g03300* contributes to resistance to *Fg* DON⁺ colonization. Quantification of fungal DNA by qPCR 7, 10 and 14 days after spray inoculation of spikes by the *Fg* DON⁺ strain. Data represent mean values of three independent biological experiments, error bars are representing the standard deviation (different letters indicate significant differences between conditions; Duncan test, p-value ≤ 0.01). Grey bars: Bd21-3, black bars: 6829-7, white bars: OE-10R14.

Figure 6. The *Bradi5g03300* gene is involved in the control of spike colonization by the *Fg* DON⁺ strain. **A.** Typical FHB symptoms on the different lines 7 days after point inoculation by the *Fg* DON⁺ strain. Bars: 1 cm. **B.** Quantification of FHB symptoms using a scoring scale (see Material and Methods section) 7 (grey bars) and 14 (back bars) days after point inoculation by fungal strain *Fg* DON⁺ (n>30, error bars represent the standard error, different letters indicate significant differences between conditions; Duncan test, p-value $\leq 1.10^{-4}$).

Figure 7. The *Bradi5g03300* UGT is involved in DON glucosylation and controls total DON produced *in planta* by the point inoculated *Fg* DON⁺ strain. **A.** D3G/DON ratio in whole spikes 14 days after infection. **B.** DON (dark grey bars), 15-ADON (white bars) and D3G (grey bars) absolute quantification in whole spikes 14 days after infection. **C.** D3G/DON ratio in infected spikelets during an infection time-course. **D.** DON (dark grey bars), 15-ADON (white bars) and D3G (grey bars) absolute quantification in infected spikelets, during an infection time-course. Data represent mean values of three independent biological experiments, error bars are representing the standard deviation (different letters indicate significant differences between conditions for the total quantities of DON (DON and D3G); Student test, **A** and **C**, p-value ≤ 0.05 , **B** and **D**, p-value ≤ 0.01).

Figure 8. Overexpression of the *Bradi5g03300* gene inhibits the transcriptional induction of the endogenous gene copy following infection. The ratio of expression of the *Bradi5g03300* in line OE-10R14 as compared to Bd21-3 was determined by qPCR during an infection time-course on spikelets either mock- (grey bars) or *Fg* DON⁺- (black bars) inoculated. The relative quantity of gene transcripts was calculated using the comparative

cycle threshold method (2^{-DDCt}). *B. distachyon* *UBC18* and *ACT7* genes (*Bradi4g00660* and *Bradi4g41850*) were used as endogenous controls to normalize the data for differences in input RNA between the different samples. Data represent mean values of three independent biological experiments, error bars represent the standard deviation.

Figure 9. *Bradi5g03300* is not involved in the control of *Fg* DON⁻ colonization. Quantification of fungal DNA by qPCR 7, 10 and 14 days after spray inoculation of spikes of the wild-type line Bd21-3 (grey bars), the 6829-7 mutant line (black bars) and the overexpressing line OE-10R14 (white bars). Data represent mean values of three independent biological experiments, error bars are representing the standard deviation (different letters indicate significant differences between conditions; Duncan test, p-value ≤ 0.01).

Table1: *Brachypodium distachyon* lines used in this study

Line name	Line type	Impact on the <i>Bradi5g03300</i> gene
Bd21-3	Wild type	-
6829-3	TILLING mutant	Wild-type allele
6829-7	TILLING mutant	Truncated protein (stop codon) W345*
6491-37	TILLING mutant	Truncated protein (stop codon) W366*
8637-12	TILLING mutant	Amino acid substitution (PSPG box) S368F
OE-5R36	Transformant (pIKB002- <i>Bradi5g03300</i>)	Over-expression
OE-9R5	Transformant (pIKB002- <i>Bradi5g03300</i>)	Over-expression
OE-18R22	Transformant (pIKB002- <i>Bradi5g03300</i>)	Over-expression
OE-24R27	Transformant (pIKB002- <i>Bradi5g03300</i>)	Over-expression
OE-10R14	Transformant (pIKB002- <i>Bradi5g03300</i>)	Over-expression

Figure 1

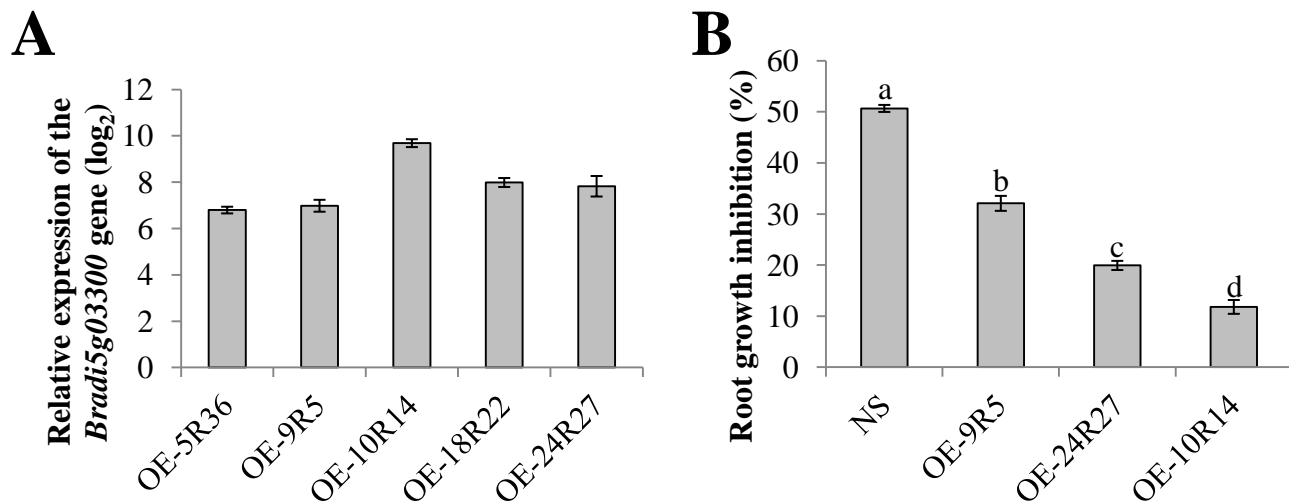
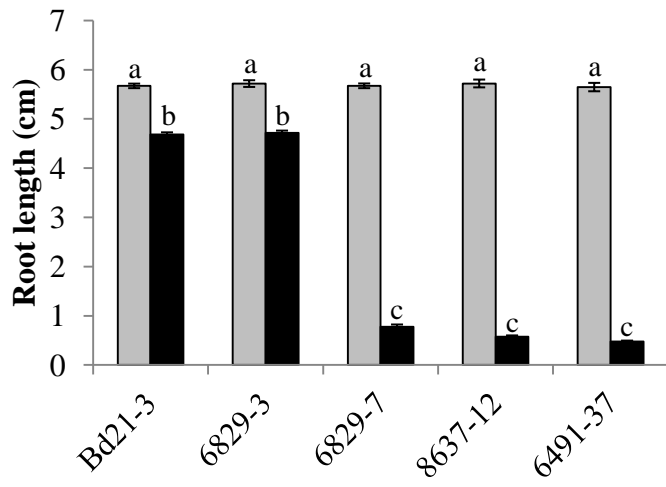


Figure 2

A



B



Figure 3

No DON

10 μ M DON

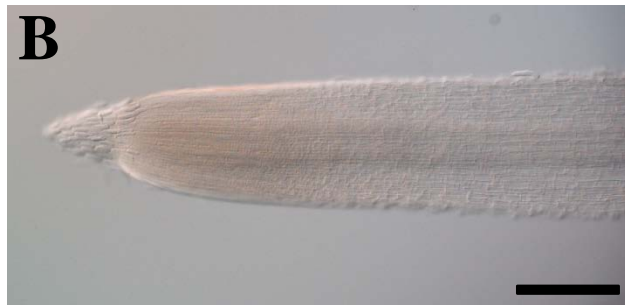
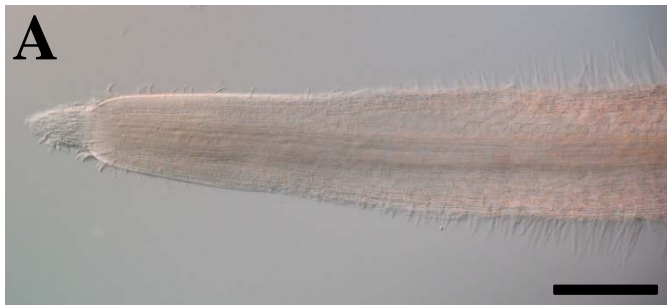
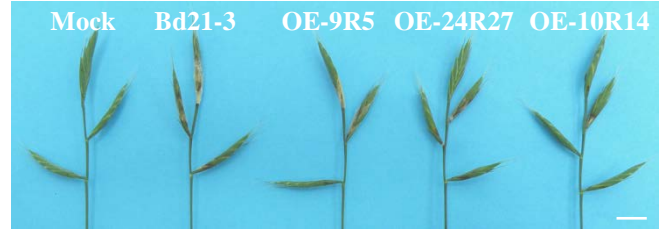


Figure 4

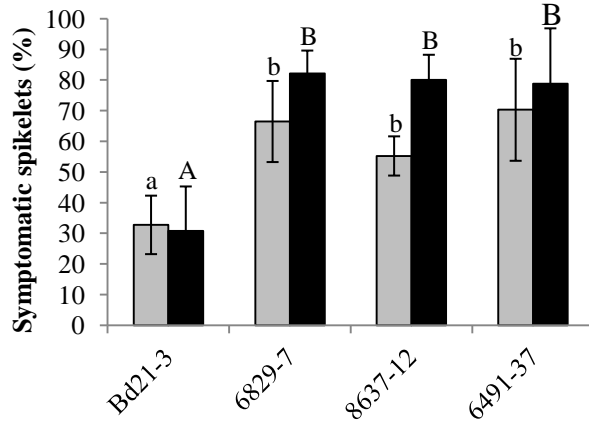
A



B



C



D

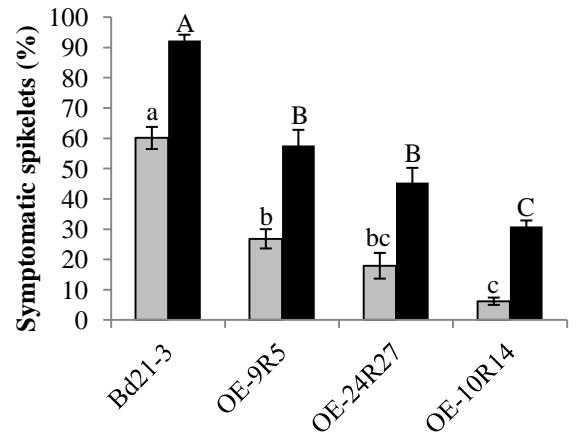


Figure 5

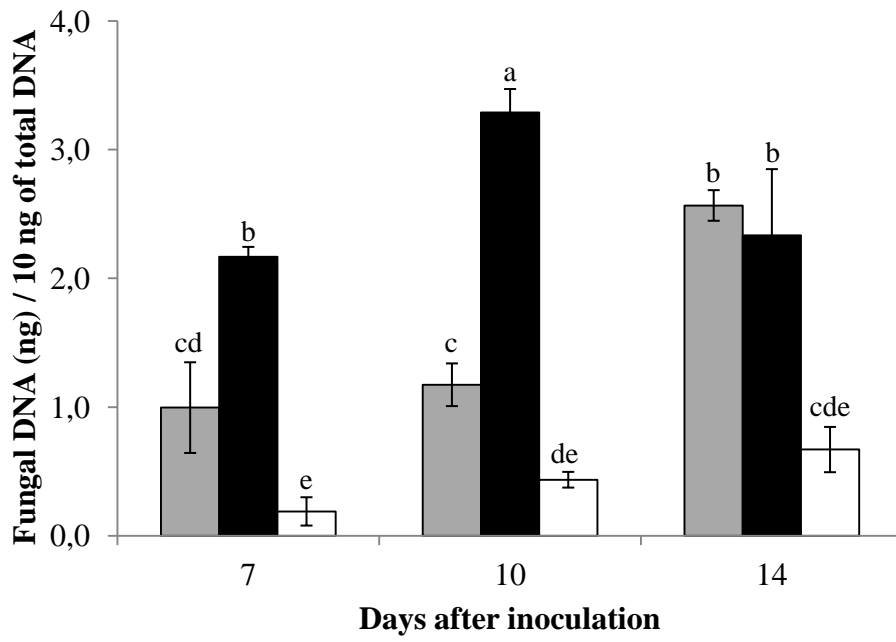


Figure 6

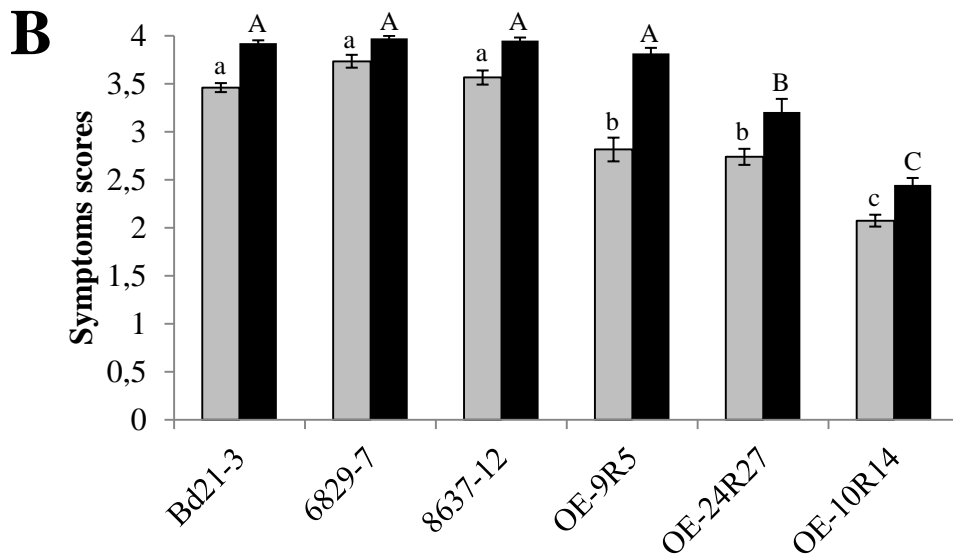
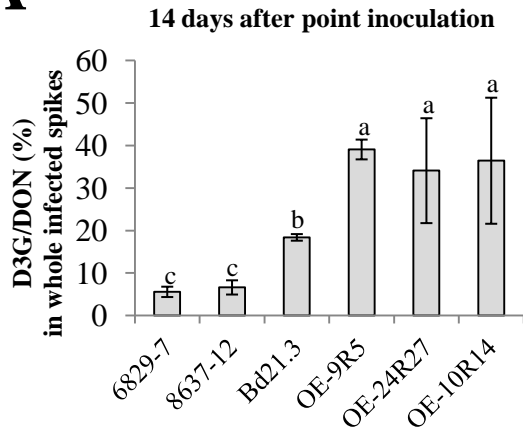
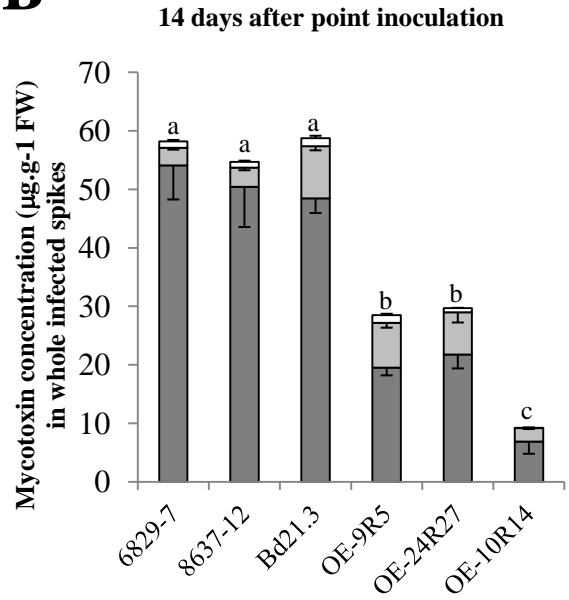


Figure 7

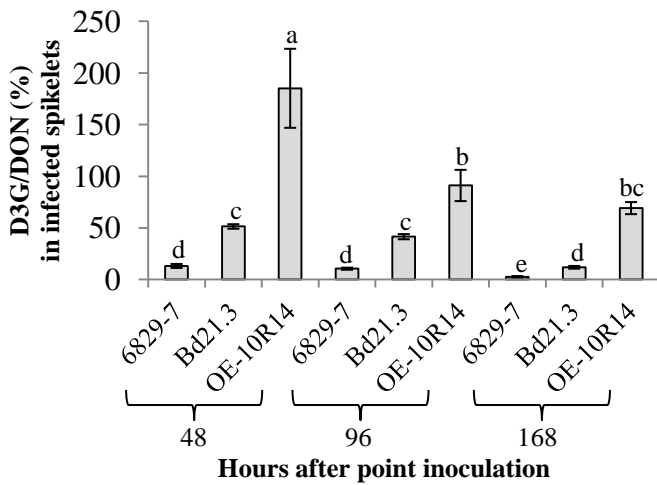
A



B



C



D

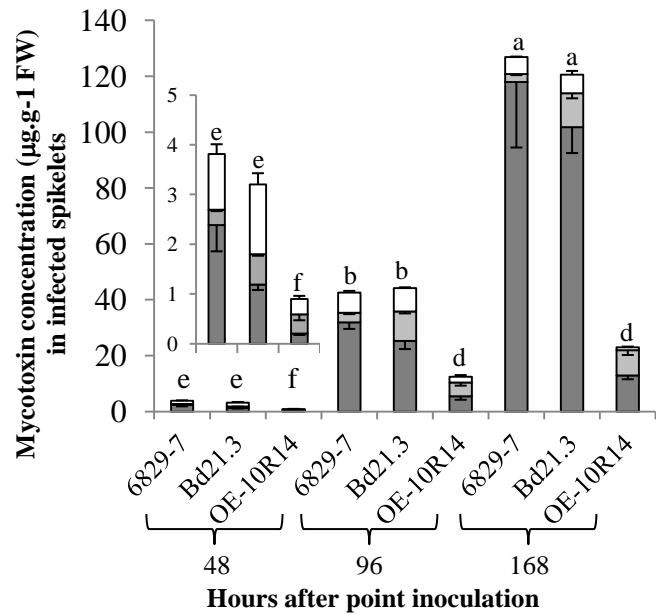


Figure 8

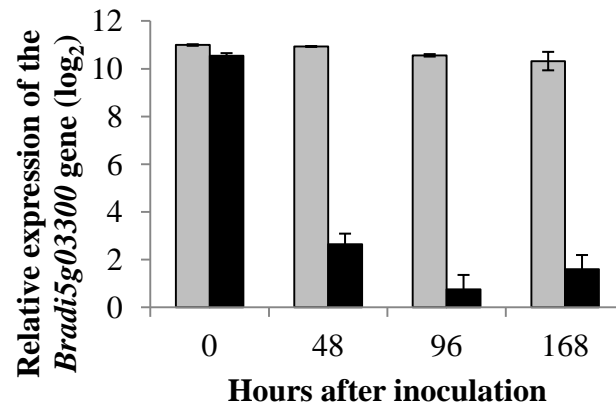
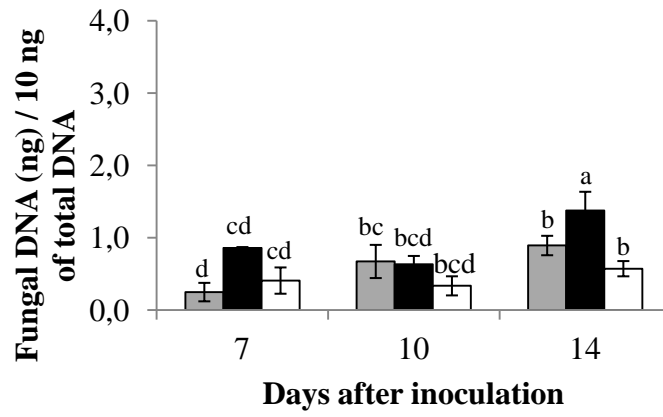


Figure 9



Supplemental Table 1. Characteristics of the mutant families identified in the *Bradi5g03300* gene following screening of the Bd21-3 TILLING collection.

Family name	Nucleic acid transition^a	Amino acid substitution^b	Mutation type^c	Location of the mutation
5617	G1477A	G269S	Missense	Exon 2
6570	C1542T	S290S	Silent	Exon 2
5648	C1585T	L305L	Silent	Exon 2
7273	G1589A	G306E	Missense	Exon 2
3698	G1660A	G330S	Missense	Exon 2
7079	G1686A	K337K	Silent	Exon 2
6829	G1707A	W345*	Nonsense	Exon 2 (PSPG box)
7850	C1726T	L352L	Silent	Exon 2 (PSPG box)
8156	C1778T	/	/	Intron 2
3658	G1792T	/	/	Intron 2
6491	G1878A	W366*	Nonsense	Exon 3 (PSPG box)
8637	C1883T	S368F	Missense	Exon 3 (PSPG box)
7945	G1922A	G381E	Missense	Exon 3 (PSPG box)
3714	A1923C	G381G	Silent	Exon 3 (PSPG box)
5775	G1966A	E396K	Missense	Exon 3

^aLocation of the point mutation in mutants are relative to the starting ATG on the genomic DNA sequence.

^bLocation of the amino acid substitution in mutants are relative to the starting methionine of the encoded protein.

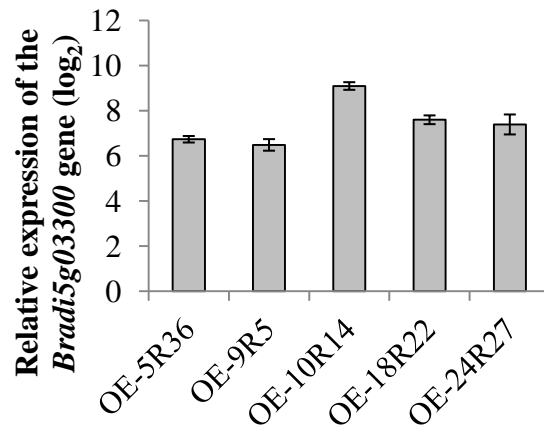
^cMissense, nucleic acid transition is a non-synonymous mutation and induce amino acid change in the translated protein; Nonsense, nucleic acid transition produces a stop codon and may induce a truncated protein; Silent, nucleic acid transition induces a synonymous mutation and therefore no change in the translated protein.

Supplemental Table 2. List of primers used in qPCR experiments.

Gene	Nucleotide sequence	Polarity	Putative function	Amplicon length (bp)
<i>Bradi4g00660</i>	5'-ACCCTCTACGCTGGTGAGAC-3'	Forward	UBC18 (plant reference gene)	188
	5'-TTGCTGTAAATGTGCGGATG-3'	Reverse		
<i>Bradi4g41850</i>	5'-CCTGAAGTCCTTTTCCAGCC-3'	Forward	ACT7 (plant reference gene)	188
	5'-AGGGCAGTGATCTCCTTGCT-3'	Reverse		
<i>Bradi5g03300</i>	5'-AAGAAAAGCTTGAATGGACA ACTAA-3'	Forward	UDP-glycosyltransferase	138
	5'-CGCGTGCATTGTCTCCTT-3'	Reverse		
18S <i>F. graminearum</i>	5'-GTCCGGCCGGGCCTTTCC-3'	Forward	Ribosomal region 18S (fungal reference gene)	68
	5'-AAGTCCTGTTTCCCCGCCACGC-3'	Reverse		

A**B**

Supplemental Figure 2. Phenotypes of the mutant line 6829-7 and overexpressing line OE-10R14 as compared with the wild-type line Bd21-3. **A.** Three weeks old plantlets, **B.** Mid-anthesis stage (31 days after sowing). Left: Bd21-3 wild-type; middle: 6829-7 mutant line; right: OE-10R14 overexpressing line. Bars: 5 cm.



Supplemental Figure 3. Relative expression of the *Bradi5g03300* gene in leaves of overexpressing lines OE-9R5, OE-10R14, OE-18R22 and OE-24R27. Ratio of expression of the *Bradi5g03300* gene in leaves of OE lines as compared with the Bd 21-3 wild-type line. The relative quantity of gene transcripts was calculated using the comparative cycle threshold method (2^{-DDCt}). The infected samples were quantified relatively to the water-treated controls at the same time points. The *B. distachyon* *UBC18* and *ACT7* gene (*Bradi4g00660* and *Bradi4g41850*) were used as endogenous controls to normalize the data for differences in input RNA between the different samples. Data represent mean values of three independent biological experiments, error bars represent the standard deviation.

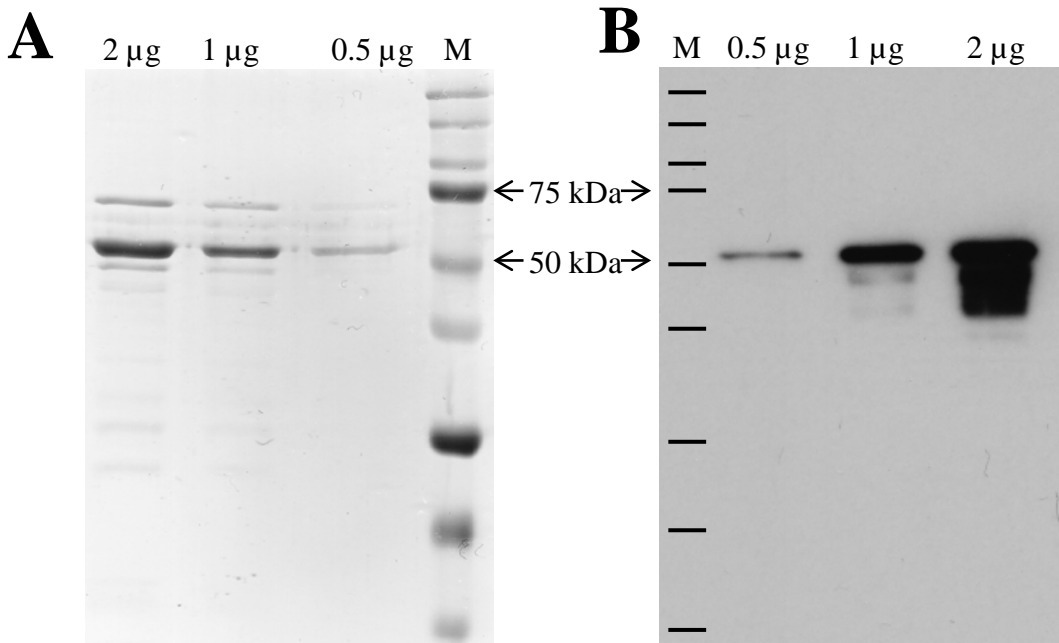


Figure 22 : Production et purification de la protéine Bradi5g03300. **A.** Gel de Coomassie , dépôt de 2, 1 ou 0,5 µg de protéine totale après purification et dessalage. **B.** Western blot permettant de réléver la protéine Bradi5g03300 par immunodétection avec des anti-corps anti-His (même dépôts que **A.**) ; M = Marqueur de taille.

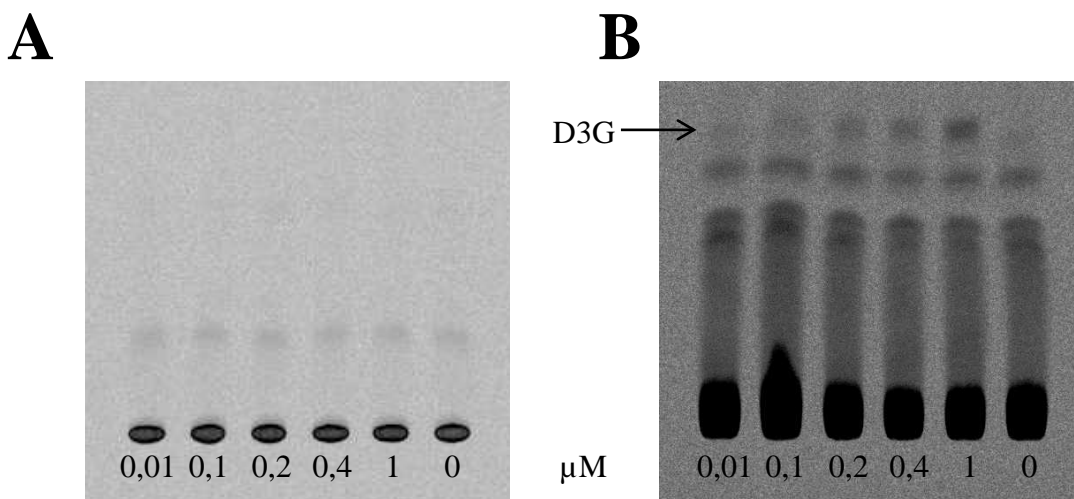


Figure 23 : Révélation de l'activité enzymatique de Bradi5g03300. Les substrats utilisés sont la scopolétine (**A**) et le DON (**B**). Les dépôts correspondent à 15 µL de volume réactionnel contenant chacun 0.3 µg de protéine (avant ajout de méthanol) et une concentration initiale 0,01, 0,1, 0,2, 0,4, 1 et 0 µM de susbstrat.

Résultats complémentaires

Afin de compléter l'analyse de la conjugaison du DON par l'UGT Bradi5g03300, nous avons récemment entrepris la production de la protéine recombinante pour conduire des tests d'activité *in vitro*.

Analyse de la protéine recombinante Bradi5g03300

Nous avons pu produire et purifier la protéine Bradi5g03300 portant le tag histidine (His) (**Figure 22A**). Cette protéine a une taille attendue c'est-à-dire 53,9 kDA et porte le tag His comme souhaité (**Figure 22B**). La protéine recombinante Bradi5g03300 n'est pas capable de glucosyler *in vitro* la scopolétine (**Figure 23A**) alors qu'elle peut glucosyler le DON (**Figure 23B**) avec une valeur de K_m de l'ordre de 10 μ M. La détermination du K_m n'ayant été réalisé qu'une seule fois, cette valeur devra être confirmée. Cette expérience devra être reproduite avec des réplicats biologiques correspondant à des productions et purifications indépendantes de la protéine recombinante.

Précédemment dans ce chapitre nous avons pu démontrer par différentes approches que l'UGT Bradi5g03300 conjugue le DON en D3G chez *B. distachyon* jouant un rôle majeur dans la résistance à l'agent pathogène producteur de cette mycotoxine. Le DON fait partie des TCT B tout comme le NIV, le 3-ADON et le 15-ADON (voir **Introduction**, partie **C.1**). Ces sesquiterpènes ne diffèrent que par la présence d'un groupement hydroxyle en plus (c'est le cas du NIV en C4) ou par la présence de groupement acétyle soit en C3 (3-ADON) ou en C15 (15-ADON). Comme nous avons pu montrer précédemment l'activité de Bradi5g03300 vis-à-vis du DON, nous nous sommes interrogés sur son rôle potentiel vis-à-vis d'autres TCT B et sur l'impact de son altération (mutation ou surexpression du gène correspondant) en réponse à des souches productrices de ces toxines.

Phytotoxicité du nivalénol, du 3-acétyldéoxynivalénol et du 15-acétyldéoxynivalénol

Afin d'évaluer la phytotoxicité du NIV, du 3-ADON et du 15-ADON nous avons procédé au test de croissance racinaire utilisé pour déterminer la phytotoxicité du DON sur une lignée mutante (6829-7), une lignée surexpresser (OE-10R14) et leurs lignées contrôles respectives. La lignée mutante TILLING 6829-7 s'est montrée extrêmement sensible au 3-ADON et au 15-ADON avec une inhibition de la croissance racinaire atteignant

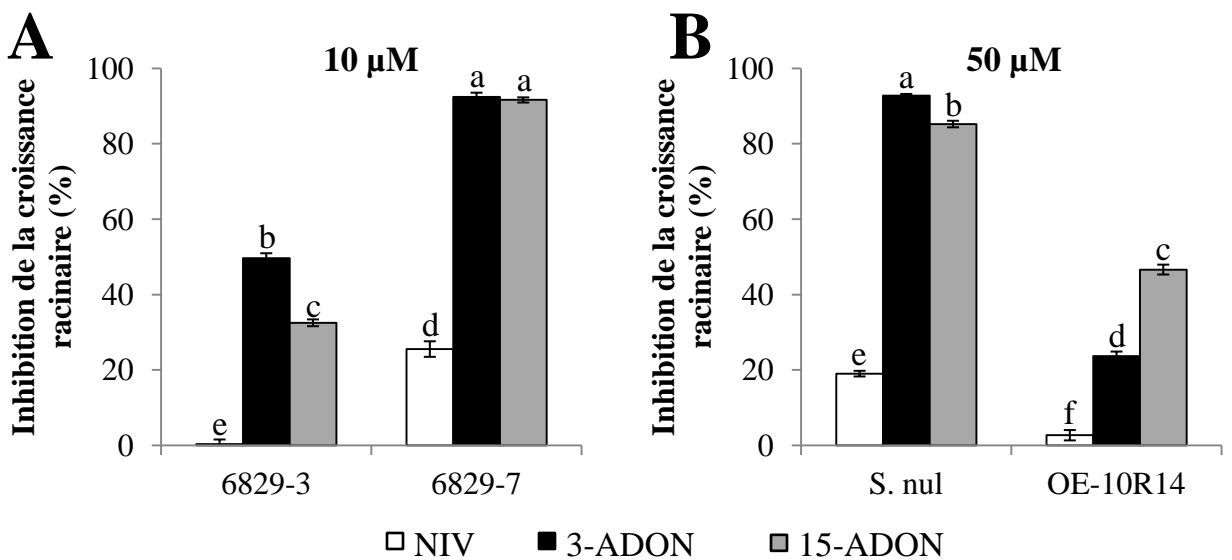


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de la croissance racinaire sur un milieu contenant des mycotoxines. A. Inhibition de la croissance racinaire des lignées 6829-3 et 6829-7 sur un milieu contenant 10 µM de mycotoxine ; **B.** Inhibition de la croissance racinaire des lignées ségrégant nul (S. nul) et OE-10R14 sur un milieu contenant 50 µM de mycotoxine (n > 30 ; Test de Duncan p-value ≤ 1.10⁻⁴ ; les barres d'erreurs représentent l'erreur standard).

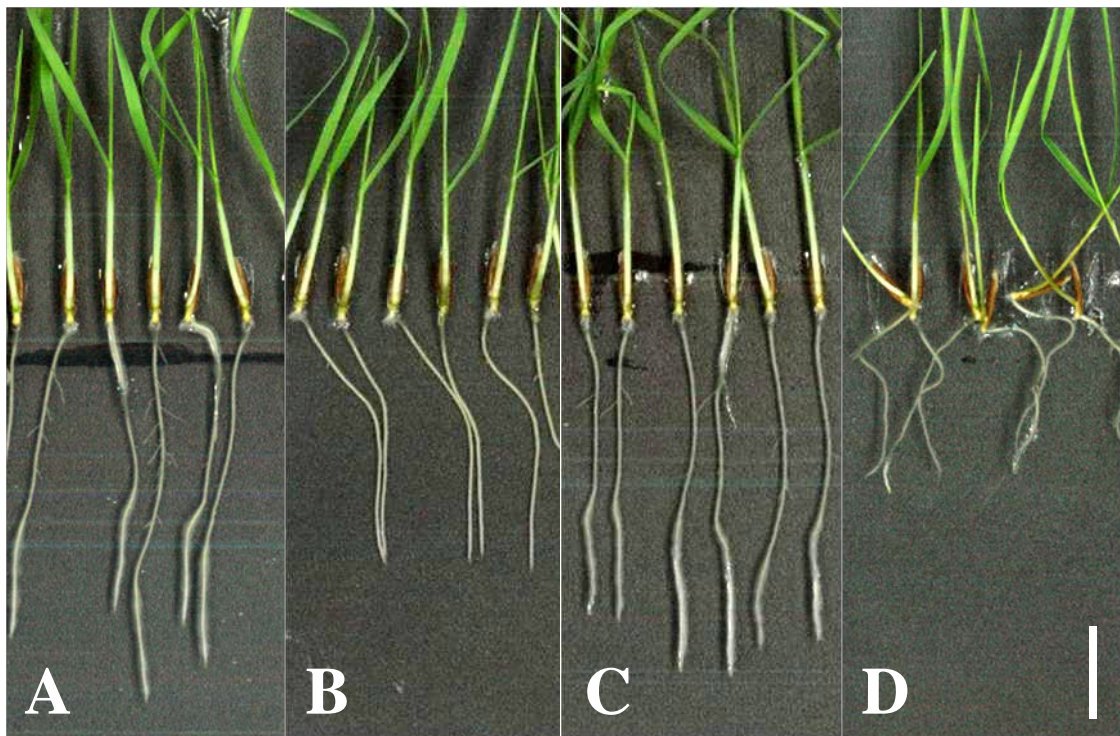


Figure 25 : Croissance racinaire sur un milieu contenant du 15-ADON. A, B. Croissance racinaire de la lignée 6829-3 sur un milieu contenant 0 (A) ou 10 µM (B) de 15-ADON. **C, D.** Croissance racinaire de la lignée OE-10R14 sur un milieu contenant 0 (C) ou 50 µM (D) de 15-ADON (l'échelle représente 1 cm).

respectivement 92 et 91% sur un milieu contenant 10 μ M de mycotoxine (**Figure 24A**) alors que la lignée contrôle (6829-3) ne présente que 50 et 32% d'inhibition, respectivement. Dans le cas du NIV, la lignée mutante 6829-7 est également plus sensible (25% d'inhibition) que la lignée contrôle 6829-3 (0%). Les résultats obtenus sur la lignée 6829-3 nous permettent d'établir chez *B. distachyon* le degré de phytotoxicité des différentes toxines par ordre décroissant : 3-ADON > 15-ADON > DON > NIV. Nous avons également pu montrer que la lignée OE-10R14 surexprimant le gène *Bradi5g03300* est plus tolérante à une forte concentration de toxine (50 μ M) que son contrôle (S. nul, pour ségrégant nul). En présence de NIV, 3-ADON et 15-ADON le pourcentage d'inhibition de la croissance racinaire de la lignée OE-10R14 est respectivement de 3, 24 et 47% alors que celui-ci atteint 19, 93 et 85% pour la lignée contrôle (**Figure 24B**). Cependant, si nous classons comme précédemment les différentes toxines en fonction de leur phytotoxicité nous obtenons l'ordre suivant 15-ADON > 3-ADON > DON > NIV. En fonction de la lignée considérée (6829-3 ou OE-10R14) et de la concentration en mycotoxine utilisée, le 3-ADON et le 15-ADON n'ont pas le même degré de toxicité. Ces résultats pourraient être expliqués par un effet spécifique du 15-ADON. Dès 10 μ M de 15-ADON, la lignée 6829-3 montre une altération du gravitropisme (**Figure 25B**) en comparaison avec une croissance sur un milieu sans toxine (**Figure 25A**). Cette perturbation est encore plus accentuée chez la lignée OE-10R14 en présence de 50 μ M de 15-ADON (**Figure 25C, D**), empêchant une croissance racinaire normalement orientée.

Tests d'infection par des souches de *F. graminearum* de différents chémotypes (NIV/4-ANIV et DON/3-ADON)

Nous avons pu mettre en évidence au cours de l'analyse fonctionnelle du gène *Bradi5g03300* une sensibilité accrue des lignées mutantes TILLING et une résistance quantitative des lignées surexprimant le gène *Bradi5g03330* en réponse à une souche productrice de DON (chénotype DON/15-ADON). L'évaluation de la phytotoxicité *in vitro* du NIV, du 3-ADON et du 15-ADON suggère également un rôle de l'UGT dans la tolérance à ces toxines. Cependant, nous pouvons nous demander si, comme dans le cas du DON, ceci peut être corrélé à une résistance *in planta* après infection par des souches productrices de NIV ou de 3-ADON. Pour cela, nous avons utilisé les souches INRA162 (C. Barreau, INRA MycSA, Villenave d'Ornon, France) et *Fg3ADON* (C. Kistler, Department of Plant Pathology, University of Minnesota, Saint-Paul, USA), respectivement de chémotype NIV/4-ANIV et DON/3-ADON. Après pulvérisation de spores de ces souches sur des épis des lignées Bd21-3, 6829-7 et OE-10R14 nous avons observé l'apparition de symptômes

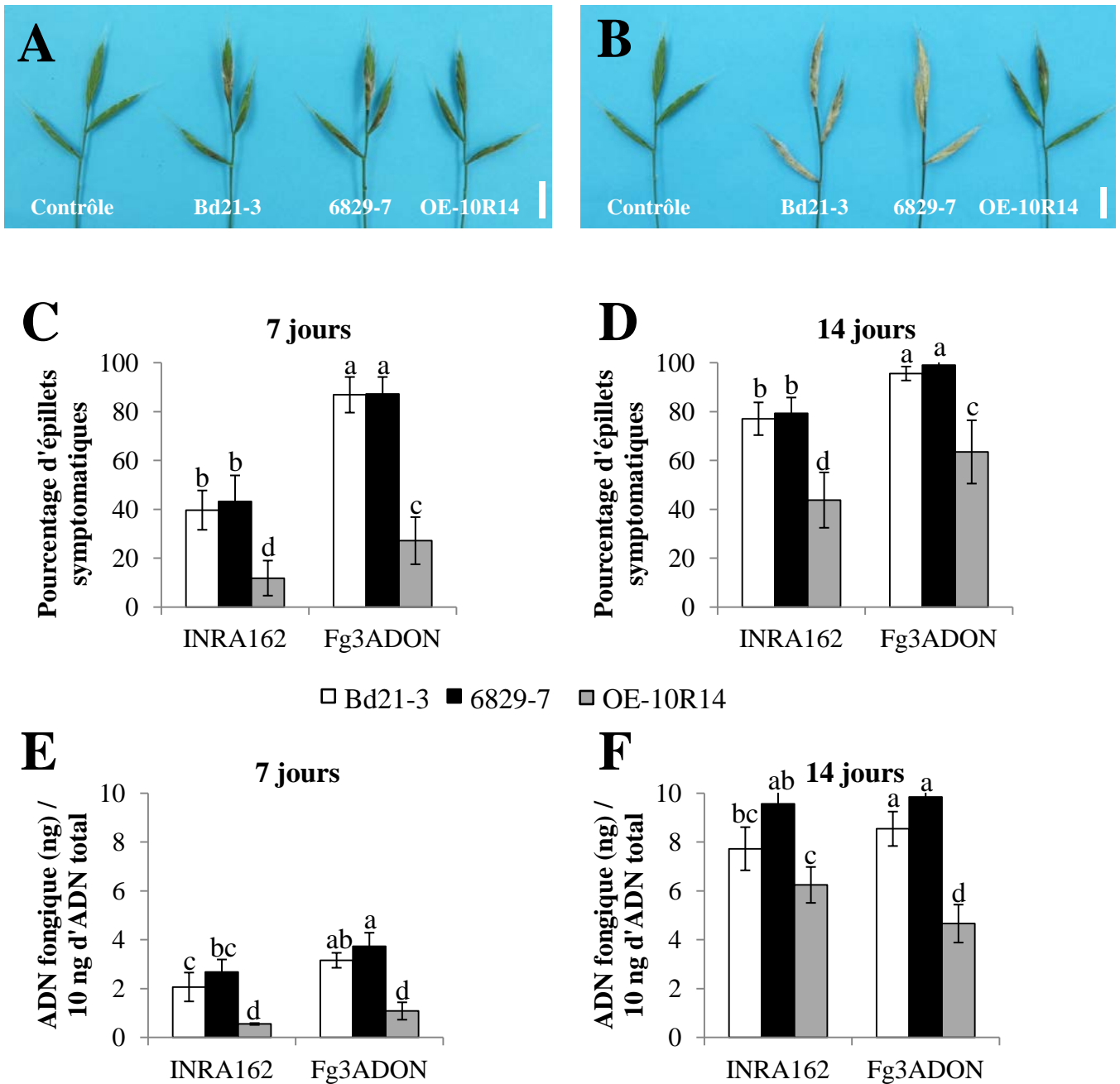


Figure 26 : Symptômes de FHB après inoculation par pulvérisation des souches INRA162 (NIV) et *Fg3ADON* (3-ADON). A, B. Symptômes de FHB 7 jours après pulvérisation des souches INRA162 (A) et *Fg3ADON* (B) (les échelles représentent 1 cm) ; **C, D.** Pourcentage d'épilletts totalement symptomatiques 7 et 14 jours, respectivement, après pulvérisation des souches INRA162 et *Fg3ADON* (les barres d'erreurs représentent l'écart type, Test de Duncan p -value ≤ 0.01) ; **E, F.** Quantité d'ADN fongique dans 10 ng d'ADN total 7 et 14 jours, respectivement, après pulvérisation des souches INRA162 et *Fg3ADON* (les barres d'erreurs représentent l'écart type, Test de Duncan p -value ≤ 0.05).

caractéristiques de FHB (**Figure 26A, B**). Les symptômes de brunissement et blanchiment observés 7 et 14 jours après pulvérisation des souches INRA162 et *Fg3ADON* sur la lignée mutante 6829-7 ne sont pas différents de ceux observés sur la lignée sauvage Bd21-3 (**Figure 26A, B**). La quantification de ces symptômes macroscopiques ne met pas en évidence de différence significative entre les deux lignées en réponse à ces souches de *F. graminearum* (**Figure 26C, D**). Ces observations ont pu être confirmées par la quantification de la biomasse fongique qui n'indique aucune différence significative entre la lignée mutante 6829-7 et la lignée sauvage Bd21-3 (**Figure 26E, F**). En revanche, la lignée OE-10R14 présente une résistance quantitative aux souches INRA162 et *Fg3ADON*, 7 jours après infection avec une diminution des brunissements et des blanchiments en comparaison à la lignée Bd21-3 (**Figure 26A, B**). En effet, chez cette dernière, 7 jours après pulvérisation des souches INRA162 et *Fg3ADON*, 40 et 87% des épis, respectivement, sont totalement symptomatiques contre seulement 12 et 27% chez la lignée OE-10R14 (**Figure 26C**). Cette résistance perdure 14 jours après infection (**Figure 26D**). La résistance observée au sein de la lignée OE-10R14 a également été confirmée lors de la mesure par qPCR de la biomasse fongique aussi bien à 7 qu'à 14 jours après infection par ces deux souches (**Figure 26E, F**).

Conclusion

La recherche de mutants TILLING dans la banque de mutants disponible à l'URGV d'Evry a permis d'identifier 15 lignées mutantes dont 3 d'intérêt portant les mutations suivantes : apparition d'un codon STOP dans le motif PSPG (6829-7 et 6491-37) et remplacement d'un acide aminé hydrophile par un acide aminé hydrophobe dans ce même motif (8637-12). La construction de lignées surexprimant le gène *Bradi5g03300* a permis d'identifier 5 lignées différentes parmi lesquelles trois ont été sélectionnées pour leur taux de surexpression, allant de 120 à 800 fois plus que la lignée contrôle (ségrégant nul).

La mesure de la croissance racinaire *in vitro* sur un milieu contenant 10 μM de DON pour les lignées mutantes a mis en évidence une hypersensibilité de ces lignées à la mycotoxine en comparaison à des plantes portant l'allèle sauvage du gène *Bradi5g03300*. Cette réduction drastique de la croissance racinaire chez les 3 lignées mutantes s'accompagne d'une désorganisation cellulaire au niveau de la pointe racinaire. *A contrario*, les lignées surexpresses ont montré une tolérance au DON, dépendante du niveau de surexpression du gène, sur un milieu contenant 50 μM de DON.

L'infection des différentes lignées par pulvérisation de spores d'une souche *FgDON*⁺ a également mis en évidence des différences dans le développement de la maladie entre les lignées mutantes et les lignées surexpresses. Les lignées mutantes se sont révélées plus sensibles à l'infection par l'agent pathogène, résultat observable par une augmentation des symptômes de FHB et de la biomasse fongique. A l'inverse, les lignées surexpresses ont montré une réduction des symptômes macroscopiques s'accompagnant d'une diminution significative de la biomasse fongique. La sensibilité/résistance à l'agent pathogène n'a été mise en évidence que lors de l'infection par une souche productrice de mycotoxine. En effet l'infection par la souche *FgDON*⁻ ne montre pas de différence significative majeure de symptômes ou de biomasse fongique entre les différentes lignées.

La détection du DON, D3G et 15-ADON par HPLC-MS/MS a permis de démontrer que l'altération de la protéine *Bradi5g03300* dans les lignées mutantes n'influence par la production de DON total (DON + D3G) par l'agent pathogène lors de l'infection mais qu'en revanche, il y a une diminution significative du ratio D3G/DON chez ces lignées en comparaison à la lignée sauvage. De façon très intéressante, nous avons pu observer une diminution globale de la production de DON chez les lignées surexpresses avec une diminution plus importante chez la lignée surexprimant le plus le gène *Bradi5g03300* (OE-10R14). Chez ces lignées, la diminution de la teneur en DON s'accompagne d'une

augmentation du ratio D3G/DON. La détection de ces métabolites dès 48 h après l'infection a montré l'importance de la prise en charge très précoce du DON dans l'établissement de la résistance quantitative préalablement observée.

L'analyse biochimique préliminaire par protéine recombinante de l'affinité de substrat de la protéine Bradi5g03300 nous a permis de mettre en évidence une glucosylation du DON avec un K_m de l'ordre 10 μM .

Les résultats complémentaires obtenus sur milieu gélosé ont également montré une sensibilité accrue au NIV, 3-ADON et 15-ADON de la lignée mutante 6829-7 et une tolérance de la lignée OE-10R14 à ces mêmes mycotoxines, en comparaison à leurs contrôles respectifs. L'infection de ces lignées par des souches de *F. graminearum* de chémotype NIV/4-ANIV et DON/3-ADON n'a pas mis évidence de différence entre la lignée 6829-7 et une plante sauvage aussi bien au niveau des symptômes que de la quantification de la biomasse fongique. En revanche la lignée OE-10R14 présente une résistance quantitative observée par l'intermédiaire d'une diminution des symptômes et de la biomasse fongique en réponse à ces deux souches de *F. graminearum*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. L'interaction entre *B. distachyon* et *F. graminearum*

1. Symptômes macroscopiques et cycle infectieux

Les symptômes de brunissement puis de blanchiment et de dessèchement précoce de l'épi de la fusariose des épis des céréales sont caractéristiques de cette maladie chez le blé et l'orge. Les symptômes de fusariose obtenus au laboratoire sur épis de *B. distachyon*, après infection par une souche de *F. graminearum* productrice de déoxynivalénol, commencent par des brunissements dans les temps précoces de l'infection (jusqu'à 72 hai) et sont suivis d'un blanchiment des zones initialement brunes. Ces symptômes sont similaires à ceux décrits sur blé et orge (Maier et al., 2006) ou ceux décrits récemment sur *B. distachyon* (Peraldi et al., 2011). L'observation cytologique de l'infection de Brachypodium par *F. graminearum* a mis en évidence une pénétration des stigmates plumeux dès 48 hai. Chez le blé, les anthères ont été décrites comme une des portes d'entrée principales de l'agent pathogène, aucune pénétration des stigmates n'a été montrée. Il s'en suit alors une colonisation des filets des anthères puis de l'ovaire (Jansen et al., 2005; Brown et al., 2010). Il semble donc y avoir une différence dans l'initiation de l'infection chez ces deux hôtes malgré des symptômes macroscopiques identiques lors de l'apport de spores fongiques dans une cavité florale. Cela peut s'expliquer par le fait que chez la plupart des variétés de blé, les anthères sont extrusives et sont donc un des premiers organes de la plante en contact avec les spores de l'agent pathogène, alors que chez Brachypodium, notamment chez l'écotype Bd21-3 utilisé dans cette étude, les anthères ne sont pas extrusives.

2. Impact de la production de DON sur le potentiel infectieux de *F. graminearum* sur les épis

Chez le blé une souche mutante (*tri5* ou *FgDON⁻*) incapable de produire du DON ne peut coloniser l'ensemble de l'épi à partir d'un épillet inoculé (Jansen et al., 2005; Maier et al., 2006). Chez *B. distachyon*, l'initiation de l'infection par cette souche mutante ne présente pas de différence 48 hai en comparaison à la souche sauvage, une pénétration par les stigmates plumeux est observée dans les deux cas. Cependant, 72 hai, nous avons observé la présence de cellules mortes ou en cours de mort cellulaire sur la glumelle supérieure en réponse à la souche *FgDON⁻* alors que ce même organe après infection par la souche *FgDON⁺* ne présente pas de brunissements. Cette souche *FgDON⁻* est capable de coloniser l'épi mais présente un important retard de colonisation et une réduction de la formation de l'inoculum secondaire chez Brachypodium. Chez le blé, la souche *FgDON⁻* est bloquée par

les barrières physiques que constituent le rachis et le nœud du rachis. Jansen et collaborateurs (2005) ont montré qu'en réponse à l'infection par la souche *FgDON⁻*, il y avait un renforcement de la paroi cellulaire au niveau du rachis et du nœud du rachis alors que la présence de mycotoxine inhibe ce renforcement. Chez l'orge, ce renforcement pariétal a lieu quelque soit la souche. Au laboratoire, nous avons pu détecter la présence de la souche *FgDON⁻* aussi bien dans le nœud du rachis que dans le rachis de *Brachypodium*. Cette différence s'explique probablement par l'organisation de l'inflorescence qui est différente entre le blé et *Brachypodium*. En effet, chez *Brachypodium* les épis sont constitués par 2 à 3 épillets (séparés par un rachis d'environ 1 cm) comportant chacun une dizaine de fleurs alors que le blé a une inflorescence très dense constituée d'une multitude d'épillets séparés par des rachis de très petite taille. Chez *Brachypodium*, la production de DON augmente la vitesse de colonisation de l'agent pathogène mais n'est pas nécessaire à l'établissement de la maladie lors d'inoculations ponctuelles. *Brachypodium* ne semble pas capable de mettre en place une résistance de type II suffisante à l'arrêt total de la colonisation après infection par une souche incapable de produire des mycotoxines. Ellinger et collaborateurs (2014) ont montré que la résistance de type II observée chez certains cultivars de blé est corrélée à l'activité callose synthase (Ellinger et al., 2014). Il a par ailleurs été montré que l'activité callose synthase est inhibée par les acides gras libres (Blumke et al., 2014b; Ellinger et al., 2014) potentiellement issus de l'activité des lipases sécrétées par l'agent pathogène. De plus, des cultivars capables de mettre en place des appositions de callose afin de bloquer l'agent pathogène sont moins sensibles à cette inhibition par les acides gras libres (Ellinger et al., 2014). Chez *Brachypodium*, nous pouvons envisager que l'activation de la callose synthase soit n'a pas lieu, soit n'est pas suffisante pour établir un renforcement pariétal capable de confiner l'agent pathogène. Une hypothèse est que cette activité protéique est naturellement plus sensible aux acides gras libres capables d'inhiber son activité.

Le développement de la maladie sur *B. distachyon* se situe donc dans une situation différente de celle connue chez le blé et celle connue chez l'orge, où aucune différence entre les souches *FgDON⁺* et *FgDON⁻* n'a pu être observée du fait d'une résistance de type II naturelle très importante (Jansen et al., 2005).

3. Impact du DON sur les mécanismes de défense de la plante

La résistance aux agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes est communément attribuée à l'acide salicylique (SA) et jasmonique (JA), respectivement (Glazebrook, 2005). *F. graminearum* est considéré comme un agent hémibiotrophe (Brown et al., 2010).

Cependant, la phase biotrophe de l'agent pathogène est très restreinte et est, d'après les auteurs, limitée à l'infection initiale et au front de colonisation. Le front de colonisation se définit par la zone où l'agent pathogène est présent mais où les cellules végétales ne sont pas endommagées et où aucun symptôme macroscopique n'est visible (Brown et al., 2010). L'analyse transcriptomique de la réponse de *B. distachyon* à l'infection par *F. graminearum* a montré de très fortes similitudes avec les réponses moléculaires observées chez le blé ou l'orge. Des gènes codant des fonctions connues pour être impliquées dans le métabolisme secondaire des plantes ont montré des régulations transcriptionnelles différentes selon la souche inoculée (*FgDON*⁺ ou *FgDON*⁻). Des gènes codant des cinnamyl alcool déshydrogénases, 4-coumarate-CoA ligases et des laccases sont induits de façon plus importante en réponse à la souche *FgDON*⁺ qu'après infection par la souche *FgDON*⁻. Ces fonctions protéiques sont impliquées dans la voie des phénylpropanoïdes et dans le renforcement pariétal. Les différences d'expression observées entre les deux souches s'expliquent probablement par le retard de colonisation de la souche *FgDON*⁻. Chez le blé et l'orge, de telles fonctions sont induites en réponse à l'infection par *F. graminearum* (Boddu et al., 2006; Boddu et al., 2007; Foroud et al., 2012). Des gènes codant des hydroxycinnamates transférases sont également fréquemment induits en réponse à l'infection chez le blé et l'orge. Chez *Brachypodium* l'induction de gènes codant ces fonctions est également observée en réponse à la souche *FgDON*⁺.

La comparaison métabolomique 96 h après l'infection par les souches *FgDON*⁺ et *FgDON*⁻ a mis en évidence l'importance de composés issus de la voie du tryptophane : sérotonine, tryptamine, *p*-coumaroylsérotonine et féruloysérotonine. La sérotonine a récemment été décrite chez le blé comme une nouvelle phytoalexine (Du Fall and Solomon, 2013). Nous avons montré au cours de ce travail qu'*in vitro*, une concentration de 5 mM de sérotonine ralentit la croissance radiale et le taux de germination des spores de *F. graminearum* mais semble augmenter la sporulation. Nous avons pu détecter la forme libre et des formes conjuguées avec des hydroxycinnamates de ce métabolite. Il serait donc intéressant de tester si ces conjugués sont également fongitoxiques et quelle est leur efficacité. Chez le blé, les benzoxazinoïdes également issus de la biosynthèse des indoles (**Figure 15**) constituent des métabolites majeurs dans la défense contre les agents pathogènes. Il a été montré une corrélation négative entre la concentration naturelle de certaines variétés de blé danoises en benzoxazinoïdes et la sensibilité à la FHB (Søltoft et al., 2008). *Brachypodium* ne possède pas les enzymes capables d'aboutir à la biosynthèse de benzoxazinoïdes (Dick et al., 2012). Ceci est corroboré par nos analyses métabolomiques où aucun composé de ce type n'a

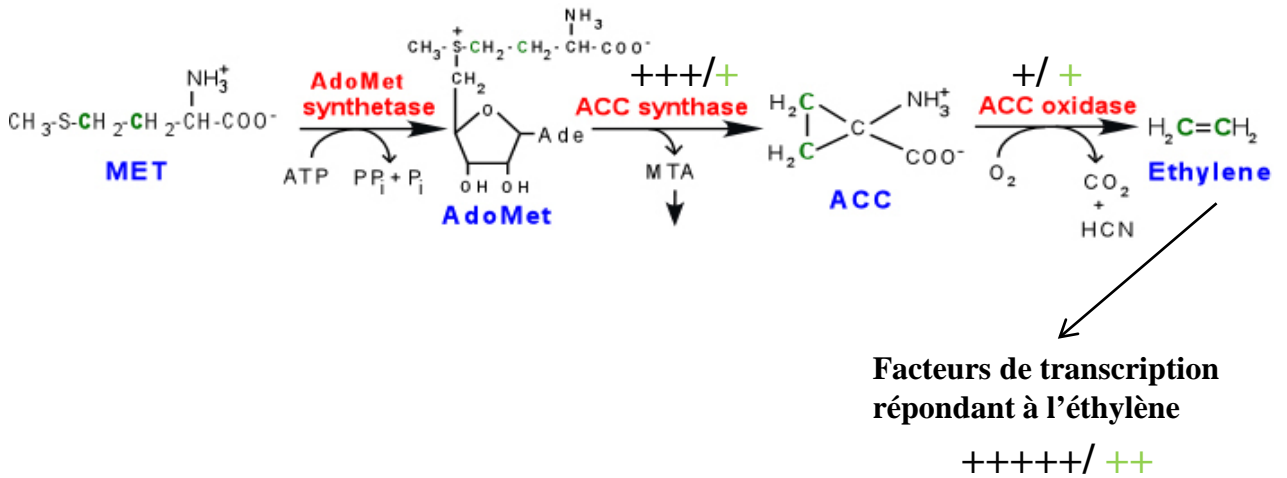


Figure 27 : Voie de biosynthèse de l'éthylène. Les enzymes catalysant les réaction enzymatiques sont marquées en rouge, les substrats en bleu. Les + représentent le taux d'expression des gènes associés à chaque étape (en noir en réponse à la souche *FgDON*⁺ et en vert en réponse à la souche *FgDON*⁻). AdoMet : S-adenosyl-méthionine; Met : méthionine; ACC: acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique ; MTA : méthylthioadénine (d'après <http://labs.bio.unc.edu/Kieber/ethylene%20Biosynthesis%20page.htm>).

pu être détecté. Un cultivar de blé portant le QTL *Fhb1* a montré une très forte accumulation de *p*-coumaroylsérotonine et de féruloylsérotonine (Gunnaiah et al., 2012) en réponse à l'agent pathogène, comparé au même cultivar sensible (ne portant pas *Fhb1*). Le blé possédant les enzymes capables d'aboutir à la biosynthèse des benzoxazinoïdes et des conjugués de la sérotonine, nous pouvons supposer qu'il y a une éventuelle compétition entre ces deux voies pour l'utilisation du pool d'indoles alors que chez *Brachypodium*, la voie aboutissant aux conjugués de sérotonine sera potentiellement favorisée.

L'élargissement des données métabolomiques obtenues est actuellement en cours *via* une collaboration avec Pawel Bednarek (Poznań, Pologne).

La comparaison des transcrits différentiellement accumulés entre l'infection par les souches *FgDON*⁺ et *FgDON*⁻ montre une forte représentation de gènes codant des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de l'éthylène (ET) et de gènes répondant à l'ET au sein des réponses hormonales de la plante (**Figure 27**). EIN2 pour ETHYLENE-INSENSITIVE2 est un régulateur central de la voie de signalisation de l'ET. En présence d'éthylène, le dimère ETR1/CTR1 (ETHYLENE RECEPTOR1/CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1) va être inactif permettant à EIN2 d'induire la transcription de gènes répondant à l'ET (Ju et al., 2012). Chen et collaborateurs (2009) ont montré que l'induction de la voie éthylène favorisait le développement de la maladie et que le silencing du gène *EIN2* par RNAi chez le blé augmentait la résistance à l'agent pathogène et diminuait la quantité de toxine accumulée. Les plantes RNAi *EIN2*, après l'application de DON en forte concentration, au niveau d'une blessure, présentent une réduction de la mort cellulaire en comparaison à des plantes sauvages (Chen et al., 2009). L'induction de la voie éthylène dans notre analyse s'explique par le fait que 96 hai, l'agent pathogène se trouve en phase nécrotrophe et que celui-ci favorise la mort des cellules végétales afin d'accentuer son développement. Parmi les 19 gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène ou répondant à cette hormone, 7 sont induits par la souche *FgDON*⁻, 18 sont induits en réponse à la souche *FgDON*⁺ et tous sont induits en réponse au DON (**Figure 19**). Les différences d'expression observées au sein de cette catégorie suggèrent qu'une partie de ces gènes répondent à l'infection par l'agent pathogène, indépendamment de sa capacité à produire du DON, et que l'expression de l'ensemble de ces gènes peut être manipulée par la mycotoxine seule. Dans nos analyses transcriptomiques 96 hai (phase de nécrotrophie) ou en réponse au DON, le DON est *a priori* présent à fortes concentrations dans les tissus végétaux. Nos résultats indiquent que le DON, à

des concentrations relativement élevées, agirait comme un facteur de nécrotrophie promouvant la mort des cellules végétales.

Un second aspect intéressant a retenu notre attention lors de l'analyse des données. Nous avons pu constater, dans le transcriptome en réponse à la souche *FgDON*⁺, l'induction de deux gènes transcrits annotés *BAP2* pour *BON1-associated protein 2* et *BON3* pour *BONZAI-3*. Ces gènes sont associés dans la littérature à la répression de la PCD (Yang et al., 2007; Li et al., 2009). Il est donc au premier abord surprenant de constater au sein de mêmes jeux de données la présence de gènes impliqués dans la promotion de la sénescence et des gènes impliqués dans la répression de la PCD. Cependant, lors de la colonisation de l'épillet de *B. distachyon* par *F. graminearum*, tout l'épillet ne se trouve pas au même stade de colonisation. 96 hpi, il y a coexistence de zones où l'agent pathogène se trouve en phase de nécrotrophie, autour du point d'inoculation, et de zones dites de front de colonisation, où le champignon adopte un comportement biotrophe. Nos données correspondent donc à l'observation des régulations transcriptionnelles dans les deux zones, sans distinction, et donc aux deux modes de développement de l'agent pathogène, biotrophie et nécrotrophie. Des études sur les zones de production du DON pendant les différentes phases de développement de la maladie ont montré qu'il est majoritairement produit dans le front de colonisation (Ilgen et al., 2009; Boenisch and Schafer, 2011; Hallen-Adams et al., 2011). De plus, le DON à faibles concentrations est capable de protéger les cellules contre la PCD (Diamond et al., 2013). L'analyse des données transcriptomiques après application de DON seul révèle également la régulation des gènes *BAP2* et *BON3* mais aussi la régulation de deux gènes codant des protéines de type Bax inhibitor 1. Des études sur le rôle joué par la protéine Bax inhibitor 1 chez les plantes durant des stress biotiques ont montré que celle-ci est nécessaire au maintien de la sensibilité de l'orge à *B. graminis* f. sp. *hordei* (Eichmann et al., 2004; Eichmann et al., 2010) et qu'*a contrario* la surexpression du gène codant cette protéine confère une résistance à *F. graminearum* (Babaeizad et al., 2009). Bax inhibitor 1 possède donc un rôle contraire en fonction du type d'agent pathogène auquel sont confrontées les plantes. Bax inhibitor 1 dans le cadre d'une interaction entre un agent pathogène biotrophe et une plante va être nécessaire pour maintenir les cellules végétales vivantes malgré la perception d'éliciteurs fongiques pouvant déclencher la PCD. S'il n'y a pas inhibition de la PCD, l'agent pathogène biotrophe va être confronté à des cellules mortes dont il sera incapable de tirer bénéfice pour son développement. En revanche, dans le cadre d'une interaction avec un agent hémibiotrophe comme *F. graminearum*, le maintien en vie des cellules végétales artificiellement dans le temps (par surexpression d'un inhibiteur de la PCD)

va entraîner une résistance de la plante, cela s'explique par le fait que lorsque l'agent pathogène effectue la transition entre un mode de vie biotrophe vers celui d'un nécrotrophe, la présence de cellules non viables est nécessaire à son développement.

Il semble que le DON joue un double rôle lors de l'infection : à faibles concentrations durant la phase biotrophe de l'agent pathogène, celui-ci va réprimer la PCD afin d'empêcher le confinement de l'agent pathogène aux sites de pénétration (ceci est en accord avec les différences observées entre les souches *FgDON*⁺ et *FgDON*⁻ 72 hai) et durant la phase nécrotrophe (à fortes concentrations) celui-ci va promouvoir la mort cellulaire principalement par le biais de la voie éthylène. Il pourrait être particulièrement intéressant de chercher à comprendre quelles sont les régulations transcriptionnelles dues au DON dans les phases précoces de l'infection. Nous pourrions pour cela réaliser des analyses transcriptomiques après application d'une très faible quantité de DON dans plusieurs fleurs d'un épillet afin d'avoir un épillet dans sa totalité soumis à de faibles quantités de DON comme lors de l'initiation de l'infection. Alternativement, nous pourrions réaliser des inoculations ponctuelles multiples par *F. graminearum* au sein d'un même épillet et faire une analyse transcriptomique de la réponse de la plante lors d'un temps précoce de l'infection 48 ou 72 hai afin d'avoir un échantillon biologique ne comportant le champignon qu'en phase dite de front de colonisation. Une étude récente (Blumke et al., 2014a) centrée sur les modifications de la paroi cellulaire a montré chez *B. distachyon* qu'un prétraitement au DON induisait, par le biais d'un renforcement pariétal, une résistance à *F. graminearum*. Il est donc maintenant montré par plusieurs études que le DON a un impact différent sur le devenir de la maladie en fonction de sa potentielle concentration *in planta* et en fonction des différentes phases de colonisation de l'agent pathogène.

Compte tenu des rôles joués par le DON dans l'établissement et la promulgation de la maladie, il semble important de comprendre quels sont les mécanismes de lutte mis en place par les plantes vis-à-vis de ce métabolite secondaire fongique.

Les plantes lorsqu'elles sont soumises à des xénobiotiques vont mettre en place des processus de détoxification (voir **Introduction**, partie **F.**). Le processus de détoxification fait notamment intervenir des enzymes impliquées dans la conjugaison du xénobiotique *via* les GSTs et les UGTs mais également des CYPs *via* des modifications chimiques. A l'heure actuelle, différentes formes conjuguées du DON ont pu être mise en évidence comme le DON-3-*O*-glucoside et le DON-GSH (Poppenberger et al., 2003; Kluger et al., 2013). De nombreux gènes codant des GSTs ou des UGTs sont induits spécifiquement en réponse à la

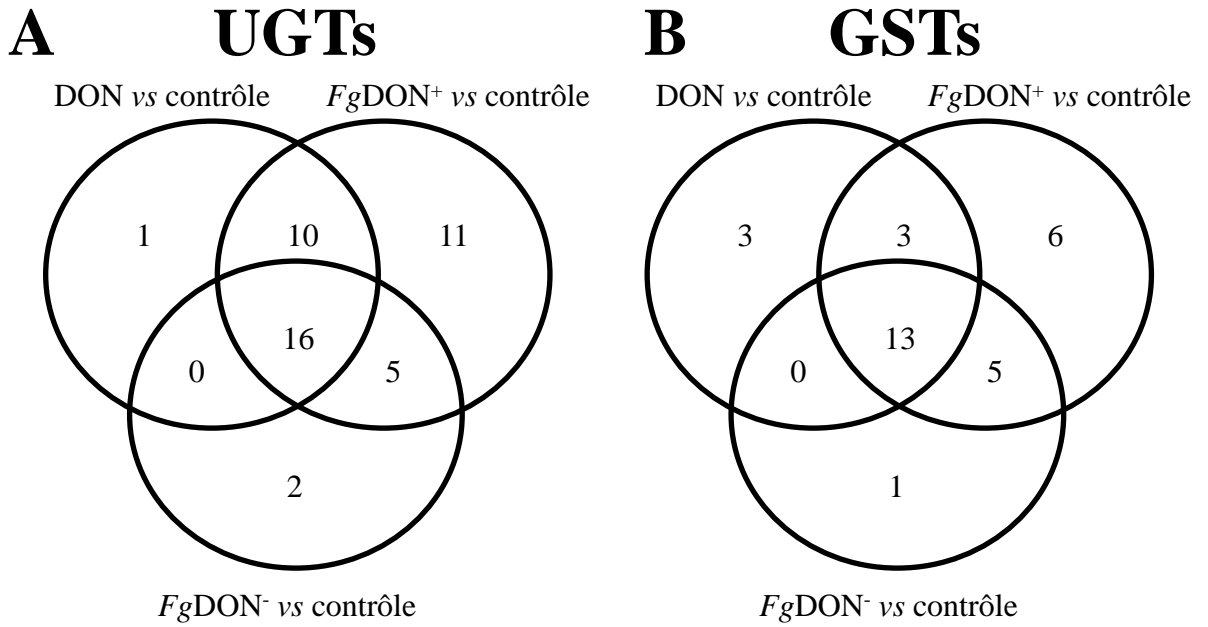


Figure 28 : Diagrammes de Venn indiquant l'abondance relative des transcrits induits codant des UGTs (A) et des GSTs (B) en fonction des conditions.

souche productrice de DON et en réponse au DON seul (**Figure 28**) dans les données transcriptomiques obtenues au cours de mon travail de thèse. Ces résultats nous laissent penser que la production de ces deux formes conjuguées est possible chez *B. distachyon*. La synthèse de ces différents conjugués suppose plusieurs voies de détoxification possibles en parallèle, en effet les formes pour le moment connues de DON-glucoside et DON-GSH le sont sur le C3. Cependant, la glucosylation ou glutathionylation restent envisageable sur les autres groupements -OH de la molécule. L'existence de plusieurs formes de détoxification des mycotoxines constitue peut être pour la plante un arsenal plus vaste de mécanismes de résistance vis-à-vis de ce xénobiotique. Des hôtes différents de l'agent pathogène favorisent peut-être plutôt une voie qu'une autre, ou au sein d'une même espèce, différents cultivars ou écotypes peuvent peut-être favoriser un mécanisme par rapport à l'autre en fonction des QTLs ou eQTLs (expression Quantitative Trait Loci) présents.

B. UDP-glucosyltransférases et détoxification des fusariotoxines

1. Analyse phylogénique des UGTs de *B. distachyon* et recherche de candidats conjuguant le DON en D3G

Les UGTs de la famille 1 chez les plantes appartiennent à une famille multigénique (Paquette et al., 2003) connue pour être impliquée dans le métabolisme secondaire comme de nombreuses autres familles multigéniques telles que celles des CYPs, des GSTs, des terpène synthases, des *O*-méthyl transférases... (Pichersky and Gang, 2000). Au cours de l'évolution un faible nombre de mutations peuvent provoquer un changement de reconnaissance de substrat d'une enzyme du métabolisme secondaire (Pichersky and Gang, 2000). L'organisation génomique des UGTs chez *Arabidopsis* montre clairement la présence de clusters de gènes issus de duplications en tandem (Paquette et al., 2003). La duplication de gènes constitue un moteur important pour l'apparition de mutations ponctuelles (Walsh, 1995). Pour les UGTs, cela peut se traduire par la modification de l'activité enzymatique ou de l'affinité pour le sucre donneur (Osmani et al., 2008; Osmani et al., 2009). Les UGTs peuvent être impliquées dans les processus de détoxification des xénobiotiques *via* la conjugaison d'un sucre (Coleman et al., 1997). C'est pourquoi au cours de cette thèse nous avons cherché à comprendre l'organisation de cette famille multigénique chez *B. distachyon* et à identifier un ou des candidats capables de conjuguer le DON en D3G.

L'analyse phylogénétique des 159 UGTs de *B. distachyon* a montré que celles-ci sont organisées en 16 groupes allant de A à P, les groupes O et P n'étant pas présents chez

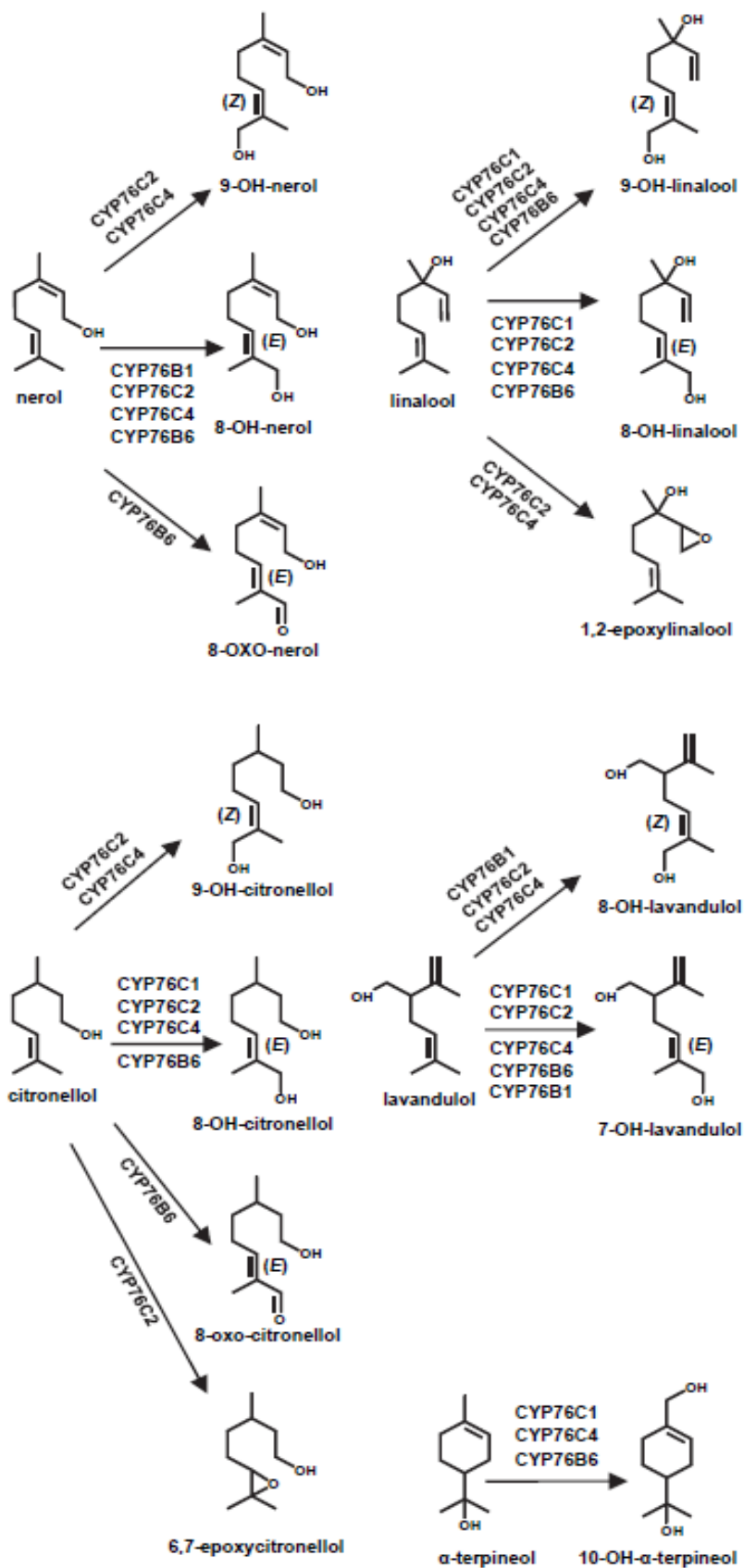


Figure 29 : Réactions enzymatiques catalysées par les CYP76C1, C2 et C4 chez *Arabidopsis* (Höfter et al., 2014).

A. thaliana mais retrouvés chez d'autres dicotylédones comme *Populus trichocarpa* et *Vitis vinifera* ou monocotylédones comme *Oryza sativa* et *Sorghum bicolor* (Caputi et al., 2012). Le positionnement sur cet arbre phylogénétique des séquences protéiques UGT73C5 d'*Arabidopsis* et HvUGT13248 de l'orge, capables de conjuguer le DON en D3G met en évidence que ces UGTs, capables fonctionnellement de réaliser la même réaction de glucosylation (Poppenberger et al., 2003; Schweiger et al., 2010), ne sont pas orthologues en termes de séquence protéique. Chez l'orge, parmi les quatre gènes codant des UGTs induits dans la comparaison transcriptomique de la réponse à l'infection par une souche sauvage et par une souche mutante *tri5*, seule la protéine codée par le gène *Hv13248* est capable de glucosyler le DON en D3G (Schweiger et al., 2010). D'après notre analyse phylogénétique, cette dernière n'est pas la plus proche phylogénétiquement d'UGT73C5 parmi les quatre (seulement 23% d'identité). Il semble donc compliqué d'identifier un orthologue fonctionnel uniquement sur la base d'une approche phylogénétique entre deux espèces ayant divergé il y a environ 200 millions d'années (Wolfe et al., 1989). Cette approche est probablement moins critique pour la recherche d'orthologues entre les deux espèces *B. distachyon* et *H. vulgare*, appartenant à la même famille des *Poaceae* et n'ayant divergé que depuis 46,5 millions d'années (Middleton et al., 2014). Nous avons pu identifier 2 orthologues de la protéine UGT73C5 d'*Arabidopsis* et 6 d'HvUGT13248 de l'orge. Même entre deux espèces proches, si nous avons choisi arbitrairement de nous focaliser sur les séquences de *Brachypodium* orthologues phylogénétiques d'HvUGT13248, l'organisation en cluster ne permet pas d'aboutir à l'identification d'un seul candidat. Cette organisation génomique peut en effet être à l'origine de phénomènes de néofonctionnalisation impossibles à évaluer *in silico*. C'est par exemple le cas des CYP76C1, C2 et C4 chez *Arabidopsis* impliqués dans la biosynthèse de monoterpénoïdes (Höfer et al., 2014). Les CYP76C1, C2 et C4 sont issus de la duplication d'un gène ancêtre commun mais ne sont pas tous capables de réaliser les mêmes hydroxylations de monoterpènes (**Figure 29**). Nous avons donc choisi de compléter l'analyse phylogénétique par une analyse fine des profils d'expression des différents gènes. Après application de DON, 6 des 8 gènes candidats ont montré une induction de leur taux d'expression, des résultats similaires ont été obtenus après infection par la souche *FgDON*⁺. Il est intéressant de se demander pourquoi 6 des 8 gènes sont capables de répondre transcriptionnellement au DON ou à l'infection par *F. graminearum* car comme nous l'avons vu chez l'orge, parmi 4 transcrits induits, seule la protéine codée par l'un d'entre eux conjugue le DON en D3G. Certains gènes candidats orthologues à *Hv13248* chez *Brachypodium* sont peut-être issus d'un ancêtre commun et ont peut être conservé une régulation transcriptionnelle similaire malgré

des fonctions potentiellement différentes. L'utilisation de la souche *FgDON⁻* a permis de mettre en évidence un fort différentiel d'expression en comparaison à l'infection par la souche *FgDON⁺*. Ce différentiel d'expression s'atténue ou disparaît 144 h après l'infection pour l'ensemble des candidats sauf pour un gène. L'ensemble de ces résultats a enfin pu être complété par l'utilisation du système hétérologue levure permettant de mettre en évidence la conjugaison d'une mycotoxine avec un sucre sous l'action d'une UGT (Poppenberger et al., 2003). Cet outil s'est avéré extrêmement utile et a permis d'identifier deux gènes conférant une résistance plus ou moins importante au DON, les gènes *Bradi5g03300* et *Bradi5g02780*. Nous avons choisi de nous concentrer sur la réalisation d'analyses fonctionnelles sur le gène *Bradi5g03300 in planta*. Bien que l'UGT codée par le gène *Bradi5g02780* soit également capable de conjuguer le DON en D3G, nous avons exclu ce gène de notre analyse car il est peu régulé transcriptionnellement et que son expression hétérologue ne confère la résistance qu'à de faibles concentrations de DON. Cependant, nous ne pouvons à l'heure actuelle exclure totalement son implication dans la conjugaison du DON en D3G *in planta*.

2. Impact de l'altération de *Bradi5g03300* sur le développement de la FHB chez *B. distachyon*

L'altération de la protéine *Bradi5g03300* (lignées mutantes TILLING) et la surexpression (lignées OE) du gène codant cette UGT a montré le rôle majeur de cette UGT dans la sensibilité et la tolérance au déoxynivalénol au niveau racinaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez *Arabidopsis* où la surexpression d'un gène codant une UGT (UGT73C5) d'*Arabidopsis* ou d'orge (HvUGT13248) conjuguant le DON en D3G confère une tolérance au DON *in vitro* (Poppenberger et al., 2003; Shin et al., 2012). Nous avons pu observer en présence de DON l'absence de poils racinaires aussi bien sur les lignées très sensibles à la toxine que sur les lignées tolérantes. De plus, les lignées mutantes hypersensibles au DON (10 μ M) présentent une désorganisation cellulaire majeure au niveau de la pointe racinaire. Il pourra être intéressant de chercher à comprendre en détail quelles sont les modifications entraînées le DON pour aboutir à ces résultats. Nous pourrions notamment nous intéresser à la biosynthèse et au transport de l'auxine car cette hormone est impliquée dans la croissance racinaire, l'organisation de cellules racinaires et dans la formation des poils racinaires (Ubeda-Tomas et al., 2012).

L'analyse de ces lignées mutantes et surexprimeuses en réponse à l'agent pathogène producteur de DON a montré une sensibilité et une résistance quantitative accrue au développement de la maladie, respectivement. L'augmentation de sensibilité des lignées

mutantes n'a pu être observée que lors d'infection par pulvérisation de l'agent pathogène et non lors d'inoculations ponctuelles de celui-ci. La première méthode d'inoculation fait intervenir la résistance de type I (résistance à l'infection initiale) et la résistance de type II (résistance à la colonisation), alors que la seconde ne fait intervenir que la résistance de type II (Schroeder and Christensen, 1963; Miedaner et al., 2003; Bai and Shaner, 2004). Ces résultats suggèrent, outre la faible résistance de type II présente naturellement chez l'écotype Bd21-3 comme nous l'avons préalablement décrit lors de la description de l'interaction entre *B. distachyon* et *F. graminearum*, l'importance du déoxynivalénol dans l'initiation de l'infection. A ce jour aucune étude, chez le blé ou l'orge, n'a testé la capacité d'infection de la souche *FgDON^r* par l'intermédiaire de la pulvérisation de l'agent pathogène. Les résultats obtenus chez *Brachypodium* par cette méthode montrent que cette souche est incapable de coloniser l'ensemble de l'épillet contrairement à l'infection par inoculation ponctuelle. Les symptômes obtenus après pulvérisation de la souche *FgDON^r* se caractérisent par de nombreuses petites zones de brunissement à la surface des tissus stériles de l'épi. Comme nous l'avons décrit lors du **chapitre 1**, la souche *FgDON^r* semble confinée et/ou ralentie dans son développement par la plante par des mécanismes de résistance ressemblant à de la PCD. La présence de DON à faibles concentrations lors des étapes précoces de l'infection semble donc nécessaire à l'installation de l'agent pathogène dans les tissus végétaux afin qu'il soit capable par la suite d'induire la mort cellulaire nécessaire à sa phase de vie nécrotrophe. L'analyse des lignées surexpresses (par pulvérisation et inoculations ponctuelles) montre le rôle déterminant joué par la conjugaison du DON en D3G dans l'établissement de la résistance quantitative à l'agent pathogène aussi bien par l'intermédiaire de la résistance de type I que par celle de type II. Le dosage du DON et de son conjugué au cours de l'interaction nous a permis de confirmer qu'il y a bien un lien direct entre la capacité de la plante à glucosyler le DON et la résistance observée. L'augmentation du ratio D3G/DON et la quantité totale de DON produite sont des marqueurs de résistance de la plante à l'agent pathogène (Bollina et al., 2011; Kumaraswamy et al., 2011a). D'après nos résultats, l'augmentation de la conjugaison du DON en D3G (détectée par l'intermédiaire du ratio D3G/DON) et la diminution de la quantité totale de DON dans les phases très précoces de l'infection sont essentielles pour la mise en place d'une résistance efficace vis-à-vis de l'agent pathogène. La faible détection de D3G dans les lignées mutantes est probablement due à une activité résiduelle DON-glucosyltransférase, peut-être due à la protéine codée par le gène *Bradi5g02780*, cette protéine ayant au préalable montré sa capacité à conjuguer le DON en D3G. Jusqu'à aujourd'hui, le DON était considéré comme un facteur de virulence important

dans la phase de colonisation par l'agent pathogène (Jansen et al., 2005; Maier et al., 2006; Boenisch and Schafer, 2011) mais pas dans l'initiation de l'infection. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la recherche de résistances chez le blé. Il est totalement envisageable de transférer les connaissances acquises sur l'espèce modèle *Brachypodium* chez le blé tendre. Cela pourrait se traduire par la recherche d'orthologues fonctionnels de la protéine Bradi5g03300 dans les bases de données du blé tendre disponibles à l'INRA de Clermont-Ferrand. Une fois un ou des gènes candidats, identifiés l'utilisation de l'approche développée (analyse de l'expression et capacité à conjuguer le DON en D3G en système levure) dans le **chapitre 2** serait un moyen idéal de réduire le nombre de candidats. Le candidat identifié pourrait alors faire l'objet de différentes analyses fonctionnelles par transformation génétique aussi bien du blé que de *Brachypodium*. Il serait possible de rechercher dans les variétés élites de blé des allèles répondant transcriptionnellement précocement (par le biais d'eQTLs) lors de l'infection afin de permettre la prise en charge de la mycotoxine dès sa production par l'agent pathogène. Il sera également possible de surexprimer ce gène chez le blé afin de voir si la surexpression confère une résistance dans un cultivar sensible. De plus les populations de mutants EMS disponibles chez le blé pourront être criblées pour la recherche de mutations ponctuelles entraînant une altération de la protéine comme nous avons pu le faire dans cette étude chez *Brachypodium*. En parallèle, il serait également possible de surexprimer ce candidat soit dans un fond génétique sauvage pour *Bradi5g03300*, soit de compléter une des lignées mutantes afin d'observer si gène est capable de conférer une résistance à la fusariose chez *Brachypodium*.

3. Bradi5g03300 est-elle impliquée vis-à-vis d'autres TCT B ? Possède-t-elle un substrat endogène ?

L'UGT Bradi5g03300 est capable de conjuguer le DON en D3G aussi bien en système hétérologue (**Chapitre 2**), *in vitro* (résultats préliminaires sur la protéine recombinante) qu'*in planta* (dosage du D3G dans les différentes lignées de *Brachypodium*). Nous avons pu, plus récemment, montrer que cette UGT semble également impliquée vis-à-vis d'autres TCT B comme le NIV, 3-ADON et le 15-ADON. Le DON et le NIV ne diffèrent que par la présence d'un groupement hydroxyle sur le carbone 4. A l'heure actuelle le NIV-3-*O*-glucoside a pu être identifié (Yoshinari et al., 2014). Il sera intéressant de déterminer si Bradi5g03300 est capable de glycosyler le NIV et s'il s'agit de la même position que celle décrite dans la littérature. Poppenberger et collaborateurs (2003) ont pu montrer qu'UGT73C5 d'*Arabidopsis* conférait aussi la tolérance au 15-ADON chez la levure mais ils n'ont pas corrélé cette

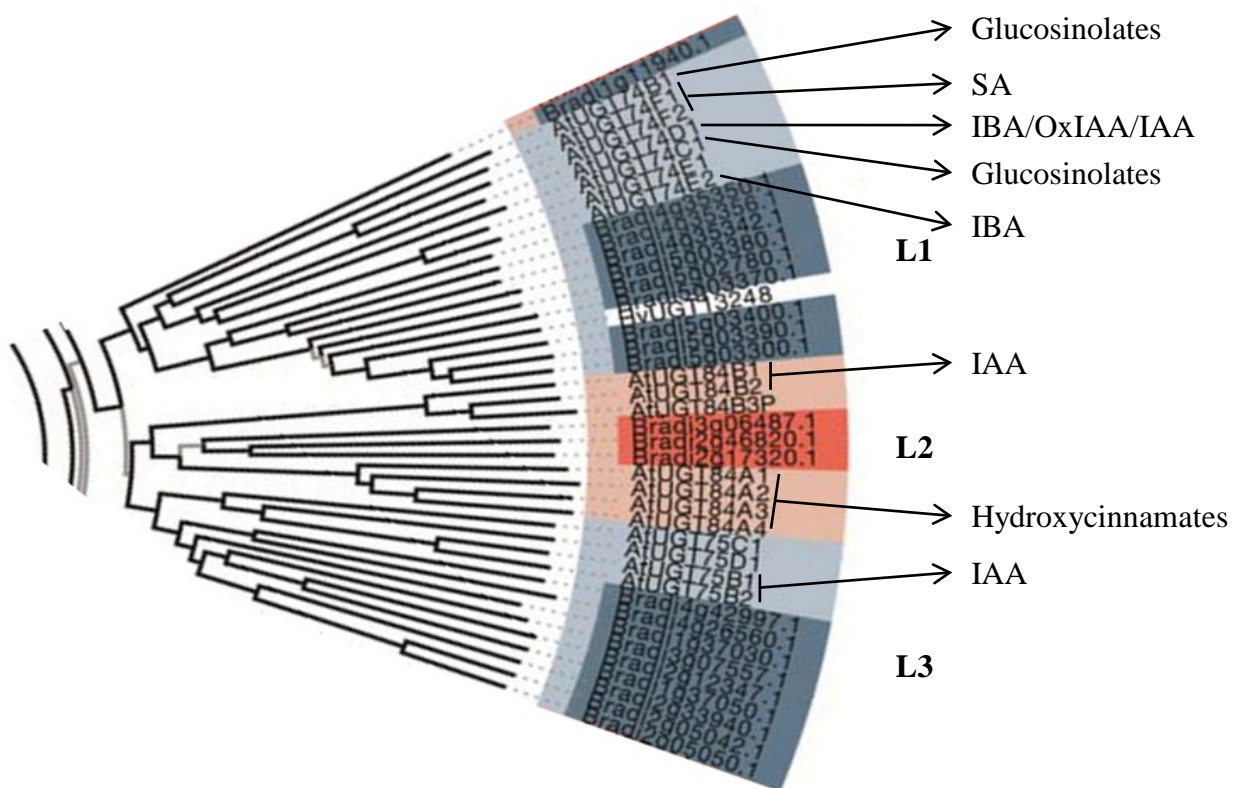


Figure 30 : Substrats connus des UGTs du groupe L chez *A. thaliana*. SA : acide salicylique ; IBA : Acide indole-3-butyrique ; IAA : Acide indole 3-acétique ; OxIAA : Acide 2-oxoindole-3-acétique.

résistance avec la détection de 15-ADON-glucoside comme dans le cas du DON. De façon intéressante, ces mêmes auteurs ont conclu que cette même UGT ne conférait pas la résistance au NIV. L'encombrement stérique dû à la présence du résidu hydroxyle en C4 empêcherait la glycosylation par cette UGT. Cependant, *Arabidopsis* n'est pas naturellement confrontée aux mycotoxines, *F. graminearum* n'étant pas un pathogène naturel de cette espèce, et peut, au cours de l'évolution, avoir perdu la capacité à glycosyler de tels xénobiotiques ou n'avoir acquis cette fonction qu'envers certains substrats. Comme dans le cas du NIV, il sera intéressant de déterminer si la tolérance en réponse au 15-ADON observée s'accompagne de la formation de 15-ADON-glucoside. Dans le cas du 3-ADON nous pouvons émettre deux hypothèses pour expliquer la tolérance ou la sensibilité des différentes lignées à cette toxine. La première serait que l'UGT peut glycosyler cette toxine sur un des deux autres groupements -OH restant disponibles, celui en C3 étant bloqué par le groupement acétyle. La seconde hypothèse est que ce mécanisme fait intervenir, dans un premier temps, une désacétylase afin de rendre le carbone 3 libre pour la glycosylation. Cette seconde hypothèse est également valable vis-à-vis du groupement acétyle du carbone 15 du 15-ADON pour donner du DON apte à être conjugué.

Afin de tester ces hypothèses, deux types d'expérimentations sont possibles, la première sera d'utiliser le système levure présenté au cours du **chapitre 2** mais en utilisant comme mycotoxine le NIV, le 15-ADON et le 3-ADON. La seconde sera de déterminer *in vitro* à l'aide de la protéine recombinante et d'analyses HPLC-MC/MS la nature du(des) produit(s) formé(s). Ces résultats pourront être complétés par la détection *in planta* des glucosides précédemment identifiés soit après application de mycotoxines seules soit après infection par une souche de chémotype adapté sachant que nous avons pu montrer que la surexpression du gène codant l'UGT Bradi5g03300 conférait la résistance à des souches de *F. graminearum* de chémotype DON/15-ADON, NIV/4-ANIV et DON/3-ADON.

Dans la littérature, des analyses fonctionnelles sur des UGTs d'*Arabidopsis* (UGT74) appartenant comme Bradi5g03300 au groupe L ont montré que celles-ci ont un rôle majeur dans la gestion de métabolites issus des indoles (hormones et glucosinolates) (Grubb et al., 2004; Tognetti et al., 2010; Jin et al., 2013; Tanaka et al., 2014) (**Figure 30**). Des lignées surexprimant ces UGTs peuvent présenter une modification de phénotype, c'est le cas par exemple de lignées OE-UGT74E2 chez *Arabidopsis* qui montrent une augmentation du nombre de ramifications de l'inflorescence et une compression de la rosette. *A contrario* la surexpression chez *Arabidopsis* d'UGT74D1, ayant également comme substrat l'IBA, n'a pas montré de modification de l'inflorescence et de la rosette mais les plantes présentent des

Tableau 10 : UGTs identifiées comme impliquées dans la glucosylation de mycotoxines grâce à l'utilisation du système hétérologue levure.

Protéine	Mycotoxine	Mycotoxine glycosylée	Référence
AtUGT73C5	DON	DON-3- <i>O</i> -Glc	Poppenberger et al., 2003
HvUGT13248	DON	DON-3- <i>O</i> -Glc	Schweiger et al., 2010
AtUGT73C6	ZEA	ZEA-4- <i>O</i> -Glc	Poppenberger et al., 2006
HvUGT14077	ZEA	ZEA-16- <i>O</i> -Glc	Kovalsky Paris et al., 2014

At : *A. thaliana* ; Hv : *H. vulgare*

feuilles recourbées (Jin et al., 2013). La surexpression d'UGT84B1, capable de glycosyler l'acide indole-3-acétique, engendre une très forte modification du phénotype avec une augmentation de la ramification de l'inflorescence, une rosette compressée et des feuilles courbées et ridées (Jackson et al., 2002). Il est intéressant de noter que l'altération d'UGTs prenant en charge les mêmes substrats (UGT74E2 et UGT74D1) n'altère pas de façon identique le phénotype de la plante. La gestion du pool d'hormones chez *Arabidopsis* semble régulée de manière très fine par les UGTs. Chez *Brachypodium*, ni la mutation ni la surexpression du gène codant l'UGT Bradi5g03300 n'entraînent d'altération du phénotype. De plus des analyses menées au laboratoire sur la croissance racinaire de ces lignées en présence d'auxine n'ont pas montré de différence avec la lignée sauvage. Il est fort probable que d'autres UGTs du clade L1 plus proche phylogénétiquement des UGTs d'*Arabidopsis* soient responsables de la gestion du pool d'hormones indoliques chez *Brachypodium*, notamment des UGTs autres que les 6 protéines candidates identifiées (**Figure 30**). Des résultats préliminaires de comparaison de profils métaboliques sur des plantes saines à mi-anthèse (obtenus par HPLC-MS/MS) entre la lignée sauvage Bd21-3, la lignée mutante 6829-7 et la lignée surexpresser OE-10R14 ne montrent pas de différence d'accumulation d'un quelconque métabolite au stade mi-anthèse (Pawel Bednarek, communication personnelle). Nous pouvons donc légitimement nous interroger sur la présence d'un substrat endogène pour cette UGT. Afin d'essayer d'affiner ces résultats, des analyses similaires sont en cours sur des épis de *B. distachyon* après infection par *F. graminearum*, au cas où la biosynthèse du substrat endogène serait dépendante de l'infection par l'agent pathogène.

L'ensemble des résultats obtenus pendant cette thèse nous a permis de confirmer que *Brachypodium distachyon* constitue un modèle d'étude pertinent dans l'objectif d'acquérir de nouvelles connaissances sur la fusariose des épis.

L'utilisation du système hétérologue levure a montré à plusieurs reprises le rôle de différentes UGTs dans la conjugaison de mycotoxines (**Tableau 10** et également cette étude). L'utilisation de ce système vis-à-vis d'autres TCT B voire même d'autres toxines fongiques permettrait probablement d'identifier de nouvelles UGTs capables de glycosyler ces mycotoxines. Celles-ci seraient alors des candidats idéaux pour étudier, par le biais d'analyses fonctionnelles *in planta*, leur rôle lors de l'interaction entre la plante et l'agent pathogène.

L'utilisation de ce système hétérologue pourrait être étendue à d'autres familles multigéniques telles que les GSTs, les CYPs et les transporteurs. Nos données transcriptomiques sont sources de nombreux candidats. L'extension aux GSTs semble

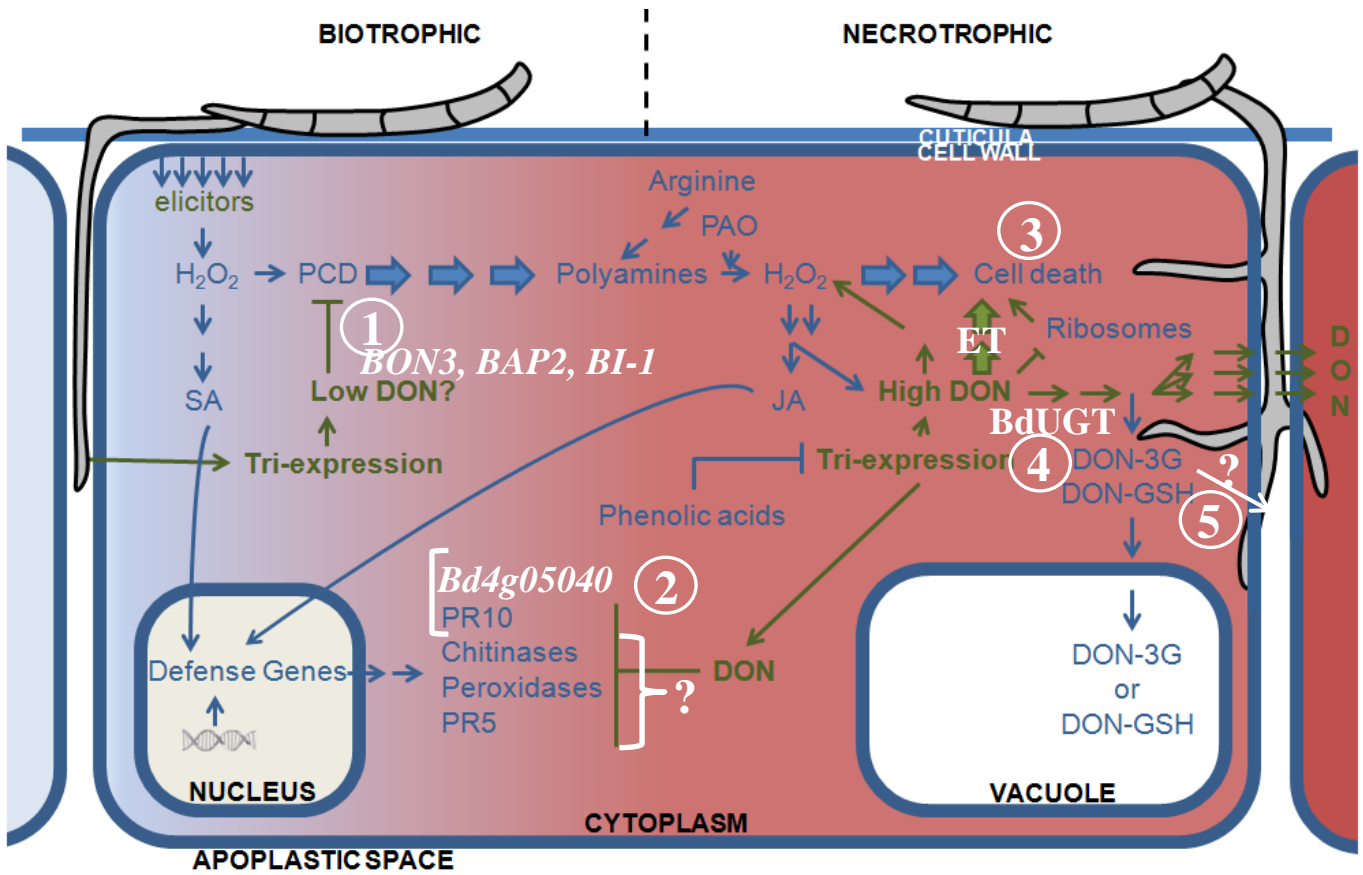


Figure 31 : Impact du DON sur la cellule végétale. BI-1 : Bax inhibiteur 1 ; ET : éthylène. En blanc les gènes ou protéine de *B. distachyon* impliqués dans les différents processus. En bleu les réponses de la plante, en vert les réponses de l'agent pathogène ; BdUGT = UGT codée par le gène *Bradi5g03300*, d'après Audenaert et al., 2013.

particulièrement prometteuse maintenant qu'une forme DON-GSH a pu être identifiée *in planta* (Kluger et al., 2013).

Le laboratoire dispose désormais d'un ensemble de données transcriptomiques extrêmement informatives sur les réponses transcriptionnelles mises place pendant l'infection ou en réponse au déoxynivalénol. Ces données vont permettre d'identifier de nouvelles fonctions potentiellement impliquées dans les processus de détoxification du DON et importantes dans la mise en place de la résistance par la plante. L'analyse fonctionnelle de l'UGT Bradi5g03300 montre le rôle majeur que joue cette enzyme dans la conjugaison du DON en D3G et l'importance d'une conjugaison précoce du DON lors de l'infection pour permettre la mise en place d'une résistance quantitative.

Récemment, Audenaert et collaborateurs (2013) ont proposé un schéma synthétique résumant les hypothèses sur le rôle du DON dans l'interaction entre la plante et l'agent pathogène (**Figure 31**). De nombreux aspects développés dans ce schéma n'ont pas été démontrés *in planta* à ce jour. Les connaissances acquises au cours de cette thèse permettent de confirmer certaines des hypothèses posées par ces auteurs et d'apporter des informations plus précises.

L'inhibition de la PCD par le DON à faibles concentrations avait uniquement été montrée sur des cultures cellulaires *in vitro* (Diamond et al., 2013). Nos résultats apportent la preuve d'une induction transcriptionnelle de gènes codant des protéines inhibitrices de la PCD lors de l'interaction mais également suite à l'application du DON seul (**Focus 1, Figure 31**). L'inhibition par le DON des réactions de défense de la plante reste assez peu démontrée. Dans nos données, nous avons pu montrer la répression spécifiquement par la souche *FgDON*⁺ d'un gène codant une PR10. Cependant, ce type de situation n'est pas généralisable (**Focus 2, Figure 31**). L'induction de la mort cellulaire en phase nécrotrophe et en présence de fortes concentrations DON, *via* la manipulation de la voie l'éthylène semble de plus en plus mise en avant (Chen et al., (2009) ; cette étude ; **Focus 3, Figure 31**). La formation de DON-GSH a pu être récemment démontrée chez le blé tendre (Kluger et al., 2013). Compte-tenu de l'activation transcriptionnelle de gènes codant des GSTs dans notre étude, il est vraisemblable que cette mycotoxine masquée puisse également être produite par *B. distachyon*. Nous savons désormais que la conjugaison du DON en D3G est fortement corrélée à la résistance et que celle-ci est catalysée *in planta* par l'UGT Bradi5g03300 chez *B. distachyon* (**Focus 4, Figure 31**). En revanche, aucune étude ne démontre l'adressage du DON-GSH ou D3G à la vacuole, ces molécules peuvent très bien également être exportées vers l'apoplasme (**Focus 5, Figure 31**).

L'ensemble des connaissances acquises durant cette thèse pourront ainsi être transférées sur les plantes cultivées d'intérêt agronomique, comme le blé et l'orge. Ces nouvelles connaissances sont un atout non négligeable dans l'objectif d'améliorer la résistance des céréales à pailles à la FHB.

MATERIELS ET METHODES

A. Matériel végétal

1. Lignées sauvages et conditions de culture

Toutes les expériences ont été réalisées sur la Poacée *B. distachyon*. Les deux écotypes Bd21 et Bd21-3 proviennent de l'écotype iraquien PI 254867 (Vogel and Bragg, 2009). Les lignées mutantes TILLING et les lignées surexprimeurs sont issues du fond génétique Bd21-3. L'ensemble de ces lignées seront par la suite conduites de la même façon. Les semences sont stérilisées 10 minutes dans de l'hypochlorite de sodium à 0,6% sous agitation douce puis subissent 3 rinçages successifs de 10 minutes dans de l'eau milliQ stérile (toujours sous agitation douce). Les semences sont ensuite placées 4 jours à 4°C et à l'obscurité dans de l'eau milliQ stérile. Le semis a lieu sur un mélange 2/1 (v/v) de terreau (Tref terreau P1, Jiffy France SARL, Trevoux, France) et de perlite (Sinclair, Gainsborough, UK) dans des pots de 13 cm de diamètre avec une densité de 5 graines par pot. Avant semis, les pots sont imbibés avec une solution de 2 ml/l de Prévicur[®] (fongicide de la famille des carbamates, anti-oomycète, Bayer Crop Sciences) et 1 g/l d'Hortigard[®] (larvicide, Syngenta France, Guyancourt, France). La croissance se déroule en chambre de culture dans les conditions suivantes : une photopériode de 20 h de lumière ($265 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) à 24°C et 4 h d'obscurité à 20°C. Ces conditions permettent, sur ces lignées, de supprimer la vernalisation afin de synchroniser la floraison (Vogel and Bragg, 2009).

2. Obtention de lignées altérées dans la protéine Bradi5g03300

La recherche de lignées portant des mutations ponctuelles d'intérêt (codon stop ou mutation(s) non synonyme(s)) dans le gène *Bradi5g03300* a été réalisée en collaboration avec Marion Dalmais de l'URGV d'Evry par criblage de la collection de mutants TILLING de *B. distachyon* (écotype Bd21-3). Ces expériences ont été réalisées selon le protocole général décrit dans Dalmais et al. (2013) avec les couples d'amorces suivants, spécifiques du gène *Bradi5g03300* : UGT33N1F2 (5'-GTC-ACT-ACC-ACC-AAA-TAT-TTG-GG-3') et UGT33N1R1 (5'-CAA-AGA-CCA-GAA-ATG-ATG-TAG-GAG-G-3') pour la première réaction de PCR et 3300_N2Ft1 (5'-GGT-ACT-TGG-TTG-TTG-ATA-GTT-ATG-C-3') et 3300_N2Rt1 (5'-GTG-TGC-TCC-TTC-GGC-CC-3') pour la seconde réaction de PCR.

3. Obtention de lignées surexprimant le gène *Bradi5g03300*

L'ADNc correspondant au gène *Bradi5g03300* a été amplifié avec les amorces spécifiques suivants : 5'-CGG-GAT-CCC-GAT-GGA-CAG-CAC-AGG-CAA-ATC-GGT-

GAT-GGC-GA-3' et 5'-GG-ATA-TCC-TTA-ACT-TGA-CGA-ATA-CTT-AGC-AGC-GAA-TTC-AGC-A-3'. L'amplicon correspondant, après migration sur gel d'électrophorèse, a été purifié avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) et ligué dans le plasmide pENTR1A (**Annexe 1**) après digestion par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RV. Le plasmide résultant de cette ligation, pEntry-OE3300, a permis le transfert de l'ADNc de *Bradi5g03300* par réaction de recombinaison de type Gateway (LR Gateway® Invitrogen) dans le plasmide pIPKb002 (**Annexe 1**) (Himmelbach et al., 2007) aboutissant au plasmide final pIPKb002-Bradi5g03300. La souche AGL1 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été électro-transformée avec pIPKb002-Bradi5g03300. L'écotype Bd21-3 a ensuite pu être transformé par cette souche d'*A. tumefaciens* et régénéré selon les méthodes décrites par Vogel and Hill (2008) et Alves et al., (2009). Après sélection, l'analyse de la ségrégation des transformants est réalisée sur milieu Murashige & Skoog contenant 50 mg/l d'hygromycine afin d'identifier les lignées portant un seul locus d'insertion. Dans cette construction, la surexpression du gène d'intérêt, ici *Bradi5g03300*, est sous contrôle du promoteur fort et constitutif de l'ubiquitine du maïs (*Zea mays*) (**Annexe 1**).

B. Agents pathogènes

1. Maintenance des souches de *F. graminearum*

Les 4 souches de *F. graminearum* utilisées dans cette étude sont PH-1 (NRRL 31084, *FgDON*⁺), PH-1 Δ *tri5* (MU102 ; *FgDON*⁻) (Cuzick et al., 2008), INRA162 et *Fg3ADON* (ou 00-500). La souche PH-1 a été sélectionnée pour son agressivité sur blé tendre, sa production de mycotoxine et son chémotype (de type DON/15-ADON, forme acétylée mineure, (Goswami and Kistler, 2005)). La souche PH-1 Δ *tri5* a été inactivée pour le gène *Tri5* (gène codant le 1^{er} enzyme de la voie de biosynthèse des trichothécènes ; (Foroud and Eudes, 2009)) rendant la souche incapable de produire des trichothécènes de type B (Cuzick et al., 2008). Cette souche nous a été transmise par Martin Urban (Rothamsted Research Center, Grande-Bretagne). La souche INRA162 de chémotype NIV/4-ANIV nous a été transmise par Christian Barreau (*INRA-MycSA*, Bordeaux, France). La souche 00-500 (ou *Fg3ADON*), de chémotype DON/3-ADON, nous a été transmise par Corby Kistler (University of Minnesota, Etats-Unis). Les souches sont cultivées sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA, **Annexe 2A**) dans une étuve à 26°C, elles sont repiquées toutes les 2 à 3 semaines.

2. Production de conidies

A partir d'une culture âgée de 8 à 15 jours sur milieu PDA, 30 ml de mung bean (**Annexe 2A**) dans un erlenmeyer de 150 ml sont inoculés avec 10 implants mycéliens (environ 5 mm²/implant ; (Bai and Shaner, 1996)) et incubés 5 à 7 jours à température ambiante sous agitation (180 tr/min). A l'issue de cette incubation, le volume final souhaité de mung bean est inoculé avec 1/10 de volume de la première suspension de spores et incubé de nouveau 5 à 7 jours sous agitation (180 tr/min). La culture liquide est filtrée sur Miracloth stérile (Calbiochem, Toulouse, France) et les spores sont quantifiées sur cellule de Thoma et resuspendues dans du Tween 20 à 0,01% à une concentration finale de 10⁵ spores/ml.

C. Traitements

1. Inoculation par *F. graminearum*

B. distachyon est inoculé ponctuellement par apport de 3 µl d'une suspension de spores (10⁵ spores/ml dans du Tween 20 à 0,01%) dans une fleur centrale à mi-anthèse (30-35 jours après semis) du second épillet à partir du haut. La condition contrôle est réalisée en inoculant 3 µl de Tween 20 à 0,01%.

L'inoculation par pulvérisation consiste à inoculer des épis de *B. distachyon* par pulvérisation d'une suspension de spores (10⁵ spores/ml dans du Tween 20 à 0,01%) sur l'ensemble de la plante lorsque les épis sont à mi-anthèse (environ 20 ml de suspension de spores pour un pot de 5 plantes). La condition contrôle est réalisée en pulvérisant uniquement du Tween 20 à 0,01%.

Après inoculation (ponctuelle ou par pulvérisation), les plantes sont couvertes par un sac plastique transparent pulvérisé avec de l'eau. Pendant les 24 premières heures, les plantes sont maintenues à l'obscurité à 20°C puis transférées en chambre de culture avec une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit à respectivement 20°C et 18°C.

2. Application de déoxynivalénol

B. distachyon est inoculé ponctuellement par apport de 2 µg de déoxynivalénol dans une solution d'acétonitrile et de Tween 20 à 0,01% (1,35 µl d'acétonitrile et 1,65 µl de Tween 20 à 0,01%, soit une concentration finale de 670 mg/l) dans une fleur centrale (30-35 jours après semis) du second épillet à partir du haut à mi-anthèse. La condition contrôle est réalisée en inoculant uniquement la solution d'acétonitrile et de Tween 20 à 0,01% sans mycotoxine.

Les plantes sont ensuite incubées comme décrit précédemment (voir **Matériels et Méthodes**, partie C.1.) mais sans mise à l'obscurité pendant les 24 premières heures.

3. Evaluation de la phytotoxicité des mycotoxines

Pour tester la phytotoxicité du DON, du NIV, du 3-ADON et du 15-ADON, les semences de *B. distachyon* ont été mises en culture en boîtes de Petri carrées (12*12 cm) sur milieu gélosé (**Annexe 2B**) avec différentes concentrations de mycotoxines afin d'évaluer la croissance racinaire. Les semences ont préalablement été préparées de la façon suivante : la glumelle supérieure est retirée puis les semences sont stérilisées 5 min dans de l'hypochlorite de sodium à 0,6% sous agitation douce puis subissent 3 rinçages successifs de 10 minutes dans de l'eau milliQ stérile (toujours sous agitation douce). Les semences sont ensuite placées 4 jours à 4°C et à l'obscurité dans de l'eau milliQ stérile puis semées (face plane contre la gélose et phase convexe avec l'embryon à l'opposé de la gélose pour favoriser la sortie de la radicule et de la première feuille) sur milieu Murashige & Skoog modifié (**Annexe 2B**) contenant ou non des mycotoxines. Les mycotoxines utilisées sont dissoutes dans du méthanol pur à une concentration finale de 10 g/L. La condition contrôle sans mycotoxine est complétée par l'ajout du même volume de méthanol que la condition avec mycotoxine correspondante. Pendant les deux premiers jours les boîtes de Pétri sont maintenues à la verticale à l'obscurité puis, pendant les 5 jours suivants, une feuille d'aluminium est placée autour de la boîte au niveau des racines pour limiter l'apport de lumière. Ces expériences sont réalisées dans les conditions de lumière et de température décrites précédemment (voir **Matériels et Méthodes**, partie A.1.). La longueur des racines est évaluée 7 jours après semis.

4. Traitement à la sérotonine de *F. graminearum in vitro*

L'effet de la sérotonine sur la croissance radiale a été estimé en plaçant un implant mycélien (3 mm diamètre) de la souche *FgDON*⁺ âgée de 7 jours dans le centre d'une boîte de Petri (5,5 cm) de PDA contenant une concentration finale de 0, 1 ou 5 mM de sérotonine (Sigma-Aldrich, Lyon, France). La croissance radiale a été estimée après 24 et 48 heures de croissance à 26°C par mesure de 2 diamètres perpendiculaires lors de 3 répétitions indépendantes.

1 ml de milieu liquide de mung bean contenant une concentration finale de 0, 1 ou 5 mM sérotonine a étéensemencé avec 10⁴ conidies de la souche *FgDON*⁺. Les conidies ont été comptées quotidiennement à l'aide d'une cellule de Thoma pendant une semaine lors de 3 répétitions indépendantes.

Le pourcentage de germination des conidies de *FgDON*⁺ sur de l'eau gélosée (2% agar) contenant de la sérotonine (0, 1 ou 5 mM) est déterminé par comptage du nombre de conidies germées ou non sur un total de 100 conidies 3, 6 ou 9 h après incubation à 26°C lors de 3 répétitions indépendantes.

D. Manipulations des acides nucléiques

1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN génomique végétaux et fongiques à partir d'épis infectés est réalisée comme décrit par Atoui et., (2012).

2. Extraction d'ARN

Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide puis broyés finement dans un mortier sous azote liquide. Environ 100 mg de poudre sont récupérés dans un tube 2 ml puis 1 ml de TRIzol[®] (Invitrogen) est ajouté, le tout est bien homogénéisé et centrifugé 10 minutes à 4°C (13000 tr/min). Le surnageant est transféré dans un nouveau tube de 2 ml, celui-ci est incubé 10 minutes à température ambiante, 200 µl de chloroforme sont ajoutés avant de vortexer 15 secondes, d'incuber 2 à 3 minutes à température ambiante et de centrifuger 15 minutes à 4°C (13000 tr/min). La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube, réextraite avec un volume de chloroforme, puis vortexée 15 secondes et incubée 2 à 3 minutes à température ambiante avant d'être centrifugée 15 minutes à 4°C (13000 tr/min). 500 µl d'isopropanol sont ajoutés à la phase aqueuse transférée dans un nouveau tube pour précipiter les acides nucléiques, le tube est vortexé et incubé 10 minutes à température ambiante avant centrifugation de 10 minutes à 4°C (13000 tr/min). Une fois le surnageant éliminé, le culot d'ARN/ADN est rincé avec 1 ml d'éthanol à 75% (-20°C), avant de vortexer et de centrifuger de nouveau 10 minutes à 4°C (13000 tr/min). L'éthanol est retiré, le culot est légèrement séché avant d'ajouter 40 µl d'eau RNase-free et de conserver à -80°C.

Après au minimum une nuit à -80°C pour faciliter la resuspension du culot, une digestion à la DNase I RNase free (Ambion©) est réalisée. Pour cela, 4,5 µl de Tampon 10X et 1 ml de DNase I sont ajoutés par échantillon. Les échantillons sont incubés 30 minutes à 37°C et la DNase est inactivée par ajout de 5 µl d'inhibiteur de DNase (Ambion©). L'ensemble est vortexé et incubé 2 minutes à température ambiante puis centrifugé 90 secondes à 13000 tr/min. Le surnageant est récupéré et les ARN sont dosés par spectrophométrie (NanoDrop, Thermo Scientific) à 260 nm.

3. RT-PCR quantitative

La réaction de transcription réverse (RT pour reverse-transcription) est réalisée avec le kit Improm-II™ (Promega). 1 µl d'oligo dT (500 µg/ml) et 1 µg d'ARN totaux dans un volume final de 5 µl sont incubés 5 minutes à 70°C puis mis sur glace. Ces 5 µl sont complétés avec 15 µl du mélange suivant : 1 µl de dNTP (10 mM chaque), 1,2 µl de MgCl₂ (25 mM), 4 µl de Tampon 5X, 1 µl de transcriptase réverse et 7,8 µl d'eau stérile. Les 20 µl obtenus sont alors soumis à 3 étapes :

- 25°C pendant 5 minutes
- 42°C pendant 1 heure
- 70°C pendant 15 minutes

Chaque réaction aboutit à l'obtention d'une solution d'ADNc conservée à -20°C.

La réaction de PCR quantitative (PCRq) est réalisée avec 2 µl de produit de RT dilué au 10^{ème} comme matrice, 8 pmoles de chaque amorce spécifique ainsi que 10 µl de SYBRGreen I Master (Roche), le tout étant complété avec de l'eau stérile pour obtenir un volume final de 20 µl. L'amplification est réalisée sur un appareil LightCycler 480. L'amplification se décompose de la façon suivante : après une étape de dénaturation 10 min à 95°C, les échantillons sont soumis à 45 cycles de 15 s à 95°C et 40 s à 60°C. A la fin du programme les échantillons sont chauffés graduellement de 65°C à 95°C afin d'acquérir la courbe de dissociation. Chaque réaction de PCRq est réalisée en duplicat pour un même échantillon biologique. Les séquences nucléotidiques des amorces spécifiques utilisées en PCRq sont indiquées en **Annexe 3**. Chaque couple d'amorces a, au préalable, été testé par PCR classique sur l'ADNg de l'organisme cible (*B. distachyon* ou *F. graminearum*), ainsi que sur des produits de RT de ce même organisme, pour vérifier leur spécificité. Afin de déterminer l'efficacité de chaque couple d'amorces en PCRq, une gamme étalon de dilutions sériées (1/2, 1/10, 1/50, 1/100) est réalisée à partir d'un mélange équivolument des ADNc de tous les échantillons et répétitions biologiques d'une même condition.

4. Analyse des résultats de qPCR

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel LightCycler 3 (Roche) pour la détermination de l'efficacité (E) et des Ct (Threshold cycle) des couples d'amorces, en fonction des différentes conditions. L'expression relative (R) de chaque gène est calculée en utilisant la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

E. Test de résistance aux agents pathogènes

1. Quantification de l'ADN fongique dans des tissus infectés

La quantification de la biomasse fongique est réalisée par PCRq absolue sur ADNg après extraction de l'ADNg total de tissus infectés. La réaction PCRq est réalisée sur 10 ng d'ADNg comme matrice avec un couple d'amorces (**Annexe 3**) spécifique de la région génomique codant la sous-unité ribosomique 18S du champignon (Mudge et al., 2006). Le programme de PCRq est le même que décrit précédemment (voir **Matériels et Méthodes**, partie **D.3.**). Afin de quantifier avec précision l'ADNg fongique, une gamme de quantités connues d'ADNg fongique est réalisée en parallèle et permet d'établir une courbe standard. L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel LightCycler 3 (Roche).

2. Quantification des spores sur tissus infectés.

5 épis infectés (contenant 3 épillets) sont mis dans 10 ml d'eau stérile sous agitation (30 min à 180 rpm). La solution est ensuite filtrée sur Miracloth (Calbiochem, Toulouse, France) et les spores sont dénombrées à la cellule de Thoma.

3. Détection de la colonisation fongique du rachis

Des épis sont collectés 7 jours après inoculation ponctuelle. Les épillets sont coupés et la surface du rachis est stérilisée avec de l'éthanol 100%. Des sections fines du rachis sont ensuite découpées vers le haut et le bas à partir de l'épillet inoculé. Ces sections de rachis sont alors déposées sur boîte de Pétri contenant de l'eau gélosée (2% d'agar). La croissance mycélienne à partir du centre de la tranche est observée après 48 à 72 h d'incubation à 26°C.

4. Evaluation des symptômes

Après inoculation ponctuelle, les symptômes sont évalués selon une échelle de notation mise en place au laboratoire. Cette échelle est fondée sur la capacité du champignon à coloniser les fleurs et épillets adjacents par rapport à celles et ceux inoculés. Un score de 0 est attribué à l'épi si aucune fleur ne présente de symptôme. Un score de 1 est attribué si seule la fleur inoculée est symptomatique (brunissement). Un score de 2 est attribué si la moitié des fleurs de l'épillet inoculé présentent des brunissements ou blanchiments. Un score de 3 est attribué si la totalité de l'épillet est symptomatique. Enfin un score de 4 est attribué si la totalité de l'épillet est symptomatique et qu'un épillet adjacent présente également des symptômes.

Après inoculation par pulvérisation, les symptômes sont évalués par la proportion d'épillets présentant des brunissements ou blanchiments par rapport à la totalité des épillets.

5. Analyses microscopiques

La coloration du champignon dans des tissus infectés est adaptée de Cao et al., (1998). Les épillets sont décolorés dans une solution d'éthanol/acide acétique (3/1, v/v) pendant 24 h. Ils sont ensuite bouillis pendant 5 min dans du lactophénol (Fluka, Lyon, France) contenant 0,1% de bleu de Trypan et décolorés de nouveau 24 h dans une solution d'hydrate de chloral (8 g de chloral hydrate, 1 ml de glycérol 100% et 2 ml d'eau). L'acquisition des images se fait sur un microscope (Axioskop, Zeiss) couplé à une caméra (Spot RT slider camera, Diagnostic Instrument).

L'observation des racines après croissance sur un milieu avec ou sans mycotoxine a été réalisée de la façon suivante : les racines sont fixées 24 h dans de l'éthanol/acide acétique (3/1, v/v) puis rincées 20 min dans l'éthanol 70% et placées une nuit à température ambiante dans une solution d'hydrate de chloral (comme décrit précédemment) avant d'être montées entre lame et lamelle et observées sous contraste interférentiel au microscope (AZ100, NIKON) couplé à une caméra (Nikon RI1).

F. Analyses métabolomiques

1. Extraction et quantification de mycotoxines *in planta*

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Vessela Atanasova-Penichon (INRA-MycSA, Bordeaux, France).

500 mg de matière fraîche (épis ou épillets) sont broyés au mortier dans l'azote liquide et transférés dans tube de 15 ml avant d'ajouter 7 ml d'acétonitrile/eau (84/16, v/v), 0,5 µg de 4-ANIV (servant ici de standard interne). Après une heure d'agitation à 50 rpm sur une roue à température ambiante, le tout est centrifugé 5 min à 5000g, le surnageant est prélevé et purifié sur colonne P Trichotecenes (P51 R-Biopharm). 3 ml du filtrat sont récupérés et évaporés sous flux d'azote à 50°C. Le culot est resuspendu dans 400 µl de méthanol/eau (50/50, v/v) puis passé sur un filtre 22 µm avant analyse

Les concentrations de DON, D3G, 15-ADON et 4-ANIV sont déterminées par analyses HPLC-MS/MS. Ces analyses sont réalisées sur une HPLC (1100 Series HPLC, Agilent) couplée à un spectromètre de masse en tandem (QTrap 2000 LC/MS/MS, Applied Biosystems) avec une colonne en phase inverse (Kinetex™ 2,6 µm XB-C18 column ; 150x4,6

mm, Phenomenex) et une source d'ions (TurboIonSpray ESI source). Le flux de solvant est de 700 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans la colonne mais seulement 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ sont gardés pour la source d'électrospray. Les solvants A et B sont des mélanges méthanol/eau respectivement 10/90 (v/v) et 90/10 (v/v). Le gradient d'élution est le suivant : 8 min avec 80% de A, 4 min avec une descente linéaire de 80 à 5% de A, 4 min avec 5% de A et 1 min avec une augmentation linéaire de 5 à 80% de A. Le volume injecté est de 10 μl par échantillon. L'analyse se fait en mode négatif, la source d'électrospray est maintenue à une température de 400°C et un voltage de 4 200 V. La quantification du DON, D3G, 15-ADON et 4-ANIV est réalisée en utilisant une courbe standard de calibration allant de 10 à 1 000 ng/ml.

2. Extraction et analyse de métabolites secondaires

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Floriant Bellvert (Université de Lyon 1).

Les métabolites solubles sont extraits et séchés au Speed-Vac comme décrit par Simon et al. (2010). Les extraits secs sont repris dans 500 μl de méthanol/eau (1/1, v/v) et soumis à une analyse MS et MS/MS. 1 μl est injecté et analysé par UHPLC/DAD (Agilent technologies 1290) avec une colonne en phase inverse (Poroschell C18 2,7 μm , 150 mm \times 3 mm) maintenue à 40°C. Le flux d'élution de la colonne est de 700 $\mu\text{l}/\text{min}$ avec du solvant A (eau avec 0,4% d'acide acétique) et du solvant B (acétonitrile). Le gradient linéaire d'élution est le suivant : 100% A à 0 min, 100% A à 1,5 min, 66% A à 20 min, 100% B à 26 min, 100% B à 27 min, 100% A à 27,1 min et 100% A à 30 min. L'analyse des spectres UV est réalisée entre 200 et 600 nm. Le système d'UHPLC-DAD est couplé à un spectromètre de masse, un Quadrupole-time of flight (Q-TOF, Agilent technologies 6530) équipé d'une source d'électrospray en mode positif à un voltage de 3 000 V. L'enregistrement des spectres de masse se fait entre 80 et 2 000 m/z. Les composés identifiés par analyse de leurs spectres UV, MS et MS/MS ont été quantifiés sur les chromatogrammes d'absorbance obtenus à 280 nm en utilisant le logiciel MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies).

La quantification absolue de la sérotonine, du tryptophane et de la tryptamine a été réalisée par HPLC-DAD (Waters Corporation). Pour la sérotonine et le tryptophane, 50 μl des échantillons ont été injectés et soumis au gradient d'élution décrit par Hagemeyer et al. (2001) avec comme solvant A de l'eau avec 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) et comme solvant B de l'acétonitrile avec 0,1% de TFA. La détection des pics a été réalisée par DAD (200-600 nm) et l'analyse des chromatogrammes est faite à 280 nm par le logiciel Empower Pro Software (Waters Corporation). La quantification de la tryptamine a été réalisée par HPLC

couplée à un Multi λ Fluorescence Detector (Waters2475, Waters Corporation) à une longueur d'excitation de 280 nm et d'émission de 320 nm. Après extraction, les échantillons sont repris dans 90 % d'eau avec 0,05% de TFA (solvant A) et 10% d'acétonitrile (solvant B). 50 μ l sont injectés et élués selon le gradient suivant à 1 ml/min : 100% A à 0 min, 88% A à 6 min, 82% A à 10 min, 42% A à 30 min, 20% A à 30,5 min, 20% A à 36 min, 100% A à 36,5 min and 100% A à 42 min. Les chromatogrammes obtenus sont analysés avec le logiciel Empower Pro Software (Waters Corporation).

G. Protéine récombinante

1. Construction du vecteur d'expression de la protéine Bradi5g03300

L'ADNc du gène *Bradi5g03300* a été amplifié à l'aide des amorces spécifiques 5'-GGA-ATT-CCA-TAT-GGA-CAG-CAC-AGG-CAA-ATC-3' et 5'-CGG-GAT-CCC-GTT-ATT-AAC-TTG-ACG-AAT-ACTT-AGC-AG-3' puis cloné dans le vecteur pET-16B (**Annexe 1**) à l'aide des sites de restriction *NdeI* et *BamHI*. Ce vecteur a ensuite été transformé dans la souche d'*E. coli* BL21.

2. Production de la protéine recombinante Bradi5g03300

Une pré-culture bactérienne incubée à 37°C sous agitation (180 rpm) une nuit a été utilisée pour ensemercer au 250^{ième} un volume de 500 ml de Luria-Bertani (LB) liquide. Ces 500 ml sont incubés sous agitation (180 rpm) à 37°C. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,6 de l'IPTG (concentration finale 0,05 mM) est ajouté afin d'induire la production de la protéine. La culture bactérienne est alors placée en incubation sous agitation (180 rpm) à 18°C pendant une nuit.

3. Purification de la protéine Bradi5g03300

Après croissance, la culture bactérienne est centrifugée 20 min à 4000 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé puis le culot bactérien est resuspendu dans 6 ml de tampon de lyse (**Annexe 4**) et passé 3 fois à la presse de French. Les bactéries ainsi lysées sont centrifugées 30 min à 15 000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré est additionné d'1 ml de billes HIS-Select ® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich). Les billes sont préalablement lavées avec 40 ml de tampon de lavage (**Annexe 4**). Le volume correspondant aux bactéries lysées et aux billes de Nickel est complété à 14 ml dans un tube Falcon de 15 ml est placé sous agitation très douce (8 rpm) sur une roue à 4°C pendant 2 h. Après agitation, le tout est lavé avec 50 ml

de tampon de lyse puis les protéines sont éluées avec du tampon d'éluion (**Annexe 4**). Les fractions obtenues après éluion contenant la protéine (dans notre cas les fractions 2 à 6 parmi 10 fractions de 500 µl) sont regroupées et dessalées sur colonnes (PD-10 Desalting Columns ; GE Healthcare).

Les protéines purifiées obtenues sont alors dosées par la méthode de Bradford puis utilisées soit pour des tests d'activité enzymatique, dépôts sur gel de Coomassie ou pour la réalisation de western blot.

4. Vérification de la qualité de la protéine purifiée

4.1. Electrophorèse sur gel

La qualité de la protéine est dans un premier temps déterminée par migration sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Le gel se compose de 2 parties : la partie inférieure correspond au gel de séparation (acrylamide 12,5% (p/v) ; Tris-HCl 375 mM pH 6,8 ; SDS 0,1% (p/v)), la partie supérieure correspond au gel de concentration (acrylamide 6,6% (p/v) ; Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1% (p/v)). L'électrophorèse est réalisée sous voltage constant (130 V) dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM ; glycine 240 mM ; SDS 0,1% (p/v)) (Laemmli, 1970). Les protéines sont ensuite colorées ou transférées sur membrane de nitrocellulose.

La coloration des protéines est réalisée par incubation des gels pendant 1 h à température ambiante dans une solution de bleu de Coomassie (éthanol 35% (v/v) ; acide acétique 10% (v/v) ; Coomassie brillant blue G250 0,15% (p/v)). La décoloration du gel est effectuée par plusieurs lavages dans une solution de décoloration (éthanol 35% (v/v) ; acide acétique 10% (v/v)) jusqu'à l'obtention d'une décoloration optimale.

4.2. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Un système de «sandwich» est réalisé à partir d'éponges et de papier Whatman préalablement imbibés dans du tampon de transfert (Tris 26 mM ; glycine 190 mM ; méthanol 20% (v/v)). Le gel est placé au contact d'une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, 0,45 µm) imbibée de tampon de transfert entre deux fois deux feuilles de papier Whatman et deux éponges. Le transfert s'effectue dans une cuve remplie de tampon de transfert pendant 1 h 20 à ampérage constant (250 mA) en chambre froide (4°C). Pour contrôler la qualité du transfert et l'homogénéité des quantités de protéines chargées, la membrane est colorée 1 min au rouge ponceau (rouge ponceau 0,5% (p/v) ; acide acétique 1%

(v/v)), puis décolorée à l'eau distillée jusqu'à distinguer nettement les protéines. La membrane est décolorée par deux lavages dans du tampon T-TBS (Tween 20 0,1% (v/v) ; TBS : Tris-HCl 25 mM pH 7,4 ; KCl 2 mM ; NaCl 135 mM). Les sites libres de la membrane sont bloqués par incubation dans une solution de T-TBS contenant 5% de lait écrémé en poudre (T-TBS lait), pendant 1 h à température ambiante ou une nuit à 4°C.

4.3. Immunodétection des protéines

L'anticorps primaire dilué (1/1000° à 1/5000°) dans du T-TBS lait est incubé avec la membrane pendant 1 h à température ambiante ou une nuit à 4°C. La membrane est lavée par trois lavages de 10 min avec du T-TBS à température ambiante puis incubé pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué au 1/3000° dans du T-TBS lait. Après 3 lavages de 10 min avec du T-TBS, la membrane est alors placée en présence du substrat correspondant à l'enzyme couplée à l'anticorps secondaire. Pour l'anticorps secondaire couplé à la HRP, la révélation s'effectue grâce au système « ECL Western Blotting » (Amersham) selon les recommandations du fournisseur.

5. Test d'activité enzymatique UDP-glucosyltransférase

L'activité enzymatique est réalisée avec 1 µg de protéine à 30°C pendant 1 h puis stoppée par ajout de 50 µL de méthanol. Le volume réactionnel contient : 1 µg de protéine, le substrat à différentes concentrations (la scopolétine est solubilisée dans le diméthylsulfoxyde et le DON dans le méthanol), de l'UDP-glucose 1 mM, de l'UDP-glucose C¹⁴ 0,01 mM, du Tris HCl pH= 7 50 mM, de β-mercaptoéthanol 10 mM et de l'eau pour compléter à 50 µl.

6. Révélation de l'activité UDP-glucosyltransférase

30 µL de volume réactionnel après ajout de méthanol sont déposés sur des plaques de silice (DC-Fertigplatten SIL G-25 UV 254 ; Macherey-Nagel). Les plaques sont ensuite mises à migrer avec différents solvants en fonction du substrat utilisé (méthanol/chloroforme, 70/30, v/v pour la scopolétine ; 1-butanol/1-propanol/éthanol/eau, 2/3/3/1, v/v/v/v pour le DON).

Les plaques sont ensuite exposées contre un film révélateur pendant 48 h, puis le film est révélé à l'aide d'un phosphoimager (BIO-RAD).

La quantité de C¹⁴ intégré dans les zones correspondant à la formation de substrat-glucoside est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillations.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, H.K., Yoshizawa, T., and Shier, W.T.** (2013). Cytotoxicity and phytotoxicity of trichothecene mycotoxins produced by *Fusarium* spp. *Toxicon* **74**, 68-75.
- Abhilash, P.C., Jamil, S., and Singh, N.** (2009). Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnology Advances* **27**, 474-488.
- Acevedo-Garcia, J., Collins, N.C., Ahmadinejad, N., Ma, L., Houben, A., Bednarek, P., Benjdia, M., Freialdenhoven, A., Altmuller, J., Nurnberg, P., Reinhardt, R., Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R.** (2013). Fine mapping and chromosome walking towards the *Ror1* locus in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* **126**, 2969-2982.
- Achnine, L., Huhman, D.V., Farag, M.A., Sumner, L.W., Blount, J.W., and Dixon, R.A.** (2005). Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* **41**, 875-887.
- Adamski, N.M., Bush, M.S., Simmonds, J., Turner, A.S., Mugford, S.G., Jones, A., Findlay, K., Pedentchouk, N., von Wettstein-Knowles, P., and Uauy, C.** (2013). The inhibitor of wax 1 locus (*Iw1*) prevents formation of beta- and OH-beta-diketones in wheat cuticular waxes and maps to a sub-cM interval on chromosome arm 2BS. *Plant J* **74**, 989-1002.
- Al-Taweel, K., Fernando, W.G., and Brule-Babel, A.L.** (2014). Transcriptome profiling of wheat differentially expressed genes exposed to different chemotypes of *Fusarium graminearum*. *Theor Appl Genet* **127**, 1703-1718.
- Alassane-Kpembé, I., Kolf-Clauw, M., Gauthier, T., Abrami, R., Abiola, F.A., Oswald, I.P., and Puel, O.** (2013). New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol Appl Pharmacol* **272**, 191-198.
- Alexander, N.J., McCormick, S.P., and Hohn, T.M.** (1999). *TRI12*, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Mol Gen Genet* **261**, 977-984.
- Alexander, N.J., McCormick, S.P., Waalwijk, C., van der Lee, T., and Proctor, R.H.** (2011). The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. *Fungal Genet Biol* **48**, 485-495.
- Allwood, J.W., Ellis, D.I., Heald, J.K., Goodacre, R., and Mur, L.A.** (2006). Metabolomic approaches reveal that phosphatidic and phosphatidyl glycerol phospholipids are major discriminatory non-polar metabolites in responses by *Brachypodium distachyon* to challenge by *Magnaporthe grisea*. *Plant J* **46**, 351-368.
- Alves, S.C., Worland, B., Thole, V., Snape, J.W., Bevan, M.W., and Vain, P.** (2009). A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nat Protoc* **4**, 638-649.
- Atoui, A., El Khoury, A., Kallassy, M., and Lebrihi, A.** (2012). Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *Int J Food Microbiol* **154**, 59-65.
- Audenaert, K., Vanheule, A., Hofte, M., and Haesaert, G.** (2013). Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins (Basel)* **6**, 1-19.
- Awika, J.M.** (2011). **Major Cereal Grains Production and Use around the World.** In *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*, pp. 1-13.
- Ayliffe, M., Singh, D., Park, R., Moscou, M., and Pryor, T.** (2013). Infection of *Brachypodium distachyon* with selected grass rust pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 946-957.

- Babaeizad, V., Imani, J., Kogel, K.H., Eichmann, R., and Huckelhoven, R.** (2009). Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theor Appl Genet* **118**, 455-463.
- Baerson, S.R., Sanchez-Moreiras, A., Pedrol-Bonjoch, N., Schulz, M., Kagan, I.A., Agarwal, A.K., Reigosa, M.J., and Duke, S.O.** (2005). Detoxification and transcriptome response in Arabidopsis seedlings exposed to the allelochemical benzoxazolin-2(3H)-one. *J Biol Chem* **280**, 21867-21881.
- Bai, G.-H., and Shaner, G.** (1996). Variation in *Fusarium graminearum* and Cultivar Resistance to Wheat Scab. *Plant Disease* **80**, 975-979.
- Bai, G., and Shaner, G.** (2004). Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 135-161.
- Bai, G., Kolb, F.L., Shaner, G., and Domier, L.L.** (1999). Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* **89**, 343-348.
- Bai, G.H., Desjardins, A.E., and Plattner, R.D.** (2002). Deoxynivalenol-nonproducing fusarium graminearum causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* **153**, 91-98.
- Barbieri, M., Marcel, T.C., Niks, R.E., Francia, E., Pasquariello, M., Mazzamurro, V., Garvin, D.F., and Pecchioni, N.** (2012). QTLs for resistance to the false brome rust *Puccinia brachypodii* in the model grass *Brachypodium distachyon* L. *Genome* **55**, 152-163.
- Becher, R., Hettwer, U., Karlovsky, P., Deising, H.B., and Wirsal, S.G.** (2010). Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* **100**, 444-453.
- Bennett, J.W., and Klich, M.** (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* **16**, 497-516.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G., and Krska, R.** (2009). Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Anal Bioanal Chem* **395**, 1243-1252.
- Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., and Krska, R.** (2005). Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **53**, 3421-3425.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S.D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G., and Stroka, J.** (2013). Masked mycotoxins: a review. *Mol Nutr Food Res* **57**, 165-186.
- Bevan, M.W., Garvin, D.F., and Vogel, J.P.** (2010). *Brachypodium distachyon* genomics for sustainable food and fuel production. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 211-217.
- Beynon, E.R., Symons, Z.C., Jackson, R.G., Lorenz, A., Rylott, E.L., and Bruce, N.C.** (2009). The role of oxophytodienoate reductases in the detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene by Arabidopsis. *Plant Physiol* **151**, 253-261.
- Blumke, A., Sode, B., Ellinger, D., and Voigt, C.A.** (2014a). Reduced susceptibility to *Fusarium* head blight in *Brachypodium distachyon* through priming with the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Mol Plant Pathol*.
- Blumke, A., Falter, C., Herrfurth, C., Sode, B., Bode, R., Schafer, W., Feussner, I., and Voigt, C.A.** (2014b). Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat heat infection. *Plant Physiol*.
- Boddu, J., Cho, S., and Muehlbauer, G.J.** (2007). Transcriptome analysis of trichothecene-induced gene expression in barley. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1364-1375.

- Boddu, J., Cho, S., Kruger, W.M., and Muehlbauer, G.J.** (2006). Transcriptome analysis of the barley-Fusarium graminearum interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 407-417.
- Boenisch, M.J., and Schafer, W.** (2011). Fusarium graminearum forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biol* **11**, 110.
- 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 Mol Biol* **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.
- Bouvier d'Yvoire, M., Bouchabke-Coussa, O., Voorend, W., Antelme, S., Cezard, L., Legee, F., Lebris, P., Legay, S., Whitehead, C., McQueen-Mason, S.J., Gomez, L.D., Jouanin, L., Lapierre, C., and Sibout, R.** (2013). Disrupting the cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 gene (BdCAD1) leads to altered lignification and improved saccharification in Brachypodium distachyon. *Plant J* **73**, 496-508.
- Bowles, D., Lim, E.K., Poppenberger, B., and Vaistij, F.E.** (2006). Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 567-597.
- Bragg, J.N., Wu, J., Gordon, S.P., Guttman, M.E., Thilmony, R., Lazo, G.R., Gu, Y.Q., and Vogel, J.P.** (2012). Generation and characterization of the Western Regional Research Center Brachypodium T-DNA insertional mutant collection. *PLoS ONE* **7**, e41916.
- Brazier-Hicks, M., and Edwards, R.** (2005). Functional importance of the family 1 glucosyltransferase UGT72B1 in the metabolism of xenobiotics in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **42**, 556-566.
- Brazier-Hicks, M., Offen, W.A., Gershter, M.C., Revett, T.J., Lim, E.K., Bowles, D.J., Davies, G.J., and Edwards, R.** (2007). Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20238-20243.
- Brazier, M., Cole, D.J., and Edwards, R.** (2002). O-Glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (Alopecurus myosuroides). *Phytochemistry* **59**, 149-156.
- Brazier, M., Cole, D.J., and Edwards, R.** (2003). Partial purification and characterisation of a 2,4,5-trichlorophenol detoxifying O-glucosyltransferase from wheat. *Phytochemistry* **64**, 419-424.
- Breen, J., Wicker, T., Shatalina, M., Frenkel, Z., Bertin, I., Philippe, R., Spielmeier, W., Simkova, H., Safar, J., Cattonaro, F., Scalabrin, S., Magni, F., Vautrin, S., Berges, H., Paux, E., Fahima, T., Dolezel, J., Korol, A., Feuillet, C., and Keller, B.** (2013). A physical map of the short arm of wheat chromosome 1A. *PLoS ONE* **8**, e80272.
- Brkljacic, J., Grotewold, E., Scholl, R., Mockler, T., Garvin, D.F., Vain, P., Brutnell, T., Sibout, R., Bevan, M., Budak, H., Caicedo, A.L., Gao, C., Gu, Y., Hazen, S.P., Holt, B.F., 3rd, Hong, S.Y., Jordan, M., Manzaneda, A.J., Mitchell-Olds, T., Mochida, K., Mur, L.A., Park, C.M., Sedbrook, J., Watt, M., Zheng, S.J., and Vogel, J.P.** (2011). Brachypodium as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiol* **157**, 3-13.

- Brown, D.W., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H., and Desjardins, A.E.** (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* **32**, 121-133.
- Brown, D.W., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H., and Desjardins, A.E.** (2002). Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet Biol* **36**, 224-233.
- Brown, N.A., Urban, M., van de Meene, A.M., and Hammond-Kosack, K.E.** (2010). The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biol* **114**, 555-571.
- 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.
- Buerstmayr, M., Huber, K., Heckmann, J., Steiner, B., Nelson, J.C., and Buerstmayr, H.** (2012). Mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance and morphological and developmental traits in three backcross populations derived from *Triticum dicoccum* x *Triticum durum*. *Theor Appl Genet* **125**, 1751-1765.
- Burken, J.G.** (2004). Uptake and Metabolism of Organic Compounds: Green-Liver Model. In *Phytoremediation* (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 59-84.
- Bushnell, W.R., Perkins-Veazie, P., Russo, V.M., Collins, J., and Seeland, T.M.** (2010). Effects of deoxynivalenol on content of chloroplast pigments in barley leaf tissues. *Phytopathology* **100**, 33-41.
- Busman, M., Poling, S.M., and Maragos, C.M.** (2011). Observation of T-2 toxin and HT-2 toxin glucosides from *Fusarium sporotrichioides* by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Toxins (Basel)* **3**, 1554-1568.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B.** (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **326 (Pt 3)**, 929-939.
- Cao, H., Li, X., and Dong, X.** (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6531-6536.
- Caputi, L., Lim, E.K., and Bowles, D.J.** (2008). Discovery of new biocatalysts for the glycosylation of terpenoid scaffolds. *Chemistry* **14**, 6656-6662.
- Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S., and Martens, S.** (2012). A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *Plant J* **69**, 1030-1042.
- Catalan, P., Chalhoub, B., Chochois, V., Garvin, D.F., Hasterok, R., Manzaneda, A.J., Mur, L.A.J., Pecchioni, N., Rasmussen, S.r.K., Vogel, J.P., and Voxeur, A.** (2014). Update on the genomics and basic biology of *Brachypodium*: International *Brachypodium* Initiative (IBI), pp. 414-418.
- Chen, X., Steed, A., Travella, S., Keller, B., and Nicholson, P.** (2009). *Fusarium graminearum* exploits ethylene signalling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plants. *New Phytol* **182**, 975-983.
- Chen, Y., and Zhou, M.G.** (2009). Characterization of *Fusarium graminearum* isolates resistant to both carbendazim and a new fungicide JS399-19. *Phytopathology* **99**, 441-446.
- Chochois, V., Vogel, J.P., and Watt, M.** (2012). Application of *Brachypodium* to the genetic improvement of wheat roots. *J Exp Bot* **63**, 3467-3474.

- Christensen, U., Alonso-Simon, A., Scheller, H.V., Willats, W.G., and Harholt, J.** (2010). Characterization of the primary cell walls of seedlings of *Brachypodium distachyon* - a potential model plant for temperate grasses. *Phytochemistry* **71**, 62-69.
- Chu, C., Niu, Z., Zhong, S., Chao, S., Friesen, T.L., Halley, S., Elias, E.M., Dong, Y., Faris, J.D., and Xu, S.S.** (2011). Identification and molecular mapping of two QTLs with major effects for resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Theor Appl Genet* **123**, 1107-1119.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., and Ausubel, F.M.** (2009). Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* **323**, 95-101.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., and Davies, E.** (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* **2**, 144-151.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., and Henrissat, B.** (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* **328**, 307-317.
- Cui, Y., Lee, M.Y., Huo, N., Bragg, J., Yan, L., Yuan, C., Li, C., Holditch, S.J., Xie, J., Luo, M.C., Li, D., Yu, J., Martin, J., Schackwitz, W., Gu, Y.Q., Vogel, J.P., Jackson, A.O., Liu, Z., and Garvin, D.F.** (2012). Fine mapping of the *Bsr1* barley stripe mosaic virus resistance gene in the model grass *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* **7**, e38333.
- Cuthbert, P.A., Somers, D.J., and Brule-Babel, A.** (2007). Mapping of *Fhb2* on chromosome 6BS: a gene controlling *Fusarium* head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* **114**, 429-437.
- Cuzick, A., Urban, M., and Hammond-Kosack, K.** (2008). *Fusarium graminearum* gene deletion mutants *map1* and *tri5* reveal similarities and differences in the pathogenicity requirements to cause disease on *Arabidopsis* and wheat floral tissue. *New Phytol* **177**, 990-1000.
- D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., and Macdonald, A.M.C.** (1999). *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* **80**, 183-205.
- Dalmis, M., Antelme, S., Ho-Yue-Kuang, S., Wang, Y., Darracq, O., d'Yvoire, M.B., Cezard, L., Legee, F., Blondet, E., Oria, N., Troadec, C., Brunaud, V., Jouanin, L., Hofte, H., Bendahmane, A., Lapierre, C., and Sibout, R.** (2013). A TILLING Platform for Functional Genomics in *Brachypodium distachyon*. *PLoS ONE* **8**, e65503.
- de la Pena, R.C., Smith, K.P., Capettini, F., Muehlbauer, G.J., Gallo-Meagher, M., Dill-Macky, R., Somers, D.A., and Rasmusson, D.C.** (1999). Quantitative trait loci associated with resistance to *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley. *Theor Appl Genet* **99**, 561-569.
- Deguercy, X.** (2010). Un modèle émergent d'interaction plante/champignon phytopathogène : *Brachypodium distachyon* / *Fusarium graminearum*.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M., and McCormick, S.P.** (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol Rev* **57**, 595-604.
- Desjardins, A.E., McCormick, S.P., and Appell, M.** (2007). Structure-activity relationships of trichothecene toxins in an *Arabidopsis thaliana* leaf assay. *J Agric Food Chem* **55**, 6487-6492.
- Desmond, O.J., Manners, J.M., Stephens, A.E., Maclean, D.J., Schenk, P.M., Gardiner, D.M., Munn, A.L., and Kazan, K.** (2008). The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol Plant Pathol* **9**, 435-445.

- Diamond, M., Reape, T.J., Rocha, O., Doyle, S.M., Kacprzyk, J., Doohan, F.M., and McCabe, P.F.** (2013). The fusarium mycotoxin deoxynivalenol can inhibit plant apoptosis-like programmed cell death. *PLoS ONE* **8**, e69542.
- Dick, R., Rattei, T., Haslbeck, M., Schwab, W., Gierl, A., and Frey, M.** (2012). Comparative analysis of benzoxazinoid biosynthesis in monocots and dicots: independent recruitment of stabilization and activation functions. *Plant Cell* **24**, 915-928.
- Dill-Macky, R., and Jones, R.K.** (2000). The Effect of Previous Crop Residues and Tillage on Fusarium Head Blight of Wheat. *Plant Disease* **84**, 71-76.
- Dixon, D.P., Cummins, L., Cole, D.J., and Edwards, R.** (1998). Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 258-266.
- Draper, J., Mur, L.A., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G.C., Bablak, P., Hasterok, R., and Routledge, A.P.** (2001). *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* **127**, 1539-1555.
- Du Fall, L.A., and Solomon, P.S.** (2013). The necrotrophic effector SnToxA induces the synthesis of a novel phytoalexin in wheat. *New Phytol* **200**, 185-200.
- Dyer, R.B., Plattner, R.D., Kendra, D.F., and Brown, D.W.** (2005). *Fusarium graminearum* TRI14 is required for high virulence and DON production on wheat but not for DON synthesis in vitro. *J Agric Food Chem* **53**, 9281-9287.
- Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K.H., and Huckelhoven, R.** (2004). The barley apoptosis suppressor homologue BAX inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 484-490.
- Eichmann, R., Bischof, M., Weis, C., Shaw, J., Lacomme, C., Schweizer, P., Duchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., and Huckelhoven, R.** (2010). BAX INHIBITOR-1 is required for full susceptibility of barley to powdery mildew. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1217-1227.
- Ekman, D.R., Lorenz, W.W., Przybyla, A.E., Wolfe, N.L., and Dean, J.F.** (2003). SAGE analysis of transcriptome responses in *Arabidopsis* roots exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *Plant Physiol* **133**, 1397-1406.
- Ellinger, D., Sode, B., Falter, C., and Voigt, C.A.** (2014). Resistance of callose synthase activity to free fatty acid inhibition as an indicator of *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Plant Signal Behav* **9**.
- Engelhardt, G., Zill, G., Wohner, B., and Wallnöfer, P.R.** (1988). Transformation of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften* **75**, 309-310.
- FAO.** (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/home/en/>.
- Figueroa, M., Alderman, S., Garvin, D.F., and Pfender, W.F.** (2013). Infection of *Brachypodium distachyon* by formae speciales of *Puccinia graminis*: early infection events and host-pathogen incompatibility. *PLoS ONE* **8**, e56857.
- Foroud, N.A., and Eudes, F.** (2009). Trichothecenes in cereal grains. *Int J Mol Sci* **10**, 147-173.
- Foroud, N.A., Ouellet, T., Laroche, A., Oosterveen, B., Jordan, M.C., Ellis, B.E., and Eudes, F.** (2012). Differential transcriptome analyses of three wheat genotypes reveal different host response pathways associated with *Fusarium* head blight and trichothecene resistance. *Plant Pathology* **61**, 296-314.
- Frey, M., Schullehner, K., Dick, R., Fiesselmann, A., and Gierl, A.** (2009). Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry* **70**, 1645-1651.

- Frey, M., Huber, K., Park, W.J., Sicker, D., Lindberg, P., Meeley, R.B., Simmons, C.R., Yalpani, N., and Gierl, A. (2003). A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase is integrated in DIMBOA-biosynthesis. *Phytochemistry* **62**, 371-376.
- Frey, M., Chomet, P., Glawischnig, E., Stettner, C., Grun, S., Winklmaier, A., Eisenreich, W., Bacher, A., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Simcox, K., and Gierl, A. (1997). Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* **277**, 696-699.
- Fried, H.M., and Warner, J.R. (1981). Cloning of yeast gene for trichodermin resistance and ribosomal protein L3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 238-242.
- Fukuchi-Mizutani, M., Okuhara, H., Fukui, Y., Nakao, M., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Kusumi, T., Hase, T., and Tanaka, Y. (2003). Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose:anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. *Plant Physiol* **132**, 1652-1663.
- Gachon, C.M., Langlois-Meurinne, M., and Saindrenan, P. (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci* **10**, 542-549.
- Gandia-Herrero, F., Lorenz, A., Larson, T., Graham, I.A., Bowles, D.J., Rylott, E.L., and Bruce, N.C. (2008). Detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene in Arabidopsis: discovery of bifunctional O- and C-glucosyltransferases. *Plant J* **56**, 963-974.
- 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.
- Gardiner, S.A., Boddu, J., Berthiller, F., Hametner, C., Stupar, R.M., Adam, G., and Muehlbauer, G.J. (2010). Transcriptome analysis of the barley-deoxynivalenol interaction: evidence for a role of glutathione in deoxynivalenol detoxification. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 962-976.
- Garvin, D.F., Gu, Y.-Q., Hasterok, R., Hazen, S.P., Jenkins, G., Mockler, T.C., Mur, L.A.J., and Vogel, J.P. (2008). Development of Genetic and Genomic Research Resources for *Brachypodium distachyon*, a New Model System for Grass Crop Research. *Crop Sci.* **48**, S-69-S-84.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.
- Goswami, R.S., and Kistler, H.C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol* **5**, 515-525.
- Goswami, R.S., and Kistler, H.C. (2005). Pathogenicity and In Planta Mycotoxin Accumulation Among Members of the *Fusarium graminearum* Species Complex on Wheat and Rice. *Phytopathology* **95**, 1397-1404.
- Grubb, C.D., Zipp, B.J., Ludwig-Muller, J., Masuno, M.N., Molinski, T.F., and Abel, S. (2004). Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J* **40**, 893-908.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., Duggavathi, R., Fox, S., and Somers, D.J. (2012). Integrated metabolite-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* **7**, e40695.
- Hagemeyer, J., Schneider, B., Oldham, N.J., and Hahlbrock, K. (2001). Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in Arabidopsis thaliana leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 753-758.

- Halkier, B.A., and Gershenzon, J.** (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 303-333.
- Hallen-Adams, H.E., Wenner, N., Kuldau, G.A., and Trail, F.** (2011). Deoxynivalenol biosynthesis-related gene expression during wheat kernel colonization by *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* **101**, 1091-1096.
- Hansen, K.S., Kristensen, C., Tattersall, D.B., Jones, P.R., Olsen, C.E., Bak, S., and Moller, B.L.** (2003). The in vitro substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* **64**, 143-151.
- Hasterok, R., Marasek, A., Donnison, I.S., Armstead, I., Thomas, A., King, I.P., Wolny, E., Idziak, D., Draper, J., and Jenkins, G.** (2006). Alignment of the Genomes of Brachypodium distachyon and Temperate Cereals and Grasses Using Bacterial Artificial Chromosome Landing With Fluorescence in Situ Hybridization. *Genetics* **173**, 349-362.
- He, J., Yang, R., Zhou, T., Tsao, R., Young, J.C., Zhu, H., Li, X.Z., and Boland, G.J.** (2007). Purification of deoxynivalenol from *Fusarium graminearum* rice culture and mouldy corn by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* **1151**, 187-192.
- Himmelbach, A., Zierold, U., Hensel, G., Riechen, J., Douchkov, D., Schweizer, P., and Kumlehn, J.** (2007). A set of modular binary vectors for transformation of cereals. *Plant Physiol* **145**, 1192-1200.
- Höfer, R., Boachon, B., Renault, H., Gavira, C., Miesch, L., Iglesias, J., Ginglinger, J.F., Allouche, L., Miesch, M., Grec, S., Larbat, R., and Werck, D.** (2014). Dual function of the CYP76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant Physiol*.
- Hohn, T.M., Krishna, R., and Proctor, R.H.** (1999). Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genet Biol* **26**, 224-235.
- Hueza, I.M., Raspantini, P.C., Raspantini, L.E., Latorre, A.O., and Gorniak, S.L.** (2014). Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins (Basel)* **6**, 1080-1095.
- IGC.** (2012). International Grains Council. <http://www.igc.int/fr/>.
- Ilgen, P., Haderer, B., Maier, F.J., and Schafer, W.** (2009). Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 899-908.
- International Brachypodium Initiative.** (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463**, 763-768.
- Jackson, R.G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G., and Bowles, D.J.** (2002). Over-expression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J* **32**, 573-583.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schafer, W., Kogel, K.H., Felk, A., and Maier, F.J.** (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16892-16897.
- Jia, H., Cho, S., and Muehlbauer, G.J.** (2009). Transcriptome analysis of a wheat near-isogenic line pair carrying *Fusarium* head blight-resistant and -susceptible alleles. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 1366-1378.
- Jia, J., Zhao, S., Kong, X., Li, Y., Zhao, G., He, W., Appels, R., Pfeifer, M., Tao, Y., Zhang, X., Jing, R., Zhang, C., Ma, Y., Gao, L., Gao, C., Spannagl, M., Mayer, K.F., Li, D., Pan, S., Zheng, F., Hu, Q., Xia, X., Li, J., Liang, Q., Chen, J.,**

- Wicker, T., Gou, C., Kuang, H., He, G., Luo, Y., Keller, B., Xia, Q., Lu, P., Wang, J., Zou, H., Zhang, R., Xu, J., Gao, J., Middleton, C., Quan, Z., Liu, G., Yang, H., Liu, X., He, Z., and Mao, L. (2013). *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* **496**, 91-95.
- Jiao, F., Kawakami, A., and Nakajima, T. (2008). Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett* **285**, 212-219.
- Jin, S.-H., Ma, X.-M., Han, P., Wang, B., Sun, Y.-G., Zhang, G.-Z., Li, Y.-J., and Hou, B.-K. (2013). UGT74D1 Is a Novel Auxin Glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **8**, e61705.
- Jonczyk, R., Schmidt, H., Osterrieder, A., Fiesselmann, A., Schullehner, K., Haslbeck, M., Sicker, D., Hofmann, D., Yalpani, N., Simmons, C., Frey, M., and Gierl, A. (2008). Elucidation of the final reactions of DIMBOA-glucoside biosynthesis in maize: characterization of Bx6 and Bx7. *Plant Physiol* **146**, 1053-1063.
- Jones, R.K. (2000). Assessments of Fusarium Head Blight of Wheat and Barley in Response to Fungicide Treatment. *Plant Disease* **84**, 1021-1030.
- Ju, C., Yoon, G.M., Shemansky, J.M., Lin, D.Y., Ying, Z.I., Chang, J., Garrett, W.M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tucker, M.L., Cooper, B., Kieber, J.J., and Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 19486-19491.
- 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. *Mol Plant Pathol* **13**, 399-413.
- Keegstra, K., and Raikhel, N. (2001). Plant glycosyltransferases. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 219-224.
- Keller, N.P., Turner, G., and Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**, 937-947.
- Kellner, R., Bhattacharyya, A., Poppe, S., Hsu, T.Y., Brem, R.B., and Stukenbrock, E.H. (2014). Expression Profiling of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* Reveals Genomic Patterns of Transcription and Host-Specific Regulatory Programs. *Genome Biol Evol* **6**, 1353-1365.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., and Fujimura, M. (2007). Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2105-2123.
- Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T.J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., and Yamaguchi, I. (2003). The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. *FEBS Lett* **539**, 105-110.
- Kluger, B., Bueschl, C., Lemmens, M., Berthiller, F., Haubl, G., Jaunecker, G., Adam, G., Krska, R., and Schuhmacher, R. (2013). Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Anal Bioanal Chem* **405**, 5031-5036.
- Kovalsky Paris, M.P., Schweiger, W., Hametner, C., Stuckler, R., Muehlbauer, G.J., Varga, E., Krska, R., Berthiller, F., and Adam, G. (2014). Zearalenone-16-O-glucoside: a new masked mycotoxin. *J Agric Food Chem* **62**, 1181-1189.
- Kristensen, C., Morant, M., Olsen, C.E., Ekstrom, C.T., Galbraith, D.W., Moller, B.L., and Bak, S. (2005). Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1779-1784.

- Kulik, T., Lojko, M., Jestoi, M., and Perkowski, J.** (2012). Sublethal concentrations of azoles induce tri transcript levels and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol Lett* **335**, 58-67.
- Kumaraswamy, G.K., Kushalappa, A.C., Choo, T.M., Dion, Y., and Rioux, S.** (2011a). Mass spectrometry based metabolomics to identify potential biomarkers for resistance in barley against fusarium head blight (*Fusarium graminearum*). *J Chem Ecol* **37**, 846-856.
- Kumaraswamy, G.K., Bollina, V., Kushalappa, A., Choo, T., Dion, Y., Rioux, S., Mamer, O., and Faubert, D.** (2011b). Metabolomics technology to phenotype resistance in barley against *Gibberella zeae*. *European Journal of Plant Pathology* **130**, 29-43.
- Kushalappa, A.C., and Gunnaiah, R.** (2013). Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. *Trends Plant Sci* **18**, 522-531.
- Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., and Ramsden, J.J.** (2006). *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants*. (Springer Berlin Heidelberg).
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., and Withers, S.G.** (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* **77**, 521-555.
- Lee, J., Chang, I.Y., Kim, H., Yun, S.H., Leslie, J.F., and Lee, Y.W.** (2009). Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Appl Environ Microbiol* **75**, 3289-3295.
- Lee, T., Han, Y.K., Kim, K.H., Yun, S.H., and Lee, Y.W.** (2002). Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2148-2154.
- Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., Adam, G., Buerstmayr, H., Mesterhazy, A., Krska, R., and Ruckebauer, P.** (2005). The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1318-1324.
- Li, T., Bai, G., Wu, S., and Gu, S.** (2011). Quantitative trait loci for resistance to fusarium head blight in a Chinese wheat landrace Haiyanzhong. *Theor Appl Genet* **122**, 1497-1502.
- Li, Y., Pennington, B.O., and Hua, J.** (2009). Multiple R-like genes are negatively regulated by BON1 and BON3 in arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 840-848.
- Li, Y., Li, P., Wang, Y., Dong, R., Yu, H., and Hou, B.** (2014). Genome-wide identification and phylogenetic analysis of Family-1 UDP glycosyltransferases in maize (*Zea mays*). *Planta* **239**, 1265-1279.
- Lim, E.K., Ashford, D.A., Hou, B., Jackson, R.G., and Bowles, D.J.** (2004). Arabidopsis glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides. *Biotechnol Bioeng* **87**, 623-631.
- Lim, E.K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D.A., and Bowles, D.J.** (2001). Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in Arabidopsis. *J Biol Chem* **276**, 4344-4349.
- Lim, E.K., Doucet, C.J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S.P., Ross, J., and Bowles, D.J.** (2002). The activity of Arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J Biol Chem* **277**, 586-592.
- Lim, E.K., Baldauf, S., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S.P., Jackson, R.G., Taguchi, G., Ross, J., and Bowles, D.J.** (2003). Evolution of substrate recognition

- across a multigene family of glycosyltransferases in Arabidopsis. *Glycobiology* **13**, 139-145.
- Ling, H.Q., Zhao, S., Liu, D., Wang, J., Sun, H., Zhang, C., Fan, H., Li, D., Dong, L., Tao, Y., Gao, C., Wu, H., Li, Y., Cui, Y., Guo, X., Zheng, S., Wang, B., Yu, K., Liang, Q., Yang, W., Lou, X., Chen, J., Feng, M., Jian, J., Zhang, X., Luo, G., Jiang, Y., Liu, J., Wang, Z., Sha, Y., Zhang, B., Tang, D., Shen, Q., Xue, P., Zou, S., Wang, X., Liu, X., Wang, F., Yang, Y., An, X., Dong, Z., Zhang, K., Luo, M.C., Dvorak, J., Tong, Y., Yang, H., Li, Z., Wang, D., and Zhang, A.** (2013). Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature* **496**, 87-90.
- Liu, S., Zhang, X., Pumphrey, M.O., Stack, R.W., Gill, B.S., and Anderson, J.A.** (2006). Complex microcolinearity among wheat, rice, and barley revealed by fine mapping of the genomic region harboring a major QTL for resistance to Fusarium head blight in wheat. *Funct Integr Genomics* **6**, 83-89.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., and Bottalico, A.** (2002). Toxigenic Fusarium Species and Mycotoxins Associated with Maize Ear Rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 597-609.
- Loutre, C., Dixon, D.P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D.J., and Edwards, R.** (2003). Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. *Plant J* **34**, 485-493.
- Lulin, M., Yi, S., Aizhong, C., Zengjun, Q., Liping, X., Peidu, C., Dajun, L., and Xiu, E.W.** (2010). Molecular cloning and characterization of an up-regulated UDP-glucosyltransferase gene induced by DON from *Triticum aestivum* L. cv. Wangshuibai. *Mol Biol Rep* **37**, 785-795.
- Luo, M.C., Gu, Y.Q., You, F.M., Deal, K.R., Ma, Y., Hu, Y., Huo, N., Wang, Y., Wang, J., Chen, S., Jorgensen, C.M., Zhang, Y., McGuire, P.E., Pasternak, S., Stein, J.C., Ware, D., Kramer, M., McCombie, W.R., Kianian, S.F., Martis, M.M., Mayer, K.F., Sehgal, S.K., Li, W., Gill, B.S., Bevan, M.W., Simkova, H., Dolezel, J., Weining, S., Lazo, G.R., Anderson, O.D., and Dvorak, J.** (2013). A 4-gigabase physical map unlocks the structure and evolution of the complex genome of *Aegilops tauschii*, the wheat D-genome progenitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7940-7945.
- Luo, N., Liu, J., Yu, X., and Jiang, Y.** (2011). Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiol Plant* **141**, 19-29.
- Lysoe, E., Seong, K.Y., and Kistler, H.C.** (2011). The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 995-1000.
- Ma, Z., Steffenson, B.J., Prom, L.K., and Lapitan, N.L.** (2000). Mapping of quantitative trait Loci for fusarium head blight resistance in barley. *Phytopathology* **90**, 1079-1088.
- Maier, F.J., Miedaner, T., Haderer, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H., and SchÄFer, W.** (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* **7**, 449-461.
- Mandadi, K.K., and Scholthof, K.B.** (2012). Characterization of a viral synergism in the monocot *Brachypodium distachyon* reveals distinctly altered host molecular processes associated with disease. *Plant Physiol* **160**, 1432-1452.
- Marin, P., Jurado, M., Magan, N., Vazquez, C., and Gonzalez-Jaen, M.T.** (2010). Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using real

- time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. *Int J Food Microbiol* **140**, 169-174.
- Martis, M.M., Zhou, R., Haseneyer, G., Schmutzer, T., Vrana, J., Kubalaková, M., König, S., Kugler, K.G., Scholz, U., Hackauf, B., Korzun, V., Schon, C.C., Dolezel, J., Bauer, E., Mayer, K.F., and Stein, N.** (2013). Reticulate evolution of the rye genome. *Plant Cell* **25**, 3685-3698.
- Masuda, D., Ishida, M., Yamaguchi, K., Yamaguchi, I., Kimura, M., and Nishiuchi, T.** (2007). Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **58**, 1617-1626.
- McCormick, S.P.** (2009). Phytotoxicity of trichothecenes. In *Mycotoxin Prevention and Control in Agriculture* (American Chemical Society), pp. 143-155.
- McCormick, S.P., Harris, L.J., Alexander, N.J., Ouellet, T., Sapano, A., Allard, S., and Desjardins, A.E.** (2004). Tri1 in *Fusarium graminearum* encodes a P450 oxygenase. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2044-2051.
- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., and Alexander, N.J.** (2011). Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins (Basel)* **3**, 802-814.
- McMullen, M., Jones, R., and Gallenberg, D.** (1997). Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease* **81**, 1340-1348.
- Merhej, J., Boutigny, A.L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., and Barreau, C.** (2010). Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **27**, 710-717.
- Mesfin, A., Smith, K.P., Dill-Macky, R., Evans, C.K., Waugh, R., Gustus, C.D., and Muehlbauer, G.J.** (2003). Quantitative Trait Loci for *Fusarium* Head Blight Resistance in Barley Detected in a Two-Rowed by Six-Rowed Population. *Crop Sci.* **43**, 307-318.
- Messner, B., Thulke, O., and Schaffner, A.R.** (2003). *Arabidopsis* glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* **217**, 138-146.
- Metzler, M., Pfeiffer, E., and Hildebrand, A.** (2010). Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal* **3**, 385-401.
- Middleton, C.P., Senerchia, N., Stein, N., Akhunov, E.D., Keller, B., Wicker, T., and Kilian, B.** (2014). Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the Triticeae tribe. *PLoS ONE* **9**, e85761.
- Miedaner, T., Moldovan, M., and Ittu, M.** (2003). Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to *Fusarium* head blight in a multi-environment wheat trial. *Phytopathology* **93**, 1068-1072.
- Miedaner, T., Wilde, F., Steiner, B., Buerstmayr, H., Korzun, V., and Ebmeyer, E.** (2006). Stacking quantitative trait loci (QTL) for *Fusarium* head blight resistance from non-adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. *Theor Appl Genet* **112**, 562-569.
- Milkowski, C., Baumert, A., and Strack, D.** (2000a). Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. *Planta* **211**, 883-886.
- Milkowski, C., Baumert, A., and Strack, D.** (2000b). Identification of four *Arabidopsis* genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. *FEBS Lett* **486**, 183-184.
- Milkowski, C., Baumert, A., Schmidt, D., Nehlin, L., and Strack, D.** (2004). Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes,

- properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J* **38**, 80-92.
- Mohnen, D.** (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 266-277.
- Molnar, I., Simkova, H., Leverington-Waite, M., Goram, R., Cseh, A., Vrana, J., Farkas, A., Dolezel, J., Molnar-Lang, M., and Griffiths, S.** (2013). Syntenic relationships between the U and M genomes of *Aegilops*, wheat and the model species *Brachypodium* and rice as revealed by COS markers. *PLoS ONE* **8**, e70844.
- Morant, A.V., Jorgensen, K., Jorgensen, C., Paquette, S.M., Sanchez-Perez, R., Moller, B.L., and Bak, S.** (2008). beta-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* **69**, 1795-1813.
- Mudge, A.M., Dill-Macky, R., Dong, Y., Gardiner, D.M., White, R.G., and Manners, J.M.** (2006). A role for the mycotoxin deoxynivalenol in stem colonisation during crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **69**, 73-85.
- Mur, L.A., Allainguillaume, J., Catalan, P., Hasterok, R., Jenkins, G., Lesniewska, K., Thomas, I., and Vogel, J.** (2011). Exploiting the *Brachypodium* Tool Box in cereal and grass research. *New Phytol* **191**, 334-347.
- Nakagame, S., Chandra, R.P., Kadla, J.F., and Saddler, J.N.** (2011). The isolation, characterization and effect of lignin isolated from steam pretreated Douglas-fir on the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresour Technol* **102**, 4507-4517.
- Nakagawa, H., Sakamoto, S., Sago, Y., and Nagashima, H.** (2013). Detection of type A trichothecene di-glucosides produced in corn by high-resolution liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry. *Toxins (Basel)* **5**, 590-604.
- Nakagawa, H., Ohmichi, K., Sakamoto, S., Sago, Y., Kushiro, M., Nagashima, H., Yoshida, M., and Nakajima, T.** (2011). Detection of a new *Fusarium* masked mycotoxin in wheat grain by high-resolution LC-Orbitrap MS. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **28**, 1447-1456.
- Nasmith, C.G., Walkowiak, S., Wang, L., Leung, W.W., Gong, Y., Johnston, A., Harris, L.J., Guttman, D.S., and Subramaniam, R.** (2011). Tri6 is a global transcription regulator in the phytopathogen *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog* **7**, e1002266.
- Nganje, W., Kaitibie, S., Wilson, W., FL., L., and Bangsund, D.** (2004). Economic Impacts of *Fusarium* Head Blight in Wheat and Barley: 1993-2001. *Agribusiness and Applied Economics Report* **538**.
- Nielsen, K.A., Tattersall, D.B., Jones, P.R., and Moller, B.L.** (2008). Metabolon formation in dhurrin biosynthesis. *Phytochemistry* **69**, 88-98.
- Ochiai, N., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., and Kimura, M.** (2007). Genetically engineered *Fusarium* as a tool to evaluate the effects of environmental factors on initiation of trichothecene biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **275**, 53-61.
- Opanowicz, M., Vain, P., Draper, J., Parker, D., and Doonan, J.H.** (2008). *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends Plant Sci* **13**, 172-177.
- Osmani, S.A., Bak, S., and Moller, B.L.** (2009). Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* **70**, 325-347.
- Osmani, S.A., Bak, S., Imberty, A., Olsen, C.E., and Moller, B.L.** (2008). Catalytic key amino acids and UDP-sugar donor specificity of a plant glucuronosyltransferase, UGT94B1: molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses. *Plant Physiol* **148**, 1295-1308.
- Owatworakit, A., Townsend, B., Louveau, T., Jenner, H., Rejzek, M., Hughes, R.K., Saalbach, G., Qi, X., Bakht, S., Roy, A.D., Mugford, S.T., Goss, R.J., Field, R.A.,**

- and Osbourn, A.** (2013). Glycosyltransferases from oat (*Avena*) implicated in the acylation of avenacins. *J Biol Chem* **288**, 3696-3704.
- Pacurar, D.I., Thordal-Christensen, H., Nielsen, K.K., and Lenk, I.** (2008). A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. *Transgenic Res* **17**, 965-975.
- Pang, S., Duan, L., Liu, Z., Song, X., Li, X., and Wang, C.** (2012). Co-induction of a glutathione-S-transferase, a glutathione transporter and an ABC transporter in maize by xenobiotics. *PLoS ONE* **7**, e40712.
- Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E.** (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12923-12928.
- Paquette, S., Moller, B.L., and Bak, S.** (2003). On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* **62**, 399-413.
- Parker, D., Beckmann, M., Enot, D.P., Overy, D.P., Rios, Z.C., Gilbert, M., Talbot, N., and Draper, J.** (2008). Rice blast infection of *Brachypodium distachyon* as a model system to study dynamic host/pathogen interactions. *Nat Protoc* **3**, 435-445.
- Parker, D., Beckmann, M., Zubair, H., Enot, D.P., Caracuel-Rios, Z., Overy, D.P., Snowden, S., Talbot, N.J., and Draper, J.** (2009). Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *Plant J* **59**, 723-737.
- Paulitz.** (1996). Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. *Plant disease* **80**, 674-678.
- Peraldi, A., Beccari, G., Steed, A., and Nicholson, P.** (2011). *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study *Fusarium* head blight and other *Fusarium* diseases of wheat. *BMC Plant Biology* **11**, 100.
- Peraldi, A., Griffe, L.L., Burt, C., McGrann, G.R.D., and Nicholson, P.** (2014). *Brachypodium distachyon* exhibits compatible interactions with *Oculimacula* spp. and *Ramularia collo-cygni*, providing the first pathosystem model to study eyespot and ramularia leaf spot diseases. *Plant Pathology* **63**, 554-562.
- Pestka, J.J., Zhou, H.R., Moon, Y., and Chung, Y.J.** (2004). Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol Lett* **153**, 61-73.
- Pichersky, E., and Gang, D.R.** (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* **5**, 439-445.
- Pirgozliev, S., Edwards, S., Hare, M., and Jenkinson, P.** (2003). Strategies for the Control of *Fusarium* Head Blight in Cereals. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 731-742.
- 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 Lett* **581**, 443-447.
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glossl, J., Luschnig, C., and Adam, G.** (2003). Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **278**, 47905-47914.
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Bachmann, H., Lucyshyn, D., Peterbauer, C., Mitterbauer, R., Schuhmacher, R., Krska, R., Glossl, J., and Adam, G.** (2006). Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 4404-4410.

- Priest, D.M., Ambrose, S.J., Vaistij, F.E., Elias, L., Higgins, G.S., Ross, A.R., Abrams, S.R., and Bowles, D.J.** (2006). Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **46**, 492-502.
- Priest, H.D., Fox, S.E., Rowley, E.R., Murray, J.R., Michael, T.P., and Mockler, T.C.** (2014). Analysis of global gene expression in *Brachypodium distachyon* reveals extensive network plasticity in response to abiotic stress. *PLoS ONE* **9**, e87499.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M., and McCormick, S.P.** (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 593-601.
- Proctor, R.H., McCormick, S.P., Alexander, N.J., and Desjardins, A.E.** (2009). Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium*. *Mol Microbiol* **74**, 1128-1142.
- Rep, M., and Kistler, H.C.** (2010). The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 420-426.
- Rocha, O., Ansari, K., and Doohan, F.M.** (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam* **22**, 369-378.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E., and Bowles, D.J.** (2001). Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3004.
- Rudd, J.C., Horsley, R.D., McKendry, A.L., and Elias, E.M.** (2001). Host Plant Resistance Genes for *Fusarium* Head Blight. *Crop Sci.* **41**, 620-627.
- Ruhland, M., Engelhardt, G., and Wallnofer, P.R.** (1996). Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. 2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. *Mycopathologia* **134**, 97-102.
- Ryu, J.Y., Hong, S.Y., Jo, S.H., Woo, J.C., Lee, S., and Park, C.M.** (2014). Molecular and functional characterization of cold-responsive C-repeat binding factors from *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol* **14**, 15.
- Sado, P.E., Tessier, D., Vasseur, M., Elmorjani, K., Guillon, F., and Saulnier, L.** (2009). Integrating genes and phenotype: a wheat-*Arabidopsis*-rice glycosyltransferase database for candidate gene analyses. *Funct Integr Genomics* **9**, 43-58.
- Sandoya, G.V., and Buanafina, M.M.d.O.** (2014). Differential responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to insect and fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **85**, 53-64.
- Scheible, W.R., and Pauly, M.** (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 285-295.
- Schneebeli, K., Mathesius, U., and Watt, M.** (2014). *Brachypodium distachyon* is a pathosystem model for the study of the wheat disease rhizoctonia root rot. *Plant Pathology*, DOI: 10.1111/ppa.12227.
- Schroeder, H.W., and Christensen, J.J.** (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* **42**.
- Schweiger, W., Boddu, J., Shin, S., Poppenberger, B., Berthiller, F., Lemmens, M., Muehlbauer, G.J., and Adam, G.** (2010). Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 977-986.
- Schweiger, W., Steiner, B., Ametz, C., Siegwart, G., Wiesenberger, G., Berthiller, F., Lemmens, M., Jia, H., Adam, G., Muehlbauer, G.J., Kreil, D.P., and Buerstmayr, H.** (2013). Transcriptomic characterization of two major *Fusarium* resistance quantitative trait loci (QTLs), *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*, identifies novel candidate genes. *Mol Plant Pathol* **14**, 772-785.

- Seong, K.Y., Pasquali, M., Zhou, X., Song, J., Hilburn, K., McCormick, S., Dong, Y., Xu, J.R., and Kistler, H.C.** (2009). Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis. *Mol Microbiol* **72**, 354-367.
- Shin, S., Torres-Acosta, J.A., Heinen, S.J., McCormick, S., Lemmens, M., Paris, M.P., Berthiller, F., Adam, G., and Muehlbauer, G.J.** (2012). Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a barley UDP-glucosyltransferase exhibit resistance to the mycotoxin deoxynivalenol. *J Exp Bot* **63**, 4731-4740.
- Simon, C., Langlois-Meurinne, M., Bellvert, F., Garmier, M., Didierlaurent, L., Massoud, K., Chaouch, S., Marie, A., Bodo, B., Kauffmann, S., Noctor, G., and Saindrenan, P.** (2010). The differential spatial distribution of secondary metabolites in *Arabidopsis* leaves reacting hypersensitively to *Pseudomonas syringae* pv. tomato is dependent on the oxidative burst. *J Exp Bot* **61**, 3355-3370.
- Simon, C., Langlois-Meurinne, M., Didierlaurent, L., Chaouch, S., Bellvert, F., Massoud, K., Garmier, M., Thareau, V., Comte, G., Noctor, G., and Saindrenan, P.** (2014). The secondary metabolism glycosyltransferases UGT73B3 and UGT73B5 are components of redox status in resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Plant Cell Environ* **37**, 1114-1129.
- Sinnott, M.L.** (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews* **90**, 1171-1202.
- Smith, K.P., Evans, C.K., Dill-Macky, R., Gustus, C., Xie, W., and Dong, Y.** (2004). Host genetic effect on deoxynivalenol accumulation in fusarium head blight of barley. *Phytopathology* **94**, 766-771.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., and Kizek, R.** (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip Toxicol* **3**, 94-99.
- Søltoft, M., Jørgensen, L.N., Svensmark, B., and Fomsgaard, I.S.** (2008). Benzoxazinoid concentrations show correlation with *Fusarium* Head Blight resistance in Danish wheat varieties. *Biochemical Systematics and Ecology* **36**, 245-259.
- Sonderby, I.E., Geu-Flores, F., and Halkier, B.A.** (2010). Biosynthesis of glucosinolates--gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci* **15**, 283-290.
- Srinivasachary, Gosman, N., Steed, A., Hollins, T.W., Bayles, R., Jennings, P., and Nicholson, P.** (2009). Semi-dwarfing Rht-B1 and Rht-D1 loci of wheat differ significantly in their influence on resistance to *Fusarium* head blight. *Theor Appl Genet* **118**, 695-702.
- Steiner, B., Kurz, H., Lemmens, M., and Buerstmayr, H.** (2009). Differential gene expression of related wheat lines with contrasting levels of head blight resistance after *Fusarium graminearum* inoculation. *Theor Appl Genet* **118**, 753-764.
- Sudakin, D.L.** (2003). Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicol Lett* **143**, 97-107.
- Suzuki, T., and Iwahashi, Y.** (2014). Phytotoxicity evaluation of type B trichothecenes using a *Chlamydomonas reinhardtii* model system. *Toxins (Basel)* **6**, 453-463.
- Tanaka, K., Hayashi, K., Natsume, M., Kamiya, Y., Sakakibara, H., Kawaide, H., and Kasahara, H.** (2014). UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **55**, 218-228.
- Tanaka, Y., Yonekura, K., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Fujiwara, H., Ashikari, T., and Kusumi, T.** (1996). Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiol* **37**, 711-716.
- Thole, V., and Vain, P.** (2012). Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon*. *Methods Mol Biol* **847**, 137-149.

- Thole, V., Alves, S.C., Worland, B., Bevan, M.W., and Vain, P.** (2009). A protocol for efficiently retrieving and characterizing flanking sequence tags (FSTs) in *Brachypodium distachyon* T-DNA insertional mutants. *Nat Protoc* **4**, 650-661.
- Thole, V., Worland, B., Wright, J., Bevan, M.W., and Vain, P.** (2010). Distribution and characterization of more than 1000 T-DNA tags in the genome of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Plant Biotechnol J* **8**, 734-747.
- Thole, V., Peraldi, A., Worland, B., Nicholson, P., Doonan, J.H., and Vain, P.** (2012). T-DNA mutagenesis in *Brachypodium distachyon*. *J Exp Bot* **63**, 567-576.
- Tognetti, V.B., Van Aken, O., Morreel, K., Vandebroucke, K., van de Cotte, B., De Clercq, I., Chiwocha, S., Fenske, R., Prinsen, E., Boerjan, W., Genty, B., Stubbs, K.A., Inze, D., and Van Breusegem, F.** (2010). Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance. *Plant Cell* **22**, 2660-2679.
- Tokai, T., Koshino, H., Takahashi-Ando, N., Sato, M., Fujimura, M., and Kimura, M.** (2007). *Fusarium Tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **353**, 412-417.
- Trail, F.** (2009). For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol* **149**, 103-110.
- Ubeda-Tomas, S., Beemster, G.T., and Bennett, M.J.** (2012). Hormonal regulation of root growth: integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci* **17**, 326-331.
- Vain, P., Worland, B., Thole, V., McKenzie, N., Alves, S.C., Opanowicz, M., Fish, L.J., Bevan, M.W., and Snape, J.W.** (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnol J* **6**, 236-245.
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2008). Lignin engineering. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 278-285.
- Verelst, W., Bertolini, E., De Bodt, S., Vandepoele, K., Demeulenaere, M., Pe, M.E., and Inze, D.** (2013). Molecular and physiological analysis of growth-limiting drought stress in *Brachypodium distachyon* leaves. *Mol Plant* **6**, 311-322.
- Vogel, J., and Hill, T.** (2008). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* **27**, 471-478.
- Vogel, J., and Bragg, J.** (2009). *Brachypodium distachyon*, a New Model for the Triticeae. In *Genetics and Genomics of the Triticeae* (Springer US), pp. 427-449.
- Vogel, J., Garvin, D., Leong, O., and Hayden, D.** (2006a). *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **84**, 199-211.
- Vogel, J.P., Gu, Y.Q., Twigg, P., Lazo, G.R., Laudencia-Chingcuanco, D., Hayden, D.M., Donze, T.J., Vivian, L.A., Stamova, B., and Coleman-Derr, D.** (2006b). EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Theor Appl Genet* **113**, 186-195.
- Vogt, T., and Jones, P.** (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* **5**, 380-386.
- von Rad, U., Huttli, R., Lottspeich, F., Gierl, A., and Frey, M.** (2001). Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J* **28**, 633-642.
- Voss, H.H., Holzapfel, J., Hartl, L., Korzun, V., Rabenstein, F., Ebmeyer, E., Coester, H., Kempf, H., and Miedaner, T.** (2008). Effect of the Rht-D1 dwarfing locus on

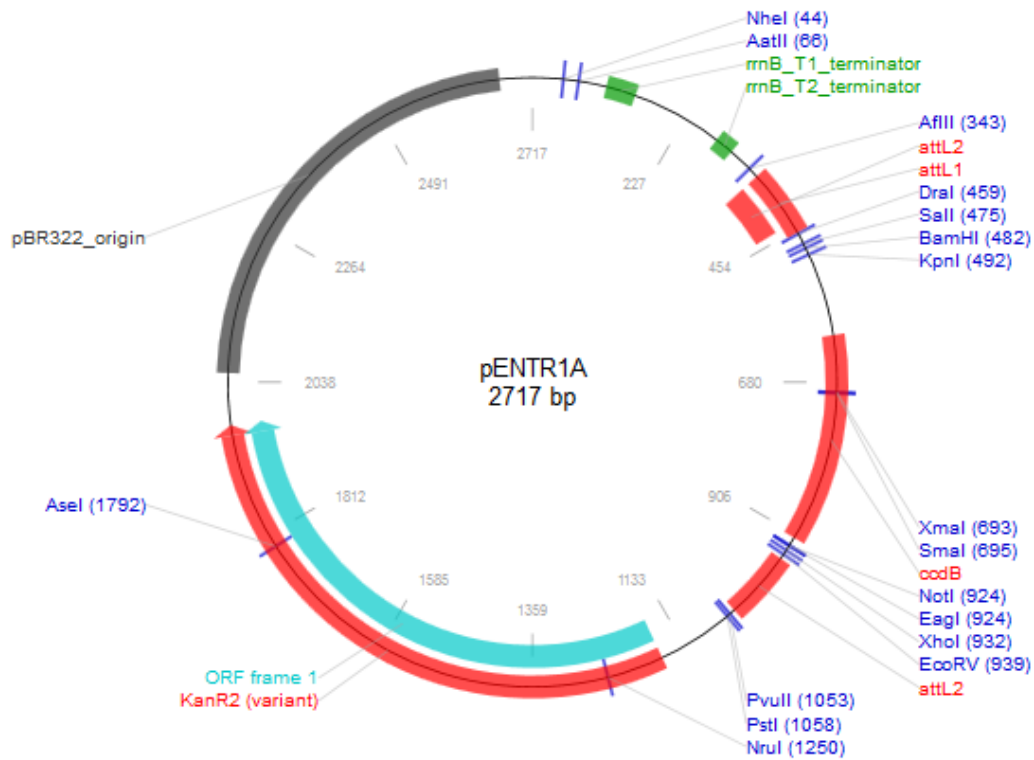
- Fusarium head blight rating in three segregating populations of winter wheat. *Plant Breeding* **127**, 333-339.
- Walsh, J.B.** (1995). How often do duplicated genes evolve new functions? *Genetics* **139**, 421-428.
- Walter, S., Nicholson, P., and Doohan, F.M.** (2010). Action and reaction of host and pathogen during Fusarium head blight disease. *New Phytol* **185**, 54-66.
- Walter, S., Brennan, J.M., Arunachalam, C., Ansari, K.I., Hu, X., Khan, M.R., Trognitz, F., Trognitz, B., Leonard, G., Egan, D., and Doohan, F.M.** (2008). Components of the gene network associated with genotype-dependent response of wheat to the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol. *Funct Integr Genomics* **8**, 421-427.
- Watt, M., Schneebeli, K., Dong, P., and Wilson, I.W.** (2009). The shoot and root growth of Brachypodium and its potential as a model for wheat and other cereal crops. *Functional Plant Biology* **36**, 960-969.
- Wicker, T., Mayer, K.F., Gundlach, H., Martis, M., Steuernagel, B., Scholz, U., Simkova, H., Kubalaková, M., Choulet, F., Taudien, S., Platzer, M., Feuillet, C., Fahima, T., Budak, H., Dolezel, J., Keller, B., and Stein, N.** (2011). Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives. *Plant Cell* **23**, 1706-1718.
- Wolfe, K.H., Gouy, M., Yang, Y.W., Sharp, P.M., and Li, W.H.** (1989). Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6201-6205.
- Wong, P., Walter, M., Lee, W., Mannhaupt, G., Munsterkötter, M., Mewes, H.W., Adam, G., and Guldener, U.** (2011). FGDB: revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Nucleic Acids Res* **39**, D637-639.
- Xu, X., and Nicholson, P.** (2009). Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 83-103.
- Xu, X.M., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Cooke, B.M., Doohan, F.M., Brennan, J., Monaghan, S., Moretti, A., Mule, G., Hornok, L., Beki, E., Tatnell, J., Ritieni, A., and Edwards, S.G.** (2008). Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* **98**, 69-78.
- Yang, H., Yang, S., Li, Y., and Hua, J.** (2007). The Arabidopsis BAP1 and BAP2 genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol* **145**, 135-146.
- Yazar, S., and Omurtag, G.I.** (2008). Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences* **9**, 2062-2090.
- Yin, Y., Liu, X., Li, B., and Ma, Z.** (2009). Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology* **99**, 487-497.
- Yonekura-Sakakibara, K., and Hanada, K.** (2011). An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *Plant J* **66**, 182-193.
- Yoshinari, T., Sakuda, S., Furihata, K., Furusawa, H., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., Ishizaki, N., and Terajima, J.** (2014). Structural determination of a nivalenol glucoside and development of an analytical method for the simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol, and their glucosides, in wheat. *J Agric Food Chem* **62**, 1174-1180.
- Yuen, G.Y., and Schoneweis, S.D.** (2007). Strategies for managing Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Int J Food Microbiol* **119**, 126-130.
- Zhang, X., Fu, J., Hiromasa, Y., Pan, H., and Bai, G.** (2013). Differentially expressed proteins associated with Fusarium head blight resistance in wheat. *PLoS ONE* **8**, e82079.

- Zhang, Y.J., Fan, P.S., Zhang, X., Chen, C.J., and Zhou, M.G.** (2009). Quantification of *Fusarium graminearum* in harvested grain by real-time polymerase chain reaction to assess efficacies of fungicides on fusarium head blight, deoxynivalenol contamination, and yield of winter wheat. *Phytopathology* **99**, 95-100.
- Zhong, R., and Ye, Z.H.** (2003). Unraveling the functions of glycosyltransferase family 47 in plants. *Trends Plant Sci* **8**, 565-568.
- Zhu, H., Gilchrist, L., Hayes, P., Kleinhofs, A., Kudrna, D., Liu, Z., Prom, L., Steffenson, B., Toojinda, T., and Vivar, H.** (1999). Does function follow form? Principal QTLs for Fusarium head blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled-haploid population of barley. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 1221-1232.
- Zhuang, Y., Gala, A., and Yen, Y.** (2013). Identification of functional genic components of major fusarium head blight resistance quantitative trait loci in wheat cultivar Sumai 3. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 442-450.

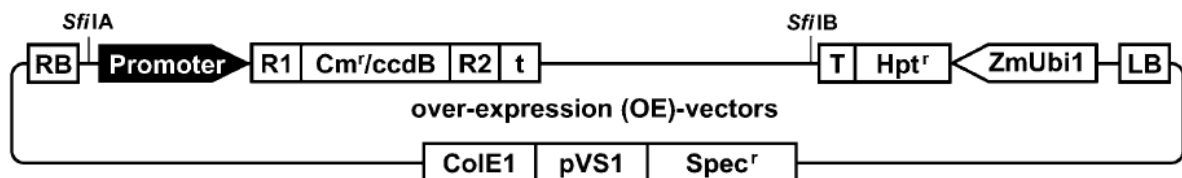
ANNEXES

Annexe 1 : Cartes des plasmides utilisés pendant cette étude

Carte du plasmide pENTR1A



Carte du plasmide pIKB002

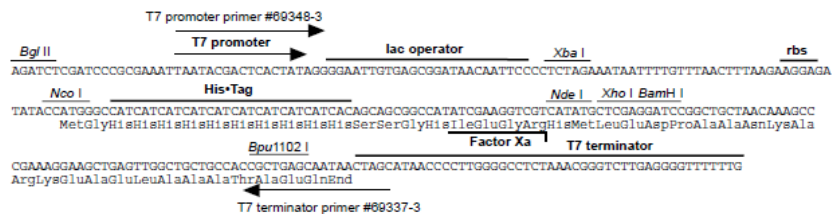
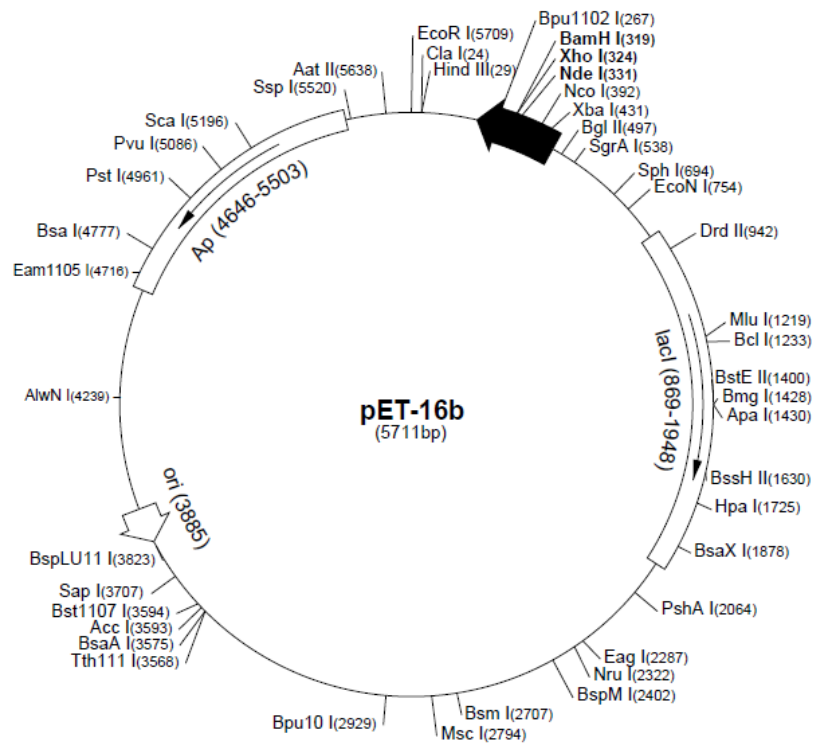


Promoter	OE-vector	Accession no.	RNAi-vector	Accession no.
ZmUbi1	pIPKb002	EU161568	pIPKb007	EU161573

Carte du plasmide pET-16b

pET-16b sequence landmarks

T7 promoter	466-482
T7 transcription start	465
His•Tag coding sequence	360-389
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lac</i> I coding sequence	869-1948
pBR322 origin	3885
<i>bla</i> coding sequence	4646-5503



pET-16b cloning/expression region

Annexe 2 : Milieux de culture

A. Milieux de culture fongiques

Milieu solide de croissance mycélienne (PDA)

1 litre d'eau du robinet contenant 200 g de pommes de terre coupées en morceaux est porté à ébullition. L'ensemble est filtré sur coton cardé et complétement de 20 g de glucose et 20 g d'agar. Le volume est ajusté à 1 litre avant d'autoclaver 20 minutes à 120°C.

Milieu liquide de sporulation (« mung bean ») (haricot mungo)

1 litre d'eau du robinet est porté à ébullition avant de rajouter 40 g de haricots mungo et de laisser de nouveau bouillir 10 minutes. L'ensemble est filtré pour retirer tout les éléments solides et autoclavé 20 minutes à 120°C.

B. Milieu pour la manipulation *in vitro* de *B. distachyon*

Milieu Murashige & Skoog

4,3 g de sels de base Murashige & Skoog (sans vitamines), 30 g de saccharose et 7 g d'Agar sont mélangés pour un volume finale d'1 litre avant d'être autoclavé 20 minutes à 120°C. Après stérilisation et équilibration de la température à 55°C, 100 mg de myo-inositol et 0,1 mg de thiamine-HCl sont ajoutés par litre de milieu.

Annexe 3 : liste des amorces utilisées dans les expériences de qPCR

Gène	Séquence nucléotidique	Polarité	Fonction putative	Longueur de l'amplicon (bp)
<i>Bd4g00660</i>	5'-ACCCTCTACGCTGGTGAGAC-3' 5'-TTGCTGTAAATGTGCGGATG-3'	Sens Anti-sens	UBC18 (gène de référence plante)	118
<i>Bd4g41850</i>	5'-CCTGAAGTCCTTTCCAGCC-3' 5'-AGGGCAGTGATCTCCTTGCT-3'	Sens Anti-sens	ACT7 (gène de référence plante)	188
<i>Bd1g75310</i>	5'-GCTACGTCTTCAGGCACTCC-3' 5'-CGATCGATGACTTGGAGCTT-3'	Sens Anti-sens	Cytochrome monooxygénase (CYP711A29)	103
<i>Bd3g22880</i>	5'-AGCAATGAGGATGAAGTGG-3' 5'-GGACACCTGAAAGAGAAGTATG-3'	Sens Anti-sens	Transpoter MATE efflux	100
<i>Bd2g41010</i>	5'-GGTGGGTGCGAGTCTACAAT-3' 5'-CAGGAAGGCTTGGAGTGGT-3'	Sens Anti-sens	Inconnue	169
<i>Bd2g35930</i>	5'-CCCCTTCGGGTTACATAC-3' 5'-TCAGCACGAGGTTTCATCATC-3'	Sens Anti-sens	Gluthation S-transférase GSTF1	147
<i>Bd4g39950</i>	5'-CGCACTAAAGAGGTGCTTCC-3' 5'-CGACGAGGCAGAATAGGTTTC-3'	Sens Anti-sens	NADP-dépendent alkenal double bond réductase P1	179
<i>Bd4g05040</i>	5'-CCAAGCTCACGGTGGAGTAT-3' 5'-CCTCGACCTTCTTGAGCAAC-3'	Sens Anti-sens	PR10	108
<i>Bd4g36870</i>	5'-GATCGACGACGGGCTCTAC-3' 5'-TCGAGGCGTACGTCTTCTCT-3'	Sens Anti-sens	Ornithine décarboxylase	116
<i>Bd4g36810</i>	5'-GAACCACCCACATCCAAG-3' 5'-GCAACAGAGCACCTACATTT-3'	Sens Anti-sens	Ornithine décarboxylase	108
<i>Bd1g50067</i>	5'-AACGACTACCGCAACCTCAT-3' 5'-GAGGACCCCTTCTTGAAGT-3'	Sens Anti-sens	Arginine décarboxylase	114
<i>Bd3g47110</i>	5'-CCAAACAATTAAGGAGATCAATTAGAA-3' 5'-CCCGAATACTGGAAAGTAAGATACA-3'	Sens Anti-sens	Phénylalanine ammonia-lyase	167
<i>Bd3g53227</i>	5'-AGGGTGCCTAGCTGGAAGA-3' 5'-TGTCGGGGAAGTTATTCTGC-3'	Sens Anti-sens	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase (HMGR)	129
<i>Bd2g13360</i>	5'-GAGTGGGAGTCATTTCGAAA-3' 5'-CATGCTCCGTAAGTGCTGA-3'	Sens Anti-sens	Mévalonate kinase	123
<i>Bd1g12360</i>	5'-AAGGGGCGGATGTATGTA-3' 5'-CACACGAAAGGAACAGCA-3'	Sens Anti-sens	PR1	64
<i>Bd5g14430</i>	5'-CGGGCTACTACAGGGACT-3' 5'-TAAGACACGCAGGCATCT-3'	Sens Anti-sens	Chitinase	109
<i>Bd2g26810</i>	5'-GCAAGGGTTCAAGTATGAGA-3' 5'-ACACCATCACCACCAACTC-3'	Sens Anti-sens	Chitinase	102
<i>Bd2g02150</i>	5'-TACCCTCTCAAGCAGTTCA-3' 5'-TAGCCAGTAAACCCCAAT-3'	Sens Anti-sens	PR6	100
<i>Bd1g39190</i>	5'-TCCGACCAGGCTCTCTAC-3' 5'-GGTATGTTCCCATCTTGAC-3'	Sens Anti-sens	PR9	125
<i>Bd3g44910</i>	5'-ACATCATGGGCGTCTCTAC-3' 5'-ACGGGTAGCAGTTGATGAGG-3'	Sens Anti-sens	PR2	126

Gène	Séquence nucléotidique	Polarité	Fonction putative	Longueur de l'amplicon (bp)
<i>Bd2g04720</i>	5'-CAAGCATTGTCTGTTTCCC-3'	Sens	UDP-glycosyltransférase	170
	5'-GTGGAAAAAGCAGTATGCACC-3'	Anti-sens		
<i>Bd2g04760</i>	5'-TGCTTGATACAGATGGTAGTAGGC-3'	Sens	UDP-glycosyltransférase	246
	5'-CAATGCAAAGGAGAGCGTCTA-3'	Anti-sens		
<i>Bd5g03390</i>	5'-GGAGAAGCAGACCATTTTCATCTAT-3'	Sens	UDP-glycosyltransférase	177
	5'-TTGCATTTTCGTTTTGAGTTCTT-3'	Anti-sens		
<i>Bd5g03300</i>	5'-AAGAAAAGCTTGAATGGACAATAA-3'	Sens	UDP-glycosyltransférase	138
	5'-CGCGTGCATTGTCTCCTT-3'	Anti-sens		
<i>Bd5g02780</i>	5'-TCAACCAACTACAGCAAAA-3'	Sens	UDP-glycosyltransférase	81
	5'-CCTCTCTACCTCTTCCTTTC-3'	Anti-sens		
<i>Bd5g03370</i>	5'-ACCAACCAACTACTGCGA-3'	Sens	UDP-glycosyltransférase	81
	5'-CTCTCAATCTTTCCCTTGT-3'	Anti-sens		
<i>Bd5g03400</i>	5'-TACAAAAGGAATGCTATGAA-3'	Sens	UDP-glycosyltransférase	73
	5'-AATACTTGGTGGCGAAAT-3'	Anti-sens		
<i>Bd5g03380</i>	5'-GGCGTCAACTTCTTCAGC-3'	Sens	UDP-glycosyltransférase	128
	5'-GAGTCGCACAGTCCATTTTC-3'	Anti-sens		
18S <i>F. graminearum</i>	5'-GTCCGGCCGGGCCTTTCC-3'	Sens	Région ribosomique 18S (gène de référence fongique)	68
	5'-AAGTCCTGTTTCCCCGCCACGC-3'	Anti-sens		

Annexe 4 : Tampons utilisés pour la purification de protéine recombinante

Tampon de lyse (pH= 7) :

- Tris HCl 50 mM (pH = 7)
- NaCl 300 mM
- Imidazole 10 mM (toujours ajuster le pH après ajout de l'imidazole)
- Une pastille anti-protéase pour 50 ml de tampon (à ajouter après avoir ajusté le pH)

-

Tampon de lavage (pH= 7) :

- Tris HCl 50 mM (pH = 7)
- NaCl 300 mM
- Imidazole 10 mM (toujours ajuster le pH après ajout de l'imidazole)

Tampon d'élution (pH= 7) :

- Tris HCl 50 mM (pH = 7)
- NaCl 300 mM
- Imidazole 300 mM (toujours ajuster le pH après ajout de l'imidazole)

Résumé

La fusariose des épis est l'une des principales maladies des céréales, majoritairement causée par le champignon pathogène et toxigène, *Fusarium graminearum* (*Fg*). Lors son développement *in planta*, le champignon produit des mycotoxines dommageables pour la santé humaine et animale, dont le déoxynivalénol (DON). De nombreux loci à effet quantitatif sur la résistance à *Fg* ont été identifiés chez le blé tendre. Certains d'entre eux ont été corrélés à la capacité à détoxifier le DON, en particulier par glucosylation sous l'action d'UDP-glucosyltransférases (UGT). Une UGT d'orge impliquée dans la conjugaison du DON a été identifiée en système hétérologue. *Brachypodium distachyon* (*Bd*) a récemment émergé comme modèle d'étude pour les céréales. Ce travail à l'aide d'approches transcriptomique et métabolomique a mis en évidence que lors de l'interaction avec *Fg*, *Bd* met en place des réponses macroscopiques, moléculaires et métaboliques similaires à celles connues chez le blé et l'orge. La recherche d'UGTs candidates capables de conjuguer le DON en DON-3-*O*-glucoside (D3G) chez *Bd* a permis l'identification d'un candidat. L'analyse fonctionnelle du gène correspondant a été conduite par des approches de mutagenèse et de surexpression. Ceci a montré une sensibilité accrue des lignées mutantes à la toxine et à l'agent pathogène. A l'inverse les lignées surexpresses ont montré une tolérance et résistance quantitative à la toxine et l'agent pathogène. Ces résultats ont été corrélés par la détection *in planta* de DON et D3G, dans des proportions variables selon les lignées. Ces résultats démontrent le rôle majeur que joue la glucosylation du DON dans l'établissement de la résistance observée chez *Bd* en réponse à *Fg*.

Mots-clés :

Fusariose des épis, *Brachypodium distachyon*, *Fusarium graminearum*, déoxynivalénol, UDP-glycosyltransférase, détoxification

Summary

Fusarium head blight is a major cereal disease, mostly caused by the pathogenic and toxin-producing fungus, *Fusarium graminearum* (*Fg*). During its development *in planta*, the fungus produces mycotoxins harmful to human and animal health, including deoxynivalenol (DON). Many quantitative trait loci exhibiting an effect on resistance to *Fg* have been identified in wheat. Some of them were correlated with the ability to detoxify DON, particularly by glucosylation by UDP-glycosyltransferases (UGT). A barley UGT involved in the conjugation of DON was identified in a heterologous system. *Brachypodium distachyon* (*Bd*) has recently emerged as a model species for cereals. Using transcriptomic and metabolomic approaches, we show that when interacting with *Fg*, *Bd* implements macroscopic, molecular and metabolic responses similar to those known in wheat and barley. The search for UGT candidates able to conjugate DON into DON-3-*O*-glucoside (D3G) in *Bd* resulted in the identification of the *Bradi5g03300* gene. Functional analyses of this gene showed increased sensitivity of the mutant lines to the toxin and to the pathogen. Conversely the overexpressor lines showed a tolerance to the toxin and quantitative resistance to *Fg*. These results were correlated with the detection of differential amounts of DON and D3G in the different lines. These results demonstrate the important role of DON glucosylation in the resistance establishment of *Bd* observed in response to *Fg*.

Keywords:

FHB, *Brachypodium distachyon*, *Fusarium graminearum*, deoxynivalenol, UDP-glycosyltransferase, detoxification