



HAL
open science

Immunité du blé dur, modulation par la génétique et l'environnement

Aurelie Ducasse

► **To cite this version:**

Aurelie Ducasse. Immunité du blé dur, modulation par la génétique et l'environnement. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03550439

HAL Id: hal-03550439

<https://ephe.hal.science/hal-03550439>

Submitted on 1 Feb 2022

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

DUCASSE Aurélie

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Immunité du blé dur, modulation par la génétique et l'environnement.

Soutenu le 25/11/2021 devant le jury suivant :

Laurent Bremond (Maître de conférences ISEM) – Président

Jean-Benoît MOREL (DR INRAE Montpellier) – Tuteur scientifique

Frédéric ARNAUD (DECU EPHE et CR INRAE Lyon) – Tuteur pédagogique

Ali SIAH (Enseignant chercheur ISA Lille) – Rapporteur

Marie-Noëlle BRISSET (DR INRAE Angers) – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Jean-Benoît MOREL (DR INRAE)

Intitulé de la structure d'accueil : UMR PHIM, INRAE MONTPELLIER

Directeur : Jean-Benoît MOREL (DR INRAE)

et de

Frédéric ARNAUD (DECU EPHE et DR INRAE)

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR754 IVPC Infections Virales et Pathologie Comparée Université de Lyon, INRAE, EPHE ; LYON

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématique de l'EPHE : Les Cellules et leur Environnement : Dynamique des Interactions (CEDI)



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté

par

DUCASSE Aurélie

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : Immunité du blé dur, modulation par la génétique et l'environnement.

Soutenu le 25/11/2021 devant le jury suivant :

Laurent Bremond (Maître de conférences ISEM) – Président

Jean-Benoît MOREL (DR INRAE Montpellier) – Tuteur scientifique

Frédéric ARNAUD (DECU EPHE et DR INRAE Lyon) – Tuteur pédagogique

Ali SIAH (Enseignant chercheur ISA Lille) – Rapporteur

Marie-Noëlle BRISSET (DR INRAE Angers) – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Jean-Benoît MOREL (DR INRAE)

Intitulé de la structure d'accueil : UMR PHIM, INRAE MONTPELLIER

Directeur : Jean-Benoît MOREL (DR INRAE)

et de

Frédéric ARNAUD (DECU EPHE et DR INRAE)

Intitulé de la structure d'accueil EPHE : UMR754 IVPC Infections Virales et Pathologie Comparée Université de Lyon, INRAE, EPHE ; LYON

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématique de l'EPHE : Les Cellules et leur Environnement : Dynamique des Interactions (CEDI)

Remerciements

Je tiens en tout premier lieu à remercier mes deux encadrants officiels : Jean-Benoit MOREL, et Frédéric ARNAUD qui m'ont permis de réaliser ce diplôme. JB, merci de m'avoir encouragé à faire ce diplôme, de m'avoir laissé énormément d'autonomie pour que je puisse jongler entre manips et semaines de cours comme je l'entendais alors que j'étais déjà bien occupée.

Un énorme merci à ma non-officielle encadrante Elsa BALLINI pour le temps et l'aide qu'elle m'a apporté dans la difficile période de la rédaction et surtout pour avoir suspendu mes projets parallèles tout l'été afin que je puisse me consacrer à la rédaction.

Je remercie Marie-Noëlle Brisset, Ali Siah et Laurent Bremond, d'avoir accepté d'être examinateur rapporteur et président du jury de ce mémoire malgré leur planning chargé. J'espère que vous prendrez plaisir à lire ce manuscrit et que vous ne le subirez pas.

Merci à Loïc et Rémy pour leur aide en serre.

Merci à Claire, amie (et parfois mère de substitution) pour son écoute, ses conseils et nos petits restos 😊. Tu étais dans mon jury de concours il y a 13 ans (déjà !) et tu fus ma chef d'équipe quelques années. Puis tu es partie prendre la direction d'une unité dans le Sud. Un an plus tard le hasard fait que j'obtiens une mobilité dans cette même unité. Puis 7 ans après, on se retrouve à nouveau dans la même équipe. Tu as toujours été là pour moi durant ces 13 dernières années et je t'en remercie chaleureusement.

Un énorme merci au duo infernal du bureau 126 et néanmoins amis, je parle évidemment d'Agnès et Michel, pour leur écoute, leur soutien indéfectible, nos randos dans les cévennes le weekend pour s'aérer l'esprit et les pique-niques à la piscine de la mère Michelle. Merci également aux copines (Re-Agnès, Sonia, Charlotte, Laurence, Marlène, Elodie) avec qui à table le midi on parlait de tout, sauf boulot et rédaction. Rien de mieux que des cancans pour vous distraire...

Merci à Andy, grâce à qui les journées à inoculer et à coller des feuilles de blé passaient plus vite. Qui m'a accompagnée sur le terrain pour coller des feuilles, assis dans le coffre de la voiture comme des pauvrettes, mais rappelé par Morphée lors des trajets. J'en garde de très bons souvenirs. Tu es un peu mon piou-piou à qui j'ai essayé d'apprendre un maximum de chose et avec plaisir (ce qui est rare tu le sais !). Je suis contente que tu restes dans l'unité encore quelques années même si c'est dans une autre équipe.

Merci à mes collègues de la caserne pour m'avoir laisser travailler les après-midis lors de nos gardes feux de forêt de cet été, même si le contenu de mon mémoire demeure un peu obscur pour eux.

Table des matières

Remerciements	1
Liste des figures et tableaux	4
Abréviations	6
Introduction générale	8
1. Le blé	8
1.1. La filiaire du blé dur	8
1.2. Histoire / Origine / Domestication du blé	10
1.3. Taxonomie	12
1.4. Les principales maladies foliaires du blé	12
2. Les différents systèmes de défense des plantes.	17
2.1. L'immunité basale comme moyen de lutte	18
2.2. Lutte génétique, recherche de QTL :	22
3. Facteurs influençant l'immunité au champ	23
3.1. Le biocontrôle	24
3.2. Le stress hydrique	26
Projet de recherche	27
Matériels et méthodes	28
1. Variétés de blé :	28
2. Matériel fongique et méthodes d'inoculation :	28
3. Les différents traitements :	29
3.1. Application de <i>Streptomyces</i> dans le sol ou sur les feuilles de blé	29
3.2. Pulvérisation d'une solution de chitine sur les feuilles de blé	30
3.3. Génération d'un stress hydrique	30
4. Biologie moléculaire	30
4.1. Plant direct PCR	30
4.2. Extraction d'ADN de blé	31
4.3. Extraction d'ARN, préparation d'ADNc et qPCR :	31
5. Analyses statistiques	32
Résultats et discussion	33
Chapitre 1 : La lutte génétique.	33
1. Cartographie d'associations à l'échelle du génome (GWAS) pour la détection de résistances génétiques à RB et STB.	33
1.1. QTLs de résistance à RB	33
1.2. QTLs de résistance à STB	34

2. Rôle des récepteurs <i>CERK1</i> et <i>CeBIP</i> dans l'immunité basale	39
2.1. Sélection des mutants	39
2.2. Rôle du récepteur <i>CERK1</i> dans le développement des maladies STB et RB	41
2.3. Rôle du récepteur <i>CeBIP</i> dans le développement des maladies STB et RB	43
<i>Chapitre 2 : Modulation des défenses par l'environnement.</i>	45
1. Le stress hydrique.	45
1.1. Effets et conséquences sur la sensibilité aux maladies	45
1.2. Rôle du facteur de transcription <i>bZIP</i> dans la régulation du stress hydrique	52
2. Stimulation de l'immunité basale par le biocontrôle (exemple de la Chitine)	57
3. Stimulation de l'immunité basale par la lutte biologique (cas des actinomycètes)	61
<i>Discussion générale et perspectives</i>	65
<i>Références Bibliographiques</i>	69
<i>Annexe 1</i>	82

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Production céréalière dans le monde, campagne 2018/2019.....	8
Figure 2 : Production céréalière 2018 dans les principaux pays producteurs.....	8
Figure 3 : Pyramide de la lutte antiparasitaire intégrée (LAI).	9
Figure 4 : Chronologie de la domestication du blé.	10
Figure 5 : Quantité d'ADN de <i>P. nodorum</i> et de <i>Z. tritici</i> sur les échantillons de blé dur et blé tendre en France, entre 2013 et 2015.	13
Figure 6 : Life cycle of the fungal wheat pathogen <i>Zymoseptoria tritici</i>	14
Figure 7 : Cycle de vie de <i>Parastagonospora nodorum</i>	16
Figure 8 : Cycle de vie de <i>Puccinia recondita f. sp. Tritici</i>	17
Figure 9 : Schématisation des mécanismes de la PTI et de l'ETI.....	19
Figure 10 : Modèle en zigzag illustrant l'évolution du dialogue moléculaire entre une plante et un agent pathogène.	22
Figure 11 : Induction de défense de type ISR et SAR chez la plante.	25
Figure 12 : Schémas expérimentaux pour tester l'effet de souches de <i>Streptomyces</i> sur les symptômes des maladies RB, SNB, STB et les défenses basales de la plante via une application dans le sol ou sur les feuilles.	29
Figure 13 : Chronologie des expérimentations testant l'effet d'un spray chitine ou d'un stress hydrique sur les symptômes des maladies RB, SNB et STB.	30
Figure 14 : Carte de la position des QTL sur Zavitan (blé dur de référence).	35
Figure 15 : Symptômes STB des variétés du panel de validation des QTLs selon deux souches.....	37
Figure 16 : Principe de la régulation du taux d'ARNm traduit d'un gène dans une cellule par interférence à ARN (RNAi).	39
Figure 17 : Schéma de sélection des lots de graines reçus selon la ségrégation de la loi de Mendel..	40
Figure 18 : Symptômes STB et RB chez les lignées WT et Mut <i>CERK1</i>	42
Figure 19 : Expression des gènes <i>CERK1</i> et <i>CeBIP</i> dans les lignées <i>CERK1</i> WT et Mut.....	42
Figure 20 : Symptômes STB et RB chez les lignées WT et Mut <i>CeBIP</i>	43
Figure 21 : Expression des gènes <i>CERK1</i> et <i>CeBIP</i> dans les lignées <i>CeBIP</i> WT et Ho.....	43
Figure 22 : Niveau d'expression de gènes de défense basale chez les lignées WT et Mut <i>CeBIP</i>	44
Figure 23 : Effets de la sécheresse sur les maladies foliaires du blé dur.....	45
Figure 24 : Symptômes de STB et SNB en condition de stress hydrique ou non pour 20 variétés de blé dur.....	48
Figure 25 : Matrice de corrélation de Kendall dont les variables sont les symptômes STB et l'expression des gènes de défenses et de tolérance à la sécheresse.	50
Figure 26 : Niveau d'expression de gènes de sécheresse et défenses préformées par variété de blé dur en condition de stress hydrique.....	51
Figure 27 : Expression du gène <i>bZIP</i> chez différentes lignées OX et RNAi.	53
Figure 29 : Effets d'un stress hydrique sur les symptômes STB des lignées OX et RNAi <i>bZIP</i>	54
Figure 28 : Effets du stress hydrique sur les symptômes RB des lignées RNAi <i>bZIP</i>	54
Figure 31 : Niveau d'expression de gènes de tolérance à la sécheresse dans les lignées <i>bZIP</i> WT et Mut sous l'effet d'un stress hydrique ou non.	55
Figure 30 : Niveau d'expression de 4 gènes de défenses préformées dans les lignées <i>bZIP</i> WT et Mut sous l'effet d'un stress hydrique ou non.	55
Figure 32 : Niveau d'expression du gène <i>bZIP</i> dans les lignées <i>bZIP</i>	56

Figure 33 : Effets d'un traitement chitine sur les symptômes de 3 maladies foliaires du blé : STB, SNB et RB.....	57
Figure 34 : Effet du traitement Chitine sur les symptômes RB selon un panel de variétés de blé dur.....	58
Figure 35 : Effet global (21 variétés confondues) du traitement Chitine sur les symptômes de RB....	59
Figure 37 : Différence du niveau d'expression des défenses préformées par groupe de variété et par traitement.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 36 : Niveau d'expression de gènes de défense par variété selon un traitement eau ou chitine.	60
Figure 38 : Effets de l'ajout de souches de <i>Streptomyces</i> dans le sol sur les symptômes de RB.	61
Figure 39 : Effets de l'ajout de souches de <i>Streptomyces</i> dans le sol sur le niveau d'expression global des défenses préformées.....	62
Figure 40 : Effets de l'application de spores (germées ou non germées) de <i>Streptomyces</i> (souche MYC) sur les symptômes de SNB.	63
Figure 41 : Niveau des maladies SNB, STB et RB suite à un traitement foliaire par des différentes souches de <i>Streptomyces</i>	63
Figure 42 : Niveau d'expression de gènes de défenses préformées selon la souche de <i>Streptomyces</i> appliquée sur les feuilles de blé dur (Pescadou).....	64
Tableau 1 : Séquences et conditions d'utilisation des différents gènes utilisés dans ce projet.	32
Tableau 2 : Tableau de correspondance des noms des lignées <i>CERK1</i> et <i>CeBIP</i> sélectionnées.	41
Tableau 3 : Récapitulatif des p-value et R ² des différents modèles statistiques appliqués aux résultats de symptômes STB, SNB, et RB en condition de stress hydrique ou non.	46
Tableau 4 : Comparaison des p-value et R ² des différents modèles statistiques appliqués aux résultats de symptômes STB et SNB en condition de stress hydrique ou non entre toutes les variétés de blé dur étudiées et des sous-groupes de variétés réagissant significativement au stress hydrique.	49
Tableau 5 : Tableau de correspondance de nom des lignées <i>bZIP</i>	52
Tableau 6 : Comparaison des p-value et R ² des différents modèles statistiques expliquant les données symptômes RB selon le traitement appliqué.....	59

Abréviations

ABA	Acide abscissique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN	Acide RiboNucléique
Avr	Avirulence
bZIP	basic Leucine Zipper Domain
CaM	Calmoduline
CaMBP	"Calmoduline Binding Protein"
CBL	"Calcineurin B-Like protein"
CDPK	"Ca ²⁺ Dependant Protein Kinase" protéine kinase dépendante d'ions calcium
CeBIP	"Chitin Elicitor Binding Protein"
CERK1	"Chitin Elicitor Receptor Kinase"
CNF	"Chitin NanoFiber"
CRPM	Code Rural et de la Pêche Maritime
CTPS	Catalogue Technique Permanent de la selection
DAMP	"Damage Associated Molecular Pattern" Motif moléculaire associé aux dégâts
dbi	"day before inoculation" Jour avant inoculation
DGA	Direction Générale de l'Alimentation
DIS	"Drought-Induced Susceptibility" Sensibilité induite par la sécheresse
dpi	"day post inoculation" Jour après inoculation
EPO	"Evolution Pre-breeding pOpulation"
ETI	"Effector-Triggered Immunity" Immunité déclenchée par les effecteurs
FAO	"Food and Agriculture Organization" Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FHB	"Fusarium Head Blight" Fusariose du blé
Gb	Gigabase
GEVES	Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences
GBS	"Genotyping By Sequencing"
GLM	"Generalized Linear Model" Modèle linéaire généralisé
GWAS	"Genome-Wide Association Study" Etude d'association pangénomique
Ho	Homozygote
HR	"Hypersensitive Response" Réponse hypersensible
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement
ISR	"Induced Systemic Resistance" Résistance systémique induite
JA	Acide jasmonique
Kpb	Kilo paire de bases
LAI	Lutte Antiparasitaire Intégrée
LysM	"Lysin Motif"
MAMP	"Microbe Associated Molecular Pattern" motif moléculaire associé aux microbes
MAPK	"Mitogen-activated protein kinases" protéine kinase nécessaire à l'induction de la mitose
Mb	Megabase
Mut	Mutant

NADPH	"Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogene"
NB-LRR	"Nuclear Binding Leucine Rich Repeat"
NO	"Nitrogen Oxide" Oxide d'azote
NOD	"Nucleotide Oligomerization Domain"
NLR	"NOD-Like Receptor" Récepteur de type NOD
NRR	"Negative Regulator of Resistance"
NS et S	Non Stress hydrique et Stress hydrique
OX	"Over Expressor" Sur-expresser
PAMP	"Pathogen Associated Molecular Pattern" Motif moléculaire associé aux pathogènes
PGPR	"Plant Growth-Promoting Rhizobacteria"
PR (proteine PR)	"Pathogenesis Related" Protéine lié à la pathogénèse
protéine R	Protéine de Résistance
PRR	"Pathogen Recognition Receptors"
PTI	"PAMP-Triggered Immunity" Immunité déclenchée par les PAMP
qPCR	"quantitative Polymerase Chain Reaction"
QTL	"Quantitative Trait Loci"
RBHOD	"Respiratory Burst Oxidase Homolog Dependant"
RLCK	"Receptor-Like Cytoplasmic Kinase"
RLK	"Receptor Like Kinase"
RLP	"Receptor Like Protein"
RNAi	Acide RiboNucléique interférant
ROS	"Reactive Oxygen Species" Espèces réagissant à l'oxygène
RT-qPCR	"RetroTranscription - quantitative Polymerase Chain Reaction"
SA	Acide salicylique
SAR	"Systemic Acquired Resistance" résistance systémique acquise
SDP	Stimulation des Défenses des Plantes
SNB	"Septoria Nodorum Blotch" Septoriose du blé causée par <i>Parastagonospora nodorum</i>
STB	"Septoria Tritici Blotch" Septoriose du blé causée par <i>Zymoseptoria tritici</i>
TF ou FT	"Transcription Factor" Facteur de transcription
UMR-AGAP	Unité Mixte de Recherche - Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes
UMR-BIOGER	Unité Mixte de Recherche - BIOlogie et GEstion des Risques en agriculture
WAK	"Wall Associated Kinase"
WT	"Wild-Type" Sauvage

Introduction générale

1. Le blé

1.1. La filière du blé dur

Dans le monde 700 millions d'hectares de céréales sont cultivés, soit 49% des terres arables et 14% de la surface agricole mondiale (source FAO / FranceAgriMer). Le blé représente la deuxième céréale la plus cultivée au monde (28%) derrière le maïs (43%) et devant le riz (19%) et l'orge (5%) (figure 1) (Passion céréales, 2019).

La France est le premier producteur de céréales de l'Union européenne en 2018 avec 62,7 millions de tonnes sur 9,1 millions d'hectares pour 10,1 milliards d'euros (figure 2) (Passion céréales, 2019). En 2019, le blé dur représentait la 4^{ème} production de céréale (3%) avec 1,55 millions de tonnes sur 250 millions d'hectares, derrière le blé tendre (53%), le maïs (21%) et l'orge (17%). Cette culture est majoritairement présente en région Occitanie. La France en est le 3^{ème} producteur de l'Union européenne, devancée de loin par l'Italie et depuis peu par la Grèce (FranceAgriMer, 2020).

Du fait du réchauffement climatique, la température dépasse fréquemment les 25 degrés en fin de printemps ce qui augmente le risque d'échaudage des épis. Les épisodes de sécheresse ont une incidence sur la levée (retardée, incomplète, irrégulière), sur l'implantation racinaire (médiocre et superficielle), sur l'utilisation des engrais azotés, et sur le développement foliaire ce qui occasionne une diminution du nombre de grain, une sénescence accélérée et un défaut de remplissage du grain. De plus, avec des températures hivernales douces, les attaques d'insectes seront plus précoces et plus nombreuses et nécessiteront l'emploi en plus grandes quantité d'insecticides.

En France, la production de blé dur est menacée par deux facteurs majeurs : la sécheresse et les maladies fongiques. Ces dernières sont notamment dues à des champignons pathogènes des feuilles tels que *Puccinia triticina* (agent causal de la rouille brune, « RB ») ainsi que *Zymoseptoria tritici* et *Parastagonospora nodorum*, agents causaux de la septoriose (*Septoria Tritici Blotch* « STB » et *Septoria Nodorum Blotch* « SNB », respectivement).

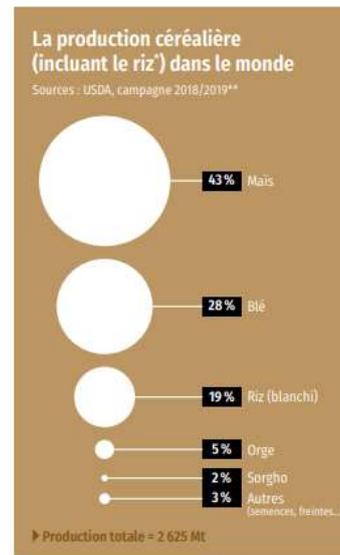


Figure 1 : Production céréalière dans le monde, campagne 2018/2019. (Passion céréales, 2019)

Les 8 premiers producteurs de céréales (incluant les semences) de l'Union Européenne en 2018



Avec une production de céréales de 62,7 millions de tonnes pour 10,1 milliards d'euros en 2018, la France est le 1^{er} pays producteur de céréales de l'Union Européenne. (Source : Eurostat)

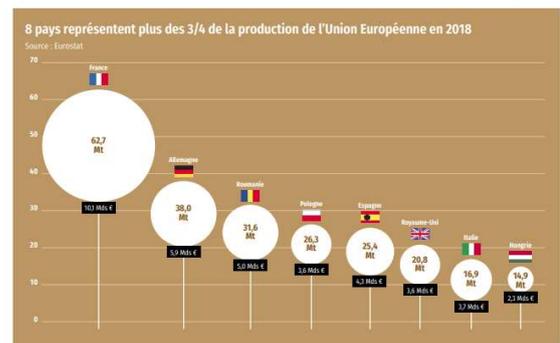


Figure 2 : Production céréalière 2018 dans les principaux pays producteurs (Passion céréales, 2019)

Depuis l'introduction des produits phytosanitaires dans les années 1930 permettant de faire de l'agriculture intensive, leur utilisation a doublé tous les 10 ans entre 1945 et 1985 (Bajard, 2016). En France, en 2017 d'après les données Agreste blé dur, 87% des parcelles sont traitées par au moins un fongicide et 96% des semences sont traitées (Agreste- Chiffres et Données, 2019). Le plan Ecophyto de 2008 puis le plan Ecophyto 2 de 2018 œuvrent pour réduire leur utilisation.

La protection intégrée telle que définie par l'Union Européenne (selon la directive communautaire 91/414/CEE du 15 juillet 1991) a été initialisée il y a une cinquantaine d'années avec pour objectif de réduire l'utilisation des pesticides et autres produits phytosanitaires afin de minimiser l'impact environnemental et le coût de la lutte tout en maximisant les résultats économiques de l'agriculteur. Elle consiste en la prise en considération de toutes les méthodes de protection des plantes disponibles telles que des méthodes agronomiques, le biocontrôle et la résistance avec en dernier recours la lutte chimique. Dans cette vision de la protection intégrée certains ont proposé récemment de baser la lutte notamment sur une vision élargie de la résistance des plantes (figure 3) (Stenberg, 2017).

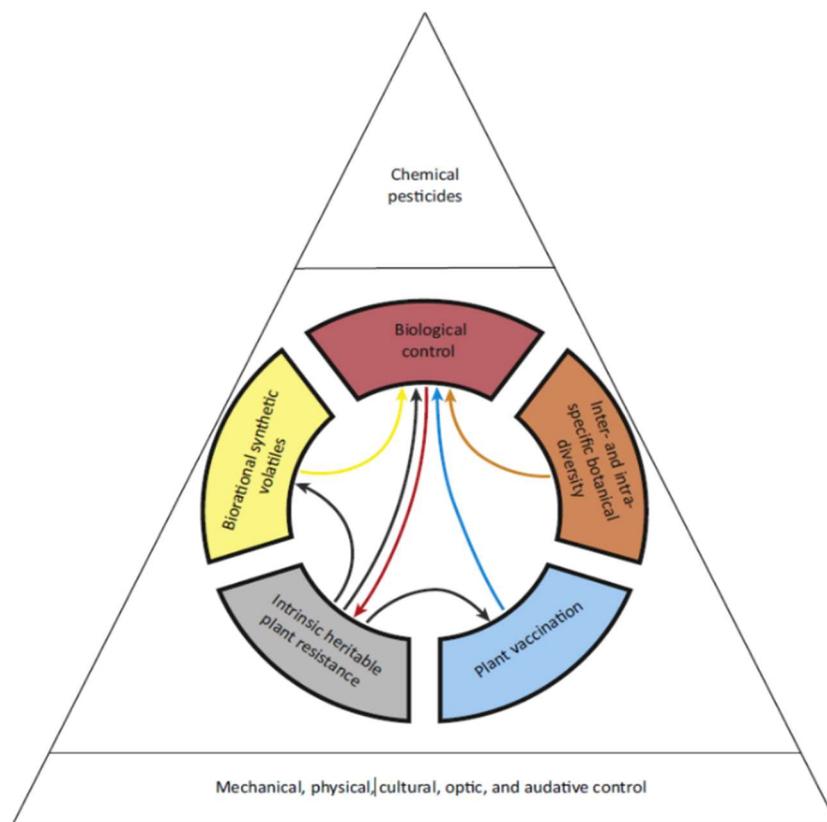


Figure 3 : Pyramide de la lutte antiparasitaire intégrée (LAI).

Le niveau de base de la pyramide de la lutte intégrée consiste en des mesures abiotiques qui peuvent être appliquées avant ou immédiatement après la plantation et qui peuvent se poursuivre jusqu'à la récolte. Suit ensuite un volet circulaire composé d'éléments importants qui peuvent être classés comme « écologiques » et qui forment la base de la lutte intégrée fondée sur l'écologie. Enfin, le niveau supérieur de la pyramide comprend des pesticides chimiques qui ne devraient être appliqués que si nécessaire, si les éléments plus basaux de la LAI ne parviennent pas à maintenir les populations de ravageurs sous le seuil économique. Les flèches indiquent des interactions particulièrement importantes entre les éléments écologiques (Stenberg, 2017).

1.2. Histoire / Origine / Domestication du blé

Les premières traces de graminées sauvages, ancêtres du blé que nous connaissons, remontent à il y a environ 500 000 ans avec une hybridation spontanée (Mori et al., 1995; Huang et al., 2002; Dvorak and Akhunov, 2005) entre deux espèces diploïdes : *Triticum urartu* (génomme AA) et une espèce inconnue, proche de *Aegilops speltaoides* (génomme BB) pour donner l'amidonnier sauvage (*Triticum turgidum dicoccoïdes*) (figure 4) (Feldman, 1995).

L'histoire du blé est étroitement liée à l'histoire de l'Homme. A l'ère du paléolithique, dans la région du croissant fertile (Lev-Yadun et al., 2000; Feldman and Kislev, 2007) il y a environ 12 000 ans, l'Homme encore nomade, se met à cultiver les premières céréales, principalement l'amidonnier sauvage. Près de 1000 ans de sélection (Willcox, 2020) (basée sur des critères de dormance des grains, augmentation du poids des grains, rachi solide permettant une récolte) conduit au passage l'amidonnier sauvage (*Triticum turgidum dicoccoïdes*) à l'amidonnier cultivé (*Triticum turgidum dicoccum*).

Cela représente un tournant décisif de notre civilisation. L'homme qui avait été jusque-là nomade, vivant de la chasse et de la cueillette depuis des millénaires, se fixe et se met à la culture et pour la première fois agit sur la nature et l'environnement de façon à améliorer et régulariser sa subsistance (Hayden, 1990; Martin and Wadley, 2000). C'est à ce moment-là que nous sommes passés du paléolithique (paléo = ancien) à une ère nouvelle : le néolithique (néo = nouveau).

Mais à ce stade, l'amidonnier cultivé a des grains vêtus (entourés d'une glume épaisse et dure, difficile à enlever car solidaire du grain lors du battage). Par chance, une mutation naturelle apparaît (Faris et

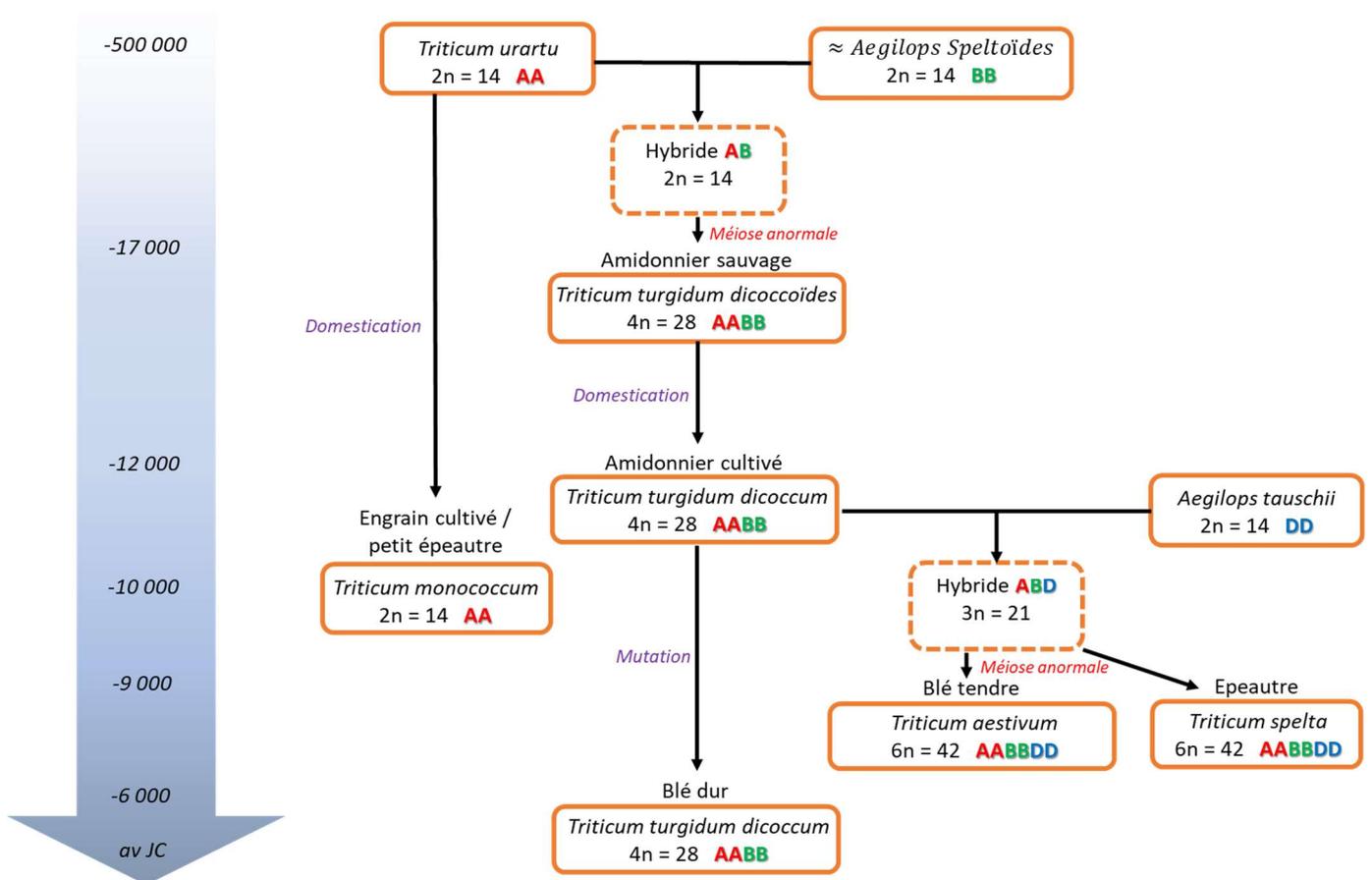


Figure 4 : Chronologie de la domestication du blé.

al., 2003; Simons et al., 2006). Elle modifie complètement la morphologie des épis en affectant, de manière pléiotropique nombreux caractères phénotypiques (Simonetti et al., 1999; Jantasuriyarat et al., 2004; Simons et al., 2006) dont les glumes qui deviennent plus souples et la taille du méristème est réduit à une petite zone à la base des glumes, ce qui permet un battage plus facile et un maintien du rachis intact lors du battage (Zhang et al., 2011). C'est le début de la culture du blé dur (*Triticum turgidum durum*) (Aaronsohn, 1909; Zohary and Hopf, 2000; Bonjean, 2001; Feldman and Millet, 2001).

Parallèlement à cette domestication, un nouvel évènement d'hybridation se produit entre l'amidonnier cultivé et *Agilops Tauschii* environ 10 000 ans av J-C. Cet évènement suivi d'une méiose incomplète donne naissance à une nouvelle espèce de blé qui sera hexaploïde, le blé tendre (Caldwell et al., 2004).

Jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle, le blé dur est cultivé en « population de pays » ce qui veut dire que les variétés semées au champ sont en fait un mélange de différents génotypes. Des programmes de sélections pour obtenir des « lignées pures » vont voir le jour (Vilmorin, 1880) au cours du 20^{ème} siècle. En France, dans les années 1960, l'INRA initie un programme de création variétale par croisement pour obtenir des variétés semi-naines pour fortement limiter la verse et donc augmenter le rendement. Ce trait phénotypique a été obtenu par croisement avec du blé tendre. Or, lors de l'introgression des gènes de nanisme, des allèles de blé tendre codant pour des protéines du grain (gliadines) ont également été transférés. Ces allèles confèrent une qualité des protéines du grain bien inférieure, impactant considérablement la qualité pastière. Un nouveau programme de sélection a alors été initié pour remédier à cela. A partir de 1983, l'INRA anime un Groupement d'Intérêt Economique (GIE) rassemblant les sélectionneurs français, les industriels et les instituts techniques liés à la culture du blé dur et à sa transformation dont l'objectif est de contribuer au développement et au rayonnement des variétés françaises. Ces variétés dites « élites » continuent d'être améliorées par croisement et sélection variétale afin de présenter les meilleures caractéristiques agronomiques comme la résistance à la verse, la productivité, la résistance à certaines maladies (rouilles, fusariose, oïdium et plus récemment septoriose) ainsi que la bonne valorisation de l'azote. Elles sont inscrites au catalogue CTPS (Catalogue technique permanent de la sélection). Le revers inévitable à cette course permanente à la sélection variétale est une perte de la diversité génétique chez les formes cultivées par rapport aux populations de plantes sauvages dont elles sont issues (Buckler et al., 2001; Thuillet et al., 2005a; Haudry et al., 2007).

Actuellement, 38 variétés de blé dur sont sur la liste A du catalogue, 11 autres n'y sont plus référencées mais sont encore commercialisables. La liste A référence les variétés pouvant être multipliées et commercialisées en France et en Europe et la liste B correspond aux variétés pouvant être multipliées en France en vue d'une exportation hors Union Européenne (GEVES.fr). Or en 2018, seulement 5 variétés représentaient 82,4% des surfaces de blé dur cultivé en France, dont la variété Anvergur atteignait à elle seule près de la moitié (48,2%) de la sole nationale (FranceAgriMer, 2018).

Au cours de son histoire, les étapes successives de domestication et de sélection du blé dur ont représenté un goulot d'étranglement pour sa diversité génétique (Thuillet et al., 2005b; Haudry et al., 2007). En 1997, une population évolutive de blé dur de haute diversité génétique a été fondée : EPO (Evolution Pre-breeding pOpulation) (David et al., 2014) en introduisant par croisement dans du blé dur moderne des accessions sauvages et primitives de *Triticum turgidum*. Au bout de 17 générations, 175 lignées fertiles ont été extraites. Cette population de blé dur a été partiellement génotypée par séquençage (GBS) et assemblée par rapport au génome de référence Svevo. Les résultats montrent que cette population couvre un niveau très élevé de diversité avec 76188 SNP, ce qui en fait une source intéressante pour des études de GWAS et des programmes de sélection génomique par rapport aux variétés de blé dur élites (David et al., 2014).

1.3. Taxonomie

Le blé dur (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) est plante monocotylédone annuelle, de la famille des Poaceae et de la tribu des Triticeae (tout comme l'orge et le seigle) dont l'histoire a été décrite précédemment. Il est tétraploïde ($2n = 4x = 28$), cette polyploïdie étant la conséquence de l'hybridation entre espèces diploïdes suite à l'association de plusieurs jeux complets de chromosomes dans un noyau. Cela est causé la plupart du temps par la production de gamètes non réduits.

Le génome du blé dur possède deux génomes A et B (AABB) : le génome A (provenant de l'espèce diploïde *Triticum urartu*) et le génome B (provenant d'une espèce proche d'*Aegilops speltoides*), chacun étant constitué de 7 paires de chromosomes, et possède donc 14 paires de chromosomes ($2n=4x=28$, AABB). Récemment, le génome du blé dur a été assemblé pour une taille de 10,45 gigabases (Gb) (Maccaferri et al., 2019a). Le blé dur est une espèce autogame (autofécondation mais 0,5 à 5% d'allofécondation reste possible).

L'homologie entre les chromosomes homéologues (entre le génome A et B) est relativement élevée. Le blé dur étant allotétraploïde, son hérédité est disomique. Cela implique que lors de la méiose, par exemple, le chromosome 1 du génome A ne peut pas s'apparier avec le chromosome 1 du génome B. En effet, cet appariement inter-génome est inhibé par le gène Ph (Pairing homeologous) (Griffiths et al., 2006). La taille du génome complet du blé dur, *T. turgidum ssp durum*, est cinq fois plus gros que le génome humain et 30 fois plus gros que celui du riz. Le nombre de gènes chez le blé est estimé à 62 813 gènes (Avni et al., 2017). Ces gènes sont répartis de façon à peu près équivalente entre les deux génomes A et B. Cependant, la distribution des gènes le long des chromosomes n'est pas homogène (Choulet et al., 2014; Avni et al., 2017). De plus, le génome du blé est constitué à 80% de séquences répétées composées essentiellement d'éléments transposables.

Actuellement, deux génomes récemment séquencés sont disponibles : Svevo (Maccaferri et al., 2019b) qui est une variété de blé dur moderne (*Triticum turgidum durum*) et Zavitan (Avni et al., 2017) qui est une variété d'amidonier sauvage (*Triticum turgidum diciccoides*), l'ancêtre du blé dur. Il y a peu de données sur le blé dur car les recherches sont plus orientées sur le blé tendre qui est plus important économiquement. Ces dernières sont peu transposables sur le blé dur car la génétique de ces deux espèces est différente et les souches de pathogènes sont spécifiques à chaque espèce. Il est donc indispensable d'explorer cette thématique sur le blé dur.

1.4. Les principales maladies foliaires du blé

1.4.1 La septoriose du blé

Jusque dans les années 60-70, la prévalence de la septoriose dans les maladies foliaires du blé était faible en Europe occidentale (Eyal, 1987; Torriani et al., 2015). Depuis, les stratégies de sélection pour augmenter le rendement des variétés de blé (notamment avec l'introduction de variétés précoces et semi-naines) ont eu pour conséquence d'augmenter également l'incidence de la septoriose. Ce phénomène a été qualifié de forte association négative entre le potentiel de rendement et la résistance variétale (Torriani et al., 2015). La perte de rendement due à la septoriose, allant jusqu'à 20%, est de l'ordre du milliard d'euro pour chacun des trois principaux pays producteurs de blé en Europe (France, Allemagne, Royaume-Uni) (Fones and Gurr, 2015). Cette perte est causée par une perte de surface

foliaire photosynthétique affectant directement le rendement du blé. Environ 70% des dépenses de l'UE en fongicides sont destinés à lutter contre la septoriose (Torriani et al., 2015), soit environ 1 milliard

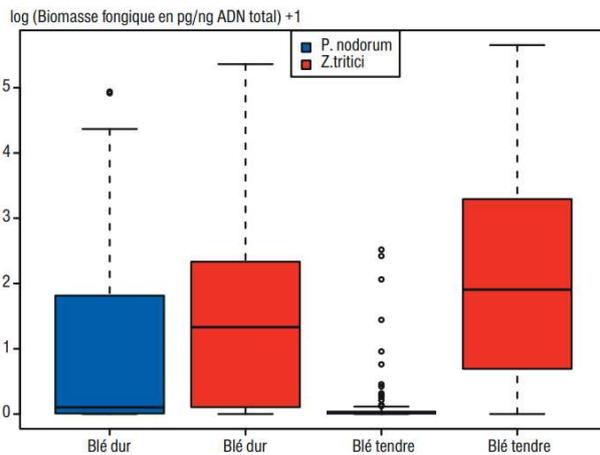


Figure 5 : Quantité d'ADN de *P. nodorum* et de *Z. tritici* sur les échantillons de blé dur et blé tendre en France, entre 2013 et 2015.

(Valade, 2017)

de tendre est presque exclusivement causée par *Z. tritici* alors que chez le blé dur *P. nodorum* est encore présent (Valade, 2017) (figure 5).

1.4.1.1. *Zymoseptoria tritici*

Z. tritici est un ascomycète hémibiotrophe (ou «nécrotrophe latent») (Sánchez-Vallet et al., 2015a). Cela signifie que son cycle de vie est divisé en deux étapes distinctes : une première phase de latence asymptomatique puis une phase nécrotrophique (figure 6). Ce champignon est polycyclique. Il réalise donc plusieurs cycles de vie durant la période de culture du blé.

La phase de latence :

Elle est composée de trois étapes successives : la **transition** se fait dans les 3 jours suivant l'arrivée d'une spore sur une feuille par splashing. La spore germe, produit un tube germinatif qui va passer de la surface foliaire à la cavité sous-stomatale en passant par un stomate. Cette **pénétration** se produit que l'hôte soit résistant ou sensible à l'infection à *Z. tritici* et que l'isolat de *Z. tritici* soit ou non pathogène (Cohen and Eyal, 1993; Shetty et al., 2007; Siah et al., 2010). Puis vient la **colonisation**, étape pendant laquelle le champignon va croître dans les espaces apoplastiques entre les cellules de l'hôtes (Kema et al., 1996; Siah et al., 2010). La durée de la colonisation biotrophe (sans la mort des cellules des plantes) dure une dizaine de jours mais varie en fonction de la variété de blé, de l'isolat et des conditions environnementales (Hehir et al., 2018).

La phase nécrotrophique :

Dans le cas d'une infection compatible, 11 à 14 jours après l'infection, *Z. tritici* commence son alimentation par l'acquisition de nutriments libérés lors de la mort cellulaire (phase nécrotrophe). Celle-ci peut être provoquée par le pathogène (Keon et al., 2007) ou par la plante. Lors de l'infection par

d'euros. Cette forte pression de sélection sur les populations de pathogènes (McDonald and Stukenbrock, 2016), associée à une recombinaison sexuelle fréquente chez *Z. tritici* (Banke et al., 2004; Welch et al., 2018), a conduit à une évolution rapide de la virulence fongique, de la résistance aux principales classes de fongicides (Lucas, 2003; Hayes et al., 2015; Dooley et al., 2016) et la dégradation rapide de la résistance de l'hôte (Cowger et al., 2000; Stukenbrock and McDonald, 2008; McDonald and Stukenbrock, 2016; Hauelsen et al., 2017).

D'autre part, la septoriose du blé est causée principalement par un complexe de champignon dont *Z. tritici* et *P. nodorum*. Depuis les années 80 la septoriose du blé

Z. tritici, de petites régions nécrotiques abritant le champignon apparaissent et sont entourées de zones chlorotiques subissant une mort cellulaire (Keon et al., 2007) facilitant l'expansion des nécroses.

Au sein de celles-ci, *Z. tritici* crée des structures reproductives dans les cavités sous-stomacales appelées pycnides (Duncan and Howard, 2000). Ces pycnides renferment des macropycnidiospores qui sont des spores asexuées donc clonales. En condition humide, un cyrrhe (gel colloïdal) contenant ces spores sort de la pycnide pour être emporté par les gouttes de pluie vers d'autres feuilles proches (phénomène de splashing).

A la fin de la saison culturale, une croissance saprophyte de *Z. tritici* se produit sur les tissus morts comme les résidus de culture. Des organes de fructification sexuelle sont générées : les pseudothèces (Sánchez-Vallet et al., 2015a) qui produisent des ascospores. Cette reproduction sexuée en fin de saison assure un flux de gènes importants dans les populations de *Z. tritici* (Zhan and McDonald, 2004) et génère l'inoculum primaire pour la saison suivante.

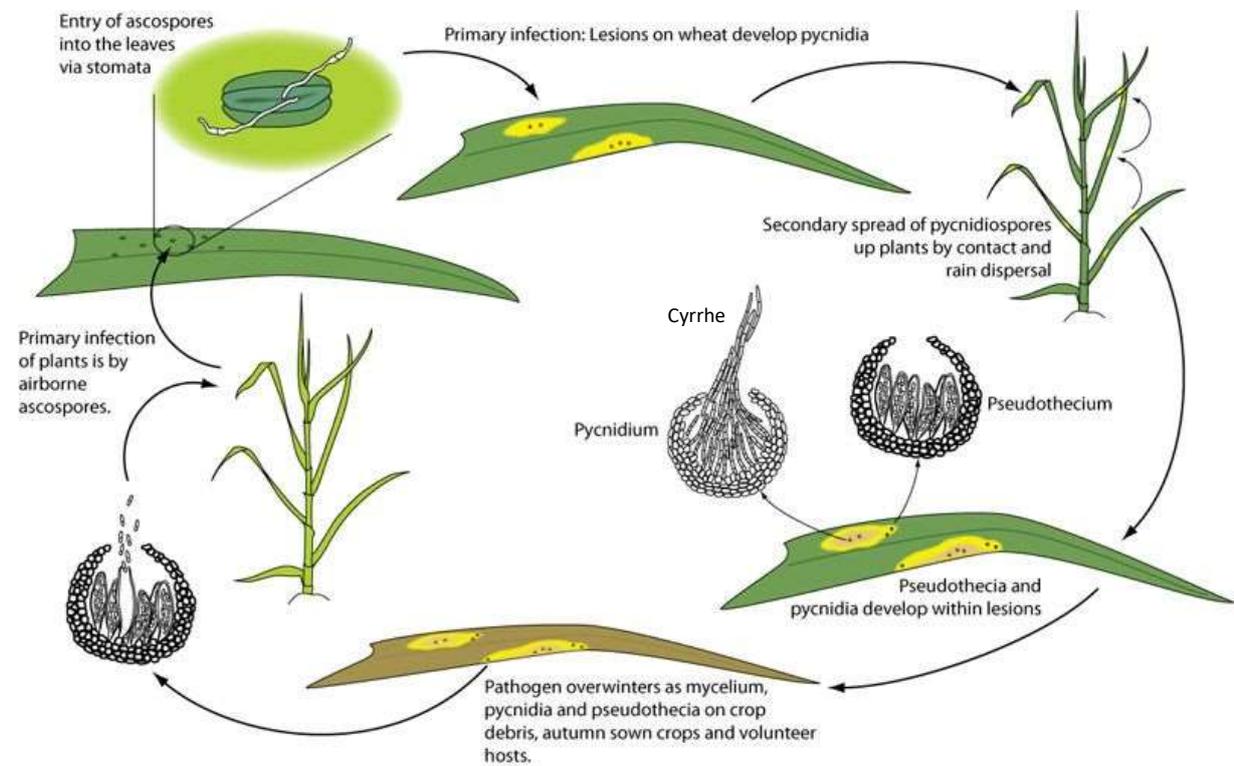


Figure 6 : Life cycle of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. (Ponomarenko et al., 2011)

Z. tritici est la première espèce de Dothidéomycètes à avoir été séquencée avec l'isolat de blé tendre IPO323. L'assemblage du génome de référence IPO323 mesure 39,69 Mb, représentant 21 chromosomes dont 13 sont essentiels et 8 sont accessoires, codant pour 10952 gènes (Wittenberg et al., 2009; Goodwin et al., 2011).

1.4.1.2. *Parastagonospora nodorum*

P. nodorum est un champignon nécrotrophe agent causal de la septoriose SNB (*Septoria Nodorum* Blotch) du blé. Les symptômes de SNB sont visibles sur les feuilles, les tiges, les nœuds et les glumes. Ce sont de petites lésions marron foncé avec un halo jaune, résultant de toxines produites et diffusées par l'agent pathogène (Mehra et al., 2019). Les glumes infectées entraînent des grains rétrécis avec une qualité et une quantité de grains médiocres, ce qui entraîne une réduction des pertes de rendement allant jusqu'à 20-50% (Duba et al., 2018). Il y a un fort risque épidémique si un minimum de 3% des graines sont infectées. *P. nodorum* est principalement présent en Australie, au Brésil et aux USA, mais des cas de SNB ont été documentés dans les pays scandinaves et en France, essentiellement sur blé dur. Les symptômes de SNB sont plus enchâssés dans les tissus et les pycnides sont plutôt marron avec des cirrhes rosés, alors que les symptômes de STB donnent des pycnides bien noires à la surface avec des cirrhes blancs.

La colonisation de l'hôte par *P. nodorum* dépend de la lumière (Oliver et al., 2012) et commence lorsque les hyphes poussant à partir des spores en germination pénètrent à travers la cuticule de la feuille, et de manière opportuniste à travers les stomates, ce qui provoque le jaunissement du site d'infection de la feuille. Dans les zones chlorotiques, des nécroses se développent et des pycnides commencent à se former dans ces lésions au bout d'une semaine environ (Solomon et al., 2006). Au cours de la première étape de l'infection, l'agent pathogène produit des effecteurs nécrotrophes toxiques, tels que ToxA, Tox1 et Tox2, qui tuent les tissus de l'hôte pendant la colonisation (Oliver et al., 2012; Mehra et al., 2019). La production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire (xylanases, glycanases, glucanases et cellulases) induit également la nécrose des tissus de l'hôte et est l'une des caractéristiques qui différencient *P. nodorum* de *Z. tritici* (Solomon et al., 2006; Duba et al., 2018). L'inoculum peut provenir de diverses sources (figure 7). Lors de l'hivernage, les pseudothèces et/ou pycnides pathogènes passent l'hiver dans les débris de blé. L'inoculum de la primo-infection est principalement constitué d'ascospores véhiculées par le vent provenant de pseudothécies, ou de conidies dispersées par éclaboussures de pluie provenant de pycnides. Puis la dispersion verticale se fait au fur et à mesure que les conidies passent de la canopée inférieure à la partie supérieure, puis aux glumes via la pluie. Les futures semences ainsi contaminées vont transmettre l'infection aux plantules de la saison suivante. Les conidies et les ascospores peuvent germer et provoquer une infection entre 5 et 35°C (optimal : 15 à 25°C), favorisée par les orages (Mehra et al., 2019).

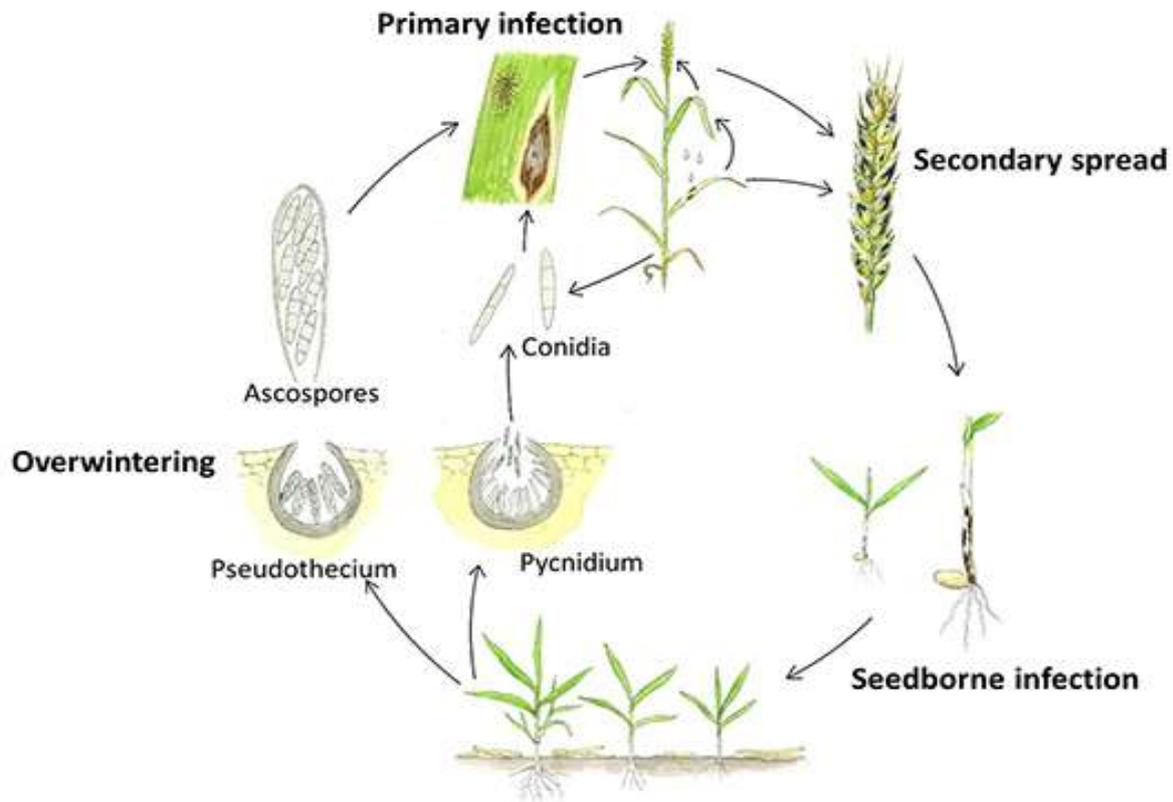


Figure 7 : Cycle de vie de *Parastagonospora nodorum*.
(Mehra et al., 2019). Illustration originale de H. Karlsen.

1.4.2. *Puccinia recondita f. sp. tritici*, agent de la rouille brune du blé.

La rouille brune (RB) est une maladie foliaire causée chez le blé par *Puccinia recondita f. sp. tritici*. Cette maladie est responsable de perte économique importante dans le monde entier. Elle provoque des pertes de rendement de 10% à 40% sur les variétés les plus sensibles en impactant la biomasse, le poids des grains, le nombre de grains par mètre carré et la qualité du grain (Herrera-Foessel et al., 2006; Huerta-Espino et al., 2011; Kolmer, 2013; www.Bayer-Agri.fr, 2019).

P. recondita f. sp. tritici est un basidiomycète de la famille des Pucciniaceae, biotrophe obligatoire. Il a absolument besoin de tissus vivants pour survivre et se développer. Le cycle de vie de *P. recondita* (figure 8) est totalement différent de celui de *Z. tritici* et bien plus complexe car il a besoin d'un hôte alternatif pour réaliser l'intégralité de son cycle qui comporte cinq stades distincts de spores. Les téliospires, les basidiospores et les urédospores sur le blé, et les pycniospores et les éciospores sur des hôtes alternatifs (Kolmer, 2013) (figure 8). Au printemps, des éciospores apportées par le vent infectent des feuilles de blé et créent les premières générations d'urédies. Les urédospores, issues de ces urédies, sont disséminées par le vent. Lorsqu'elles arrivent sur des feuilles de blé et dans des conditions favorables (humidité saturante), elles germent en émettant un tube germinatif qui croît jusqu'à un stomate pour y pénétrer à l'aide d'un appressorium. Des hyphes secondaires formant des haustoria, vont parasiter la feuille et en l'espace d'une dizaine de jours, de nouvelles urédies seront formées, libérant de nouvelles urédospores. Ce cycle asexué perdure du printemps jusqu'au début de l'été tant que les conditions climatiques le permettent. En fin de saison, les noyaux dicaryons des urédospores fusionnent en un

noyau diploïde pour donner des téliospires. Ces spores germent, subissent une méiose et produisent 4 basidiospores haploïdes qui sont éjectées violemment dans l'air. A partir de ce moment, le cycle de vie de *P. recondita f. sp. tritici* nécessite la présence d'un hôte alternatif. Les basidiospores infectent la surface supérieure de la feuille de l'hôte alternatif et créent des structures pycniales. Lorsque deux types (mat+/mat-) sont proches sur la même feuille, leurs hyphes flexibles portant des pycniospores haploïdes vont se rencontrer et fusionner. Ces nouvelles pycniospores dicaryotes vont générer des hyphes au travers de la feuille pour former des écies à la surface inférieure de la feuille. Des chaînes d'éciospores sont produites à l'intérieure de ces structures puis seront libérées et dispersées par le vent vers son hôte céréaliier. Un nouveau cycle commence peut alors commencer.

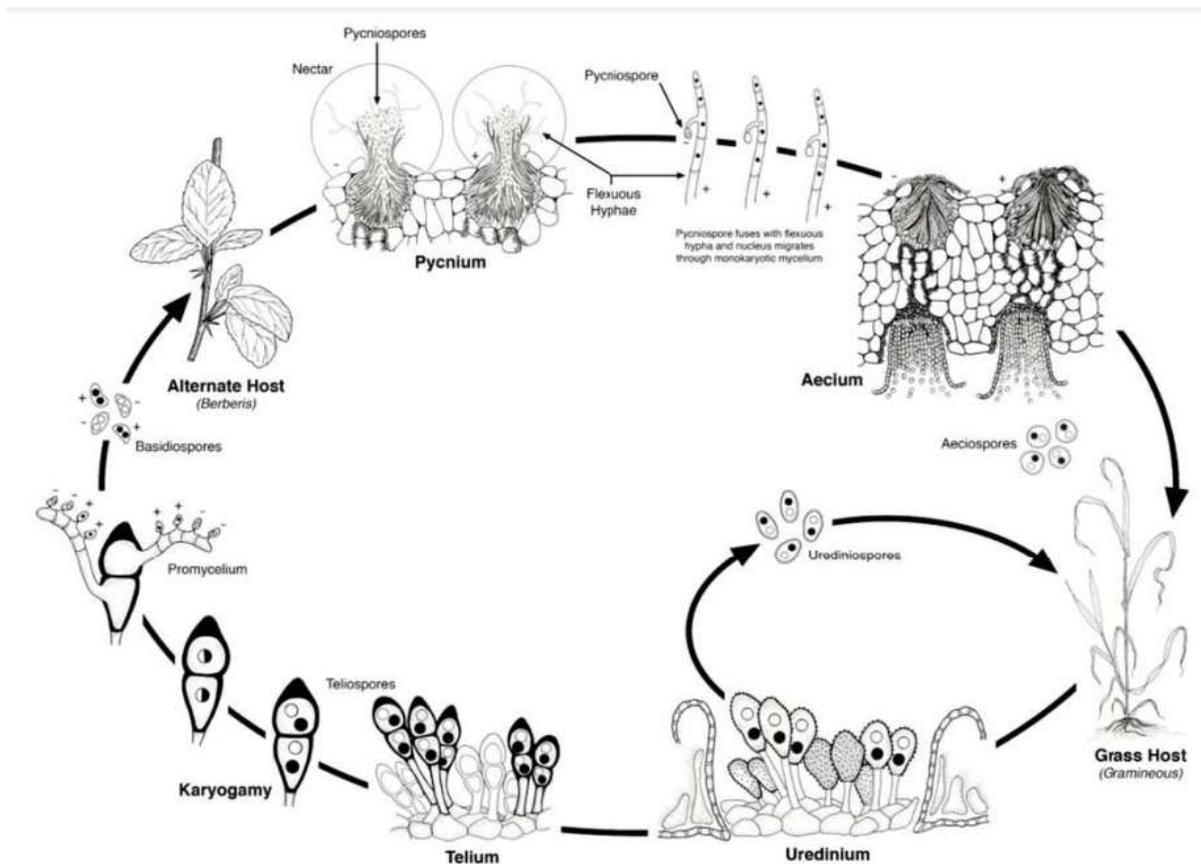


Figure 8 : Cycle de vie de *Puccinia recondita f. sp. Tritici*.
(Kolmer, 2013). Illustration originale de Jackie Morrison, USDA-ARS.

2. Les différents systèmes de défense des plantes.

Pour lutter contre ces menaces biotiques, les plantes ont développé un système complexe de défense immunitaire. Ces mécanismes de défenses peuvent être constitutifs ou bien induits par une reconnaissance de l'agresseur.

2.1. L'immunité basale comme moyen de lutte

2.1.1. Les défenses préformées

Les premières barrières auxquelles vont se confronter les pathogènes à leur arrivée sur la plante sont des barrières physiques tels que la cuticule des feuilles, la paroi des cellules qui vont limiter l'intrusion de pathogènes. Les plantes disposent également de barrières chimiques et produisent naturellement des métabolites secondaires antimicrobiens (Field et al., 2006; Morrissey and Osbourn, 1999).

Les défenses préformées jouent un rôle dans les résistances partielles aux champignons. Il s'agit de l'expression constitutive de gènes de régulation et de défenses et notamment les gènes PR (pathogenesis related) tels que des chitinases, glucanases, peroxidases, etc (Vergne et al., 2010). En effet, il a été montré que ces gènes sont exprimés de manière constitutive dans des tissus non infectés (Van Loon et al., 2006), et que cette expression constitutive varie en fonction des génotypes (Kliebenstein et al., 2006). Chez le riz par exemple, le niveau d'expression constitutif de ces gènes a été corrélé avec le niveau de résistance partiel à *Magnaporthe oryzae* (Vergne et al., 2010) et chez le blé contre la septoriose (Ors et al., 2018).

2.1.2. Les défenses induites non spécifiques

Contrairement aux organismes vivants du règne animal, les plantes n'ont pas de système circulatoire avec des cellules immunitaires mobiles (anticorps). En revanche, elles disposent d'une multitude de récepteurs localisés dans la membrane plasmique de leurs cellules pour détecter du non-soi et transmettre un signal d'alerte afin de déclencher une réponse immunitaire. Ces récepteurs aussi appelés des PRR (Pattern Recognition Receptors) reconnaissent des motifs moléculaires conservés. Dans le cas de microbes on parle de MAMPs (microbe-associated molecular patterns) et de PAMPs dans le cas de pathogènes (pathogen-associated molecular patterns) (Yu et al., 2017). Tous ces PRR font partie de la famille des « récepteurs de type kinase » (RLK - Receptor Like Kinase), soit des « récepteurs de type protéine » (RLP - Receptor Like Protein) (Zipfel, 2014; Couto and Zipfel, 2016; Tang et al., 2017; Saijo et al., 2018). Lorsqu'un PRR se lie à un PAMP ou MAMP, il transmet alors un signal vers l'intérieur de la cellule (figure 9). Il va initier l'afflux d'ions calcium (Ca^{2+}) dans la cellule. Ce changement de concentration est perçu par des protéines senseurs (McAinsh and Hetherington, 1998) telles que les calmodulines (CaM) et les calmodulines binding proteins (CaMBPs) (Poovaiah et al., 2013). Certaines régulent positivement ou négativement la synthèse d'acide salicylique (SA) (Wang et al., 2009) essentiel dans les défenses de la plante. D'autres contribuent à déclencher la mort cellulaire pour bloquer la progression du pathogène en induisant la production d'oxyde d'azote (NO) (Hong et al., 2008) et d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Harding et al., 1997; Neill et al., 2002). Tout comme les CaM, les Ca^{2+} -dependent protein kinase (CDPK) et les calcineurin B-like proteins (CBLs) interviennent dans la signalisation d'hormones, de ROS et d'expression de gènes PR pour réguler les réponses de défenses de la plante (Romeis et al., 2001; Kurusu et al., 2010; Schulz et al., 2013; de la Torre et al., 2013).

Le signal transmis suite à la reconnaissance d'un PAMP va induire aussi directement la production de ROS en activant la NADPH oxydase (RBHOD) (Saijo et al., 2018) et l'activation d'une cascade de protéines kinase activée par un agent mitogène (MAPK) (figure 9B). Cela va entraîner la synthèse de phytoalexines (petites molécules phytochimiques aux propriétés antibiotiques) et la surexpression de gènes de

défense (PR) de type chitinase, β -glucanase et peroxydase pour bloquer et dégrader l'envahisseur (Couto and Zipfel, 2016; Tang et al., 2017).

Toute cette succession d'évènements découlant de la reconnaissance d'un PAMP représente la PTI (PAMP triggered immunity) (Jones and Dangl, 2006).

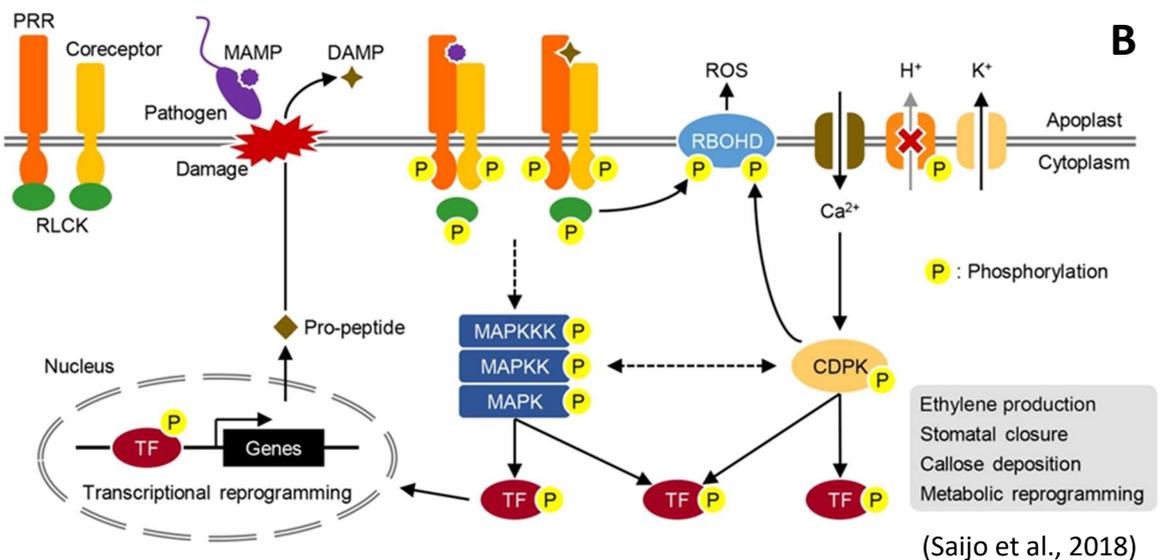
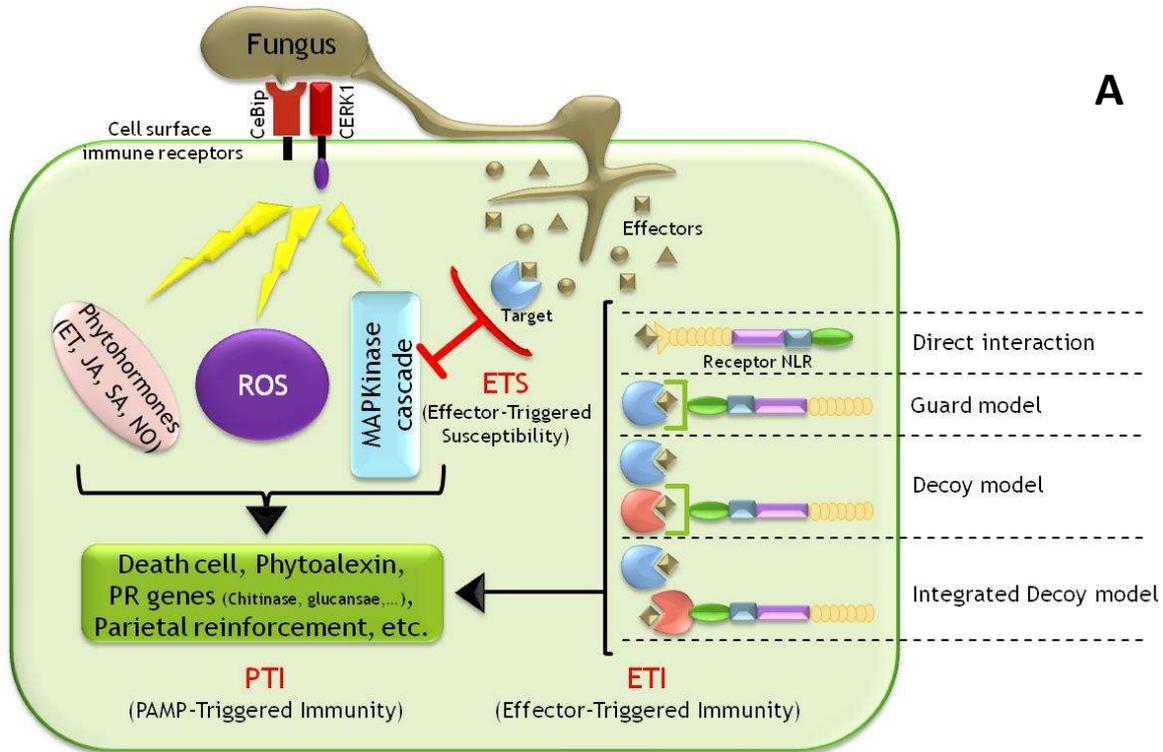


Figure 9 : Schématisation des mécanismes de la PTI et de l'ETI.

(A) Aperçu global PTI et de l'ETI. La détection d'un champignon phytopathogène par des récepteurs à la chitine *CERK1* et *CeBIP* induit un signal générant la réaction de la PTI. En réponse, le champignon produit des effecteurs pour bloquer la PTI. La détection de ces effecteurs par différents types de récepteur induit chez la plante la réaction d'ETI. **(B)** Aperçu schématisé de la PTI. La reconnaissance des MAMP/DAMP

par les PRR implique phosphorylation/déphosphorylation des co-récepteurs et des RLCK et une transphosphorylation au sein des complexes PRR pour initier la signalisation en aval. Ces signaux sont transmis via des cascades de MAPK et des CDPK vers les cibles en aval telles que la NADPH oxydase (RBOHD).

2.1.2.1. Récepteur à la chitine chez le blé

La chitine est un composant majeur de la paroi des champignons et ce composé est naturellement absent chez les plantes (Sánchez-Vallet et al., 2015b). La chitine est ainsi un PAMP idéal et elle est le principal déclencheur de la PTI lors de l'attaque d'un champignon phytopathogène. Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine récepteur de la Kinase 1 de l'éliciteur chitine *CERK1* (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1) la reconnaît, via ses 3 motifs de lysine (LysM) qui lient la chitine (Miya et al., 2007), et transduit le signal de la reconnaissance dans la cellule (Shinya et al., 2012). En revanche chez le riz, un deuxième élément, la protéine de liaison de l'éliciteur chitine *CEBiP* (Chitin Elicitor Binding Protein) possédant également un domaine LysM, est nécessaire pour la perception de la chitine et de sa signalisation (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010). Chez le blé, notamment lors de l'interaction blé / *Z. tritici*, l'association *CERK1* et *CEBiP* a été décrite comme étant nécessaire et responsable de la détection de la chitine et de la transduction du signal de reconnaissance à la cellule (Lee et al., 2014; Tian et al., 2021).

2.1.2.2. Régulateur des défenses, facteur de transcription *bZIP*

Comme on l'a vu précédemment, la perception d'un stimulus de stress par des récepteurs membranaires génère un signal qui va provoquer la production de messagers secondaires (ROS, Ca²⁺, phytohormones, ...). L'augmentation rapide de ces molécules va activer des voies de signalisation (MAPK et CDPK). A la fin de ces cascades, les facteurs de transcription sont activés ou supprimés par des kinases ou phosphatases. Ils vont se lier sur des régions cis des promoteurs de gènes de réponse au stress détecté pour en réguler leur transcription (Mitsuda and Ohme-Takagi, 2009; Hernandez-Garcia and Finer, 2014).

La plupart des facteurs de transcription (FT) impliqués dans la défense appartiennent à la classe des AP2/ERF, MYBs ou encore les WRKY (Liu et al., 2004; Eulgem, 2005). Les facteurs de transcription de type *bZIP* (Basic Leucine Zipper Domain) regroupent une grande famille de gènes chez le blé.

Des gènes de la famille des *bZIP* ont été montrés chez le riz, le poivre, la vigne et la tomate comme étant des régulateurs dans plusieurs pathosystèmes (Lee et al., 2002; Umemura et al., 2003; Okada et al., 2009; Orellana et al., 2010; Tak and Mhatre, 2013) mais aussi comme pouvant être impliqués dans la tolérance à la sécheresse (Okada et al., 2009; Orellana et al., 2010; Tak and Mhatre, 2013; Xuan et al., 2016).

Des analyses au laboratoire (Gobbato et al, non publié) ont permis d'identifier un facteur de transcription *bZIP* (TabZIP60 / AK330972) impliqué dans la réponse immunitaire à différents champignons (RB, STP, SNB, FHB (Fusarium Head Blight = Fusariose de l'épi)). Ce facteur de transcription pourrait donc agir au cours de l'activation du système de défense chez le blé lors d'une infection fongique et participer à son contrôle. Différentes études récentes ont montré l'implication de ce gène et d'un transcrit alternatif de ce gène, dans l'augmentation du rendement en grain dans le blé (Yang et al., 2019) et dans la tolérance à différents stress abiotiques chez *A. thaliana* y compris à la sécheresse (Zhang et al., 2015; Geng et al., 2018).

2.1.3. Les défenses induites spécifiques

Les agents pathogènes, en évoluant, sont capables de s'adapter et de réprimer ce premier niveau de défense en sécrétant de petites protéines, des effecteurs (Göhre and Robatzek, 2008; Gimenez-Ibanez et al., 2009; Zhang and Zhou, 2010) qui sont des armes moléculaires leur permettant de neutraliser les voies de défense de la plante ou de détourner son métabolisme à son profit. Ce contournement de la PTI est défini comme l'ETS (Effector-Triggered Susceptibility) (Jones and Dangl, 2006)(figure 9A). Par exemple, plusieurs champignons pathogènes sécrètent des effecteurs contenant des domaines LysM. Ils se lient à la chitine avec une plus grande affinité que *CERK1* et *CEBiP* ce qui interfère avec la PTI induite par la reconnaissance de la chitine. C'est le cas de l'effecteur Ecp6 produit par *Cladosporium fulvum*, agent pathogène de la tomate (de Jonge and Thomma, 2009; Jonge et al., 2010; Mentlak et al., 2012; Sánchez-Vallet et al., 2013). L'homologue de Ecp6 a été trouvé chez *Z. tritici* (STB). Il s'agit de Mg3LysM qui est capable de lier la chitine mais aussi de protéger les hyphes fongiques des chitinases de la plante (Marshall et al., 2011; Kettles and Kanyuka, 2016).

Ce contournement de la PTI ne signifie pas forcément que le champignon l'emporte. En effet, la plante possède un second niveau de défense, bien plus spécifique que la PTI. Elle dispose de protéines de résistance (R) (Jones and Dangl, 2006) qui vont reconnaître la présence des effecteurs du champignon. Ces effecteurs reconnus prennent alors le nom de protéines d'aviorulences (Avr), ils activent une résistance dite ETI (Effector-Triggered Immunity). L'induction de l'ETI provoque la même signalisation et la même réponse que la PTI (figure 9) mais son pic est plus rapide et plus intense (Jones and Dangl, 2006; Tsuda et al., 2009; Tsuda and Katagiri, 2010) et on observe souvent une mort cellulaire programmée (HR) (Dodds and Rathjen, 2010). Le principe de la reconnaissance d'une protéine Avr par une protéine R est basé sur le modèle gène-pour-gène décrit par Flor (Flor, 1971). Actuellement, 4 modes de reconnaissance des effecteurs ont été mis en évidence et étudiés. Tout d'abord le modèle ligand-récepteur (Ellingboe 1981), le plus simple, où le récepteur se lie directement à l'effecteur. Ces récepteurs font partie le plus souvent de la famille des NB-LRR (Nuclear Binding Leucine Rich Repeat). Le modèle « de garde » (Dangl and Jones, 2001) est une reconnaissance indirecte. La protéine R reconnaît l'association de l'Avr à une protéine cible de l'hôte qui est le plus souvent une protéine de défense. Le modèle « Decoy » (Hoorn and Kamoun, 2008) une évolution du modèle de garde. Selon ce modèle, la plante produit un leurre (Decoy) sur lequel l'effecteur va venir se fixer et cette association est reconnue pour la protéine R. De ce fait, la protéine cible de la plante est libre (ou du moins, moins capté par l'effecteur) et peut jouer son rôle dans les défenses de la plante. Et enfin le modèle de « Bait and Switch » (Collier and Moffett, 2009) regroupe le modèle ligand-récepteur et le modèle de leurre. Dans le modèle, le leurre est intégré au récepteur et cela permet au récepteur de mieux reconnaître l'effecteur (figure 9).

Cette reconnaissance des effecteurs par la plante ne signifie pas que la plante gagne le combat pour autant. Car de chaque côté, il y a une pression de sélection qui vise à faire évoluer chaque partie pour échapper à la détection de l'autre. Cette course à l'armement est illustrée par le modèle en zigzag de (Jones and Dangl, 2006) (figure 10).

Ainsi, la résistance partielle ou la sensibilité de la plante face à l'attaque du champignon est le résultat d'une lutte mettant en jeu les défenses de la plante et les effecteurs du champignon.

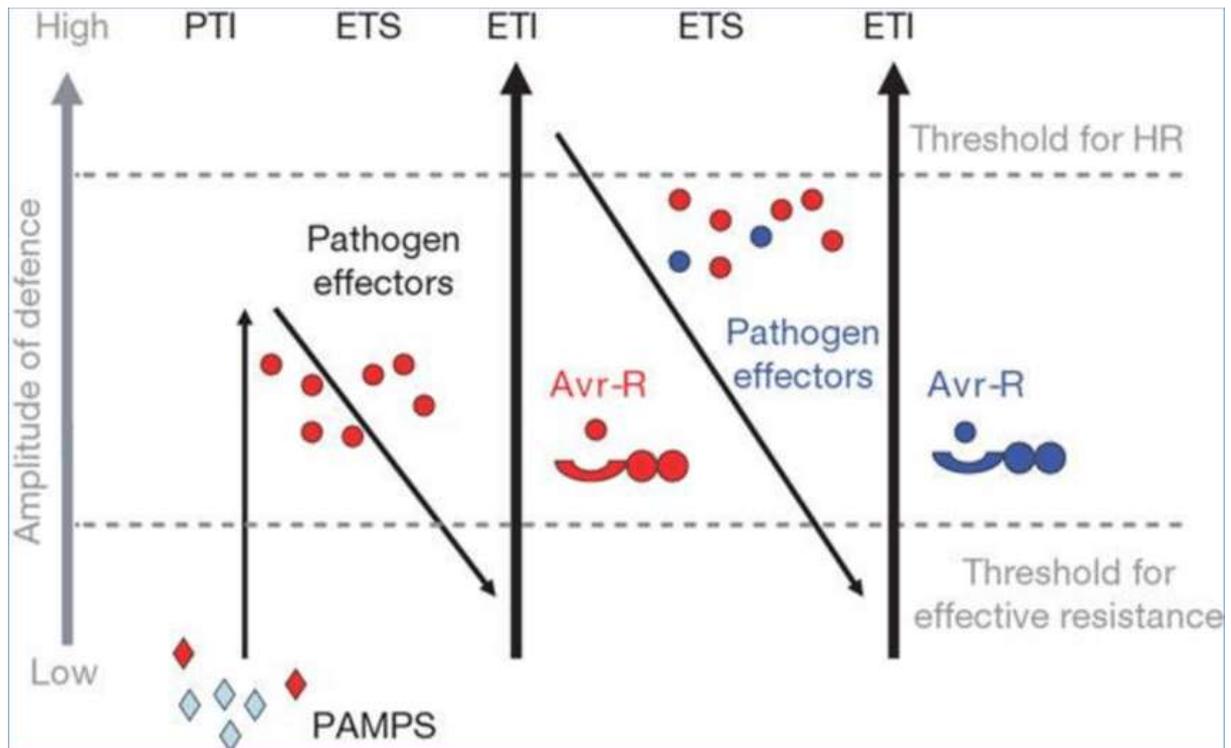


Figure 10 : Modèle en zigzag illustrant l'évolution du dialogue moléculaire entre une plante et un agent pathogène.

Dans ce schéma, l'amplitude de résistance ou de susceptibilité à la maladie est proportionnelle à PTI – ETS+ETI. Dans la phase 1, les plantes détectent les PAMPS (losanges rouges) via les PRR pour activer l'immunité déclenchée par PAMP (PTI). Au cours de la phase 2, les agents pathogènes fournissent des effecteurs qui interfèrent avec la PTI, ce qui entraîne une sensibilité déclenchée par les effecteurs (ETS). En phase 3, les effecteurs (ronds rouges) sont reconnus par une protéine NB-LRR, activant l'immunité déclenchée par l'effecteur (ETI). Dans la phase 4, des isolats d'agents pathogènes ayant perdu les effecteurs rouges et ayant gagné de nouveaux effecteurs (bleus) grâce au flux de gènes horizontal, sont sélectionnés car ils peuvent à nouveau supprimer l'ETI. Puis la sélection favorise les nouveaux allèles NB-LRR végétaux qui peuvent reconnaître l'un des effecteurs nouvellement acquis, déclenchant à nouveau l'ETI (Jones and Dangl, 2006).

2.2. Lutte génétique, recherche de QTL :

La lutte génétique, qui utilise le déploiement de variétés contenant des gènes de résistance, est une alternative aux fongicides souvent efficace pour lutter contre les maladies. Le blé présente essentiellement deux types de résistance à STB. La résistance qualitative est une résistance forte et est généralement contrôlée par des gènes majeurs avec un effet important. Elle suit un schéma de relation gène-pour-gène. Ces gènes sont efficaces contre les agents pathogènes avirulents c'est-à-dire des agents pathogènes qui ont le gène d'avirulence correspondant. Cependant, les agents pathogènes évoluent rapidement et contournent rapidement la plupart des résistances majeures utilisées. Il y a donc un besoin urgent de nouvelles sources de résistance pour le blé non seulement efficaces mais aussi durables.

La résistance quantitative, en revanche, a un phénotype partiel et peut être contrôlée par un ou plusieurs gènes avec des effets modérés à faibles. Dans la majorité des cas, elle est identifiée comme

étant contrôlée par plusieurs loci contenant des gènes expliquant une certaine part de la résistance observée, dénommés « Quantitative Trait Loci » (QTLs) et constitue une forme potentiellement durable de résistance (Roux et al., 2014). Cartographier des QTLs consiste à établir des probabilités d'association entre les positions de marqueurs distribués sur le génome (SNP, microsatellites, etc...) et les fréquences des caractères observés dans une population d'individus. Ainsi, dans le cas d'une analyse de la résistance du blé à un champignon, les individus d'une population seront d'une part génotypés avec des marqueurs disponibles, et d'autre part phénotypés pour quantifier leur niveau de résistance. Plusieurs méthodes peuvent alors être utilisées pour détecter les QTLs (Jansen, 1993; Zeng, 1994) mais toutes dérivent d'un principe commun consistant à rechercher un lien entre un (ou plusieurs) locus et un phénotype. Autrement dit, il s'agit de rechercher la ou les régions pour lesquelles le phénotype change en même temps que le génotype (Young ND, 1996). Il est à noter que les gènes majeurs de résistance sont aussi détectables par ces approches. Dans ce cas ils présentent généralement des scores de détection très élevés et des héritabilités fortes (l'héritabilité est un coefficient génétique qui exprime la relation entre la variance génotypique et la variance phénotypique).

Chez le blé tendre, au moins 21 gènes de résistance à *Z. tritici* ont été identifiés ainsi que 89 Meta-QTL (Brown et al., 2015). Mais très peu de ces marqueurs peuvent être utilisés pour la sélection de blé dur en raison de la spécificité d'hôte (Ghaffary et al., 2018). De plus, pour des raisons économiques, peu d'études sont menées sur la recherche de résistance chez le blé dur. En 2002, le gène majeur de résistance *Stb6*, retrouvé dans beaucoup de variété de blé tendre et conférant une résistance de type gène-pour-gène aux souches de *Z. tritici* possédant le gène d'avirulence *AvrStb6*, a été cloné et code pour un récepteur kinase (WAK)(Brading et al., 2002). Récemment, ce gène a été identifié sur le chromosome 3A du blé dur (Saintenac et al., 2018) mais l'avancée des recherches est loin d'approcher celles menées sur le blé tendre.

Dans le cas de la rouille brune (RB), les populations de pathogènes isolées sur le blé dur sont génétiquement différentes de celles isolées sur le blé tendre (Goyeau et al., 2012) et seuls douze gènes de résistance *LR* à la rouille brune sont efficaces sur le blé dur parmi les 68 gènes connus chez le blé tendre (Goutam et al., 2015; Aoun et al., 2016; Aktar-Uz-Zaman et al., 2017). Il est donc urgent, pour obtenir une résistance durable, de trouver de nouvelles sources de résistance dans des populations plus diversifiées de blé dur que les populations élites actuelles, en évitant d'utiliser uniquement des gènes majeurs de résistance *LR* car leur efficacité contre les isolats de rouilles brune est limitée dans le temps (Huerta-Espino et al., 2009; Goyeau et al., 2012).

3. Facteurs influençant l'immunité au champ

Au champ, il est couramment observé que des résistances partielles soient moins efficaces que prévu ou que des produits de biocontrôle soient peu efficaces. Une des raisons proposées pour expliquer ce manque d'efficacité est que les résistances variétales et le biocontrôle sont généralement étudiés au laboratoire, dans des conditions contrôlées hors d'autres contraintes abiotiques (Berens et al., 2019; Cohen and Leach, 2019; Gutiérrez et al., 2015; Nobori and Tsuda, 2019; Saijo and Loo, 2020). Or, au champ le blé dur est soumis à de multiples stress et notamment à la sécheresse.

3.1. Le biocontrôle

Les produits de biocontrôle sont définis dans le Code Rural et de la Pêche Maritime (CRPM) comme étant « des agents et produits utilisant des mécanismes naturels dans le cadre de la lutte intégrée contre les ennemis des cultures. Ils comprennent en particulier : les macro-organismes (invertébrés, insectes, acariens ou nématodes) ; les produits phytosanitaires soumis à AMM (Autorisation de Mise en Marché) et inscrits sur la liste officielle publiée par la DGAL (Direction Générale de l'Alimentation) comprenant des micro-organismes (champignons, virus et bactéries telles que les Actinomycètes), des médiateurs chimiques (phéromones, kairomones, ...) et des substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale. » (Légifrance.gouv.fr, 2020; Agriculture.gouv.fr, 2021). Parmi ces dernières on retrouve des substances naturelles à activité fongicide et également des substances dites SDP (Stimulation des Défenses des Plantes) telles que la chitine et le Bion.

3.1.1. La chitine

La chitine est un composant majeur de la paroi des champignons et constitue un PAMP reconnu par les plantes. Des études ont montré que la pulvérisation foliaire de chitine ou l'enrobage de graine permettait d'induire les défenses et de réduire les maladies fongiques (Jayaraj et al., 2009; Ziani et al., 2010; Trouvelot et al., 2014). Certains produits homologués à base de chitine peuvent également présenter une activité fongicide (ex Chitosan).

L'utilisation de la chitine pour stimuler les défenses des plantes n'est pas une idée nouvelle. De nombreuses études ont montré l'induction de la PTI par la chitine (Stacey and Shibuya, 1997; Shibuya and Minami, 2001; Shinya et al., 2015; Yin et al., 2016) mais des applications au champs n'en ont pas découlée car les polymères de chitine ne sont pas solubles dans la plupart des solvants organiques et inorganiques en raison de sa cristallinité élevée (Pillai et al., 2009). Ces études ont utilisé des oligosaccharides de chitine de faible poids moléculaire solubles dans l'eau car la chitine ne devient soluble dans l'eau qu'une fois qu'elle est dégradée ou modifiée chimiquement.

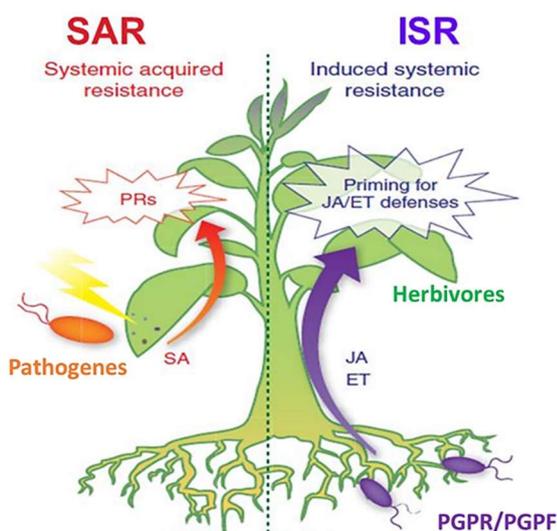
Cependant, l'utilisation de polymère de chitine de crabe ouvre de nouvelles perspectives. Les exosquelettes de crustacés sont constitués de nanofibres de chitine (CNF : Chitin NanoFiber) au même titre que dans la paroi des champignons où elles forment un complexe avec les glucanes. Les CNF sont solubles dans l'eau (Ifuku et al., 2011; Ifuku and Saimoto, 2012; Ifuku et al., 2013). Mimant mieux l'agression d'un champignon, les CNF ont une activité élicitrice du système de défense des plantes. Ils induisent la production de ROS, l'expression de gènes de défense et réduisent les symptômes d'agents pathogènes chez Arabidopsis et le riz (Egusa et al., 2015), mais aussi chez le chou, la fraise (Parada et al., 2018) et le blé (El-Gamal et al., 2020; Tian et al., 2021).

3.1.2. Les actinomycètes

Lorsque le biocontrôle utilise des organismes vivants, cela est considéré comme de la lutte biologique. Ces organismes peuvent être parasitoïdes (parasites vivants aux dépens d'un hôte qui meurt après leur développement), prédateurs (insectes, acariens, nématodes) ou bien pathogènes (virus, bactéries, champignons). Les mécanismes par lesquels les microorganismes contrôlent le développement des

maladies relèvent soit de l'antagonisme direct impliquant une interaction entre l'agent protecteur et l'agent pathogène, soit d'un antagonisme indirect se manifestant à travers les réactions de défense de la plante. Parmi les formes d'antagonisme direct, il est habituel de distinguer la compétition (pour les éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), l'antibiose et le parasitisme. La compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lorsqu'il y a simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganismes (Singh, 2014). La compétition a aussi lieu pour la colonisation de la surface racinaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (Jijakli and Lepoivre, 2003). Elle consiste en la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène (Corbaz R, 1990). Le parasitisme consiste quant à lui, en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy and Holmes, 2005).

L'antagonisme indirect passe par la stimulation des défenses de la plante. Les réponses de défense non spécifiques (c'est-à-dire à spectre d'action large) sont de deux types: la résistance systémique induite (ISR) induite par les rhizobactéries et autres agents du sol et la résistance acquise systémique (SAR) induite par des agents pathogènes et médiée par la phytohormone SA (Pieterse et al., 2009; Schuehlegger et al., 2006; Pieterse et al., 2014) (figure 11).



(Pieterse et al., 2009)

Figure 11 : Induction de défense de type ISR et SAR chez la plante.

SAR : les nécroses dues à un agent pathogène induit la production de protéines PR (pathogenesis-related proteins) qui vont agir directement sur le pathogène, des ROS (reactive oxygen species) qui vont entraîner une mort cellulaire locale, et du SA (acide salicylique qui va servir de voie de signalisation d'induction des défenses (notamment les gènes dépendants de la voie SA) dans toute la plante. ISR : les lésions causées par les insectes herbivores ainsi que les certains micro-organismes du sol, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et les PGPF (Plant Growth Promoting Fungi) vont induire la production de protéines PR et des phytohormones JA (acide jasmonique) et ET (éthylène) qui vont conduire dans toute la plante l'induction des défenses (gènes de défenses dépendants de JA/ET).

Une quinzaine d'espèces de bactéries et de champignons ont été homologuées en juillet 2019 sur la liste de biocontrôle contre les maladies (Ecophytophic.fr, 2021). Il s'agit principalement de souches de champignons du genre *Trichoderma* et des souches de bactéries du genre *Bacillus* (Omara et al., 2019). Ces champignons et bactéries du sol induisent l'ISR chez les plantes. Chez le blé, quelques études montrent l'efficacité de bactéries du genre *Bacillus*, *Clonostachys* et *Streptomyces* pour lutter contre la fusariose de l'épi (Nourozian et al., 2006; Palazzini et al., 2007; Xue et al., 2009). Une étude avec des essais au champs a pu montrer un important retard de développement de la septoriose causée par *Z. tritici* grâce à une souche de *Bacillus* (Kildea et al., 2008). Pour cette même maladie, l'enrobage de graine avec une souche de *Trichoderma* a montré des résultats très encourageants au champs en Argentine (Perello et al., 2009).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif très répandues dans le sol. Elles ont la capacité de coloniser les plantes et d'induire la ISR contre les pathogènes (Pal and McSpadden Gardener, 2006). L'ISR entraîne l'épaississement des parois cellulaires des plantes et l'altération des réactions métaboliques des plantes, ce qui entraîne une augmentation des produits chimiques de défense des plantes (Singh, 2014). *In vitro*, les Actinomycètes produisent des métabolites secondaires permettant de réduire la croissance des champignons en co-culture (Cuesta et al., 2012). L'induction de la résistance des plantes par les bactéries *Streptomyces* diffère de l'ISR traditionnel, produit par exemple par les bactéries *Pseudomonas* et *Bacillus* qui n'induisent pas la transcription des protéines PR (Pal and McSpadden Gardener, 2006). En effet, les *Streptomyces* ont la particularité de pouvoir induire l'ISR et la SAR, ainsi que faire la connexion entre diverses voies de signalisation phytohormonale (Conn et al., 2008; Newitt et al., 2019). Certaines souches de *Streptomyces* ont la capacité de stimuler la réponse immunitaire des plantes, ainsi que d'augmenter la taille des plantules et des racines (Salwan and Sharma, 2018). Ces effets favorisant la croissance des plantes liés aux interactions *Streptomyces*-plante peuvent être divisés en biofertilisation, biostimulation et bioprotection. La biofertilisation améliore l'acquisition de nutriments, la biostimulation est associée à la production de composés métaboliques à activité phytohormonale et la bioprotection consiste à minimiser l'impact des champignons pathogènes (Sousa and Olivares, 2016).

Le genre *Streptomyces* est l'une des Actinobactéries les plus étudiée en raison de sa capacité à produire des enzymes et des métabolites secondaires. Les *Streptomyces* sont connues pour leur mécanisme antagoniste envers les champignons phytopathogènes tels que : l'antibiose qui est dû à la production de molécules fongicides et d'enzymes de dégradation (chitinases, glucanases) ; la compétition pour l'espace et les ressources (carbone, azote) ; et le parasitisme (Palaniyandi et al., 2013; Vurukonda et al., 2018). Actuellement, deux formulations à base de spores et de mycélium déshydratés de *Streptomyces* sont commercialisées comme fongicides biologiques contre des pathogènes fongiques du sol (*Fusarium*, *Pythium* et *Phytophthora*, entre autres). Actinovate® (*Streptomyces lydicus* souche WYEC108), commercialisé au Canada et aux USA, est recommandé pour des applications directement dans le sol, pour de l'enrobage de graines mais aussi pour une pulvérisation foliaire. Mycostop® (*Streptomyces griseoviridis* souche K61), commercialisé au Canada, USA et en Europe, n'est recommandé que pour une utilisation dans le sol et l'enrobage de graines (Newitt et al., 2019).

3.2. Le stress hydrique

Pour faire face au stress dû à la sécheresse, les plantes ferment leurs stomates afin de garantir une turgescence optimale des cellules et de poursuivre leur métabolisme. La fermeture des stomates réduisant le taux de photosynthèse, les plantes doivent constamment ajuster la conductance stomatique afin de permettre une absorption suffisante de CO₂ tout en évitant les pertes d'eau en période de stress. Par conséquent, les plantes doivent détecter en permanence le déficit en eau. Parmi les régulateurs de la réponse au stress hydrique, la phytohormone ABA joue un rôle crucial dans la signalisation à différents niveaux, à savoir les modifications transcriptionnelles et la fermeture stomatique (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Cramer et al., 2011; Sreenivasulu et al., 2012; Prasch and Sonnewald, 2015).

Le stress dû à la sécheresse perturbe également les agents pathogènes, de manière positive ou négative selon les cas : par exemple, le traitement ABA (simulant la réponse à un stress abiotique comme la sécheresse) sur des plantes d'*Arabidopsis* provoque une augmentation des niveaux d'infection à la

bactérie *P. syringae* (Mohr and Cahill, 2003), tandis que le stress dû à la sécheresse augmente la résistance au champignon *Botrytis cinerea* chez la tomate (Achu et al., 2006). Par conséquent, il est difficile de généraliser les effets du stress hydrique combiné à un stress biotique (Sharma et al., 2013). Dans le cas du champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* et du riz, la réponse à la sécheresse et la résistance à la maladie sont des processus antagonistes (Bidzinski et al., 2016). Dans ce système, certains gènes majeurs de résistance ne fonctionnent pas en condition de sécheresse. Ce phénomène a été dénommé « Drought-Induced Susceptibility », ou DIS.

Projet de recherche

Chaque année, les agriculteurs accusent des pertes de rendement liées aux épidémies causées par des champignons phytopathogènes. Les pratiques les plus répandues pour limiter ces pertes sont l'utilisation de fongicides certes efficaces mais délétères pour l'environnement. L'alternative visée dans ce projet serait d'agir sur la plante plutôt que sur le pathogène. Un des moyens serait d'améliorer la génétique des variétés en trouvant de nouveaux gènes de résistance aux maladies. Un autre moyen serait de stimuler l'immunité basale de la plante via le biocontrôle avec l'utilisation de la chitine, composant la paroi de tous les champignons. La détection de la chitine mimerait pour la plante une attaque fongique, ce qui induirait le niveau des défenses préformées. La plante serait ainsi mieux « armée » lors d'une attaque ultérieure de champignon. Mieux comprendre le rôle des récepteurs de chitine (*CERK1* et *CeBIP*) pourrait participer à l'amélioration génétique du blé tout en aidant à une meilleure détection du champignon et à la stimulation des défenses. Une autre piste de biocontrôle serait l'emploi de souche de *Streptomyces*. Actuellement on dispose encore d'assez peu de souches de biocontrôle efficaces sur les différentes maladies foliaires du blé dur et on ne comprend pas toujours bien les interactions entre ces souches, la plante et l'agent pathogène.

Trouver de nouvelles résistances ou stimuler l'immunité par biocontrôle est une chose mais il faut aussi prendre en compte les facteurs climatiques et environnementaux. En effets, on ignore l'impact que peut avoir l'environnement abiotique sur l'immunité du blé dur et la sécheresse notamment pourrait représenter un facteur de risque perturbateur de cette immunité.

Les objectifs de ce projet sont donc :

- Identifier de nouvelles résistances (recherche de QTL de résistance et caractérisation des récepteurs de la chitine).
- Induire la résistance par du biocontrôle (utilisation la chitine comme SDP et les *Streptomyces* comme lutte biologique).
- Vérifier la robustesse de la résistance ou de l'immunité sous contrainte hydrique.

Le but de ces différents objectifs est d'acquérir une vision d'ensemble des différents moyens de lutte du blé dur face aux agents pathogènes.

Matériels et méthodes

1. Variétés de blé :

- Panel de 280 lignées de blé dur :

Ce panel est composé de 180 lignées issues de la population dites EPO (Evolutionary Pre-breeding pOpulation) (David et al., 2014). EPO est une population de blé tétraploïde d'une grande diversité génétique fondée en 1997 et évoluant depuis avec un taux de croisement de 10%, maintenue artificiellement par une proportion gérée de plantes mâles stériles dans la population (David et al., 2014). Sa grande diversité génétique provient du croisement artificiel, lors de la première génération, d'accessions de plusieurs sous-espèces de *Triticum turgidum* (sous-espèces *dicocoides*, *dicocum*, *turgidum*, *polonicum*, *carthlicum*, *durum*). En 2009, un ensemble de 180 lignées ont été choisies, puis ces 180 lignées ont été fixées par 5 générations de descendance à une seule graine (David et al., 2014). Ce sont ces 180 lignées qui sont utilisées dans ce projet. Les 180 lignées ont toutes été génotypées par l'équipe partenaire du projet dans l'UMR AGAP.

A ces 180 lignées EPO s'ajoutent 100 lignées dites « élites » qui sont ou ont été cultivées. 50 variétés sont issues du catalogue français et 50 variétés issues du panel « Tuberosa » qui regroupe des blés durs d'origine mondiale créé par Roberto TUBEROSA (Université de Bologne).

- Lignées de blé tendre mutantes :

Grâce à un partenariat (K. Kanyuka, Rothamsted Research Institute, UK), nous disposons de lignées de blé tendre RNAi réduisant l'expression de 2 gènes récepteurs à la chitine (*CERK1* et *CeBIP*). Ces mutants stables ont été créés par insertion d'une cassette RNAi par transfection de cals. Nous disposons également de lignées homozygotes (Ho) leur ségrégant nul (NS), sur-exprimant (OX) et sous-exprimant (RNAi) l'expression du gène *bZIP* grâce à notre partenaire Biogemma.

2. Matériel fongique et méthodes d'inoculation :

Dans ce projet, 3 champignons responsables des principales maladies foliaires du blé sont utilisés :

- ***Puccinia recondita f. sp. tritici***, agent responsable de la rouille brune que j'ai isolé en 2015 (souche nommée RB15) sur blé dur (variété Pescadou) dans la région de Montpellier. L'inoculation est réalisée par pulvérisation sur feuille d'une solution contenant de la gélatine à 0,5%, 1% de Tween 20 et de 8 mg de spores pour 150 plantes. Le niveau quantitatif de sensibilité a été enregistré dix jours après l'inoculation en utilisant une analyse d'image pour évaluer le pourcentage de surface foliaire avec des pustules à l'aide des outils d'analyse d'images LeafTools (<https://github.com/sravel/images>). Les plantes témoins seront inoculées avec une solution d'eau et gélatine 0,5%.

- ***Zymoseptoria tritici***, agent de la septoriose. J'ai isolé la souche P1a en 2015 sur blé dur dans la région de Montpellier sur la variété Pescadou. Pour l'inoculation, une section de 7,5cm au milieu de la dernière feuille ligulée est mouillée avec 6 passages à l'aide d'un pinceau trempé dans une solution de spores (10^6 spores /ml) additionnée de 1% de Tween[®]20. Trois semaines après l'inoculation, la surface nécrosée et la surface comportant des pycnides (structures reproductrices) est estimée manuellement par rapport à la surface inoculée en pourcentage. À partir de ces paramètres, la mesure de la nécrose

indique la composante quantitative (agressivité) de la virulence du champignon sur la plante hôte et le ratio surface pycnides / surface nécroses indique la sévérité, c'est-à-dire la capacité du champignon à se reproduire sur la plante hôte pour potentiellement aller attaquer d'autres plantes par la suite. Les plantes témoins sont inoculées avec une solution d'eau et Tween®20 à 1%.

- *Parastagonospora nodorum*, autre agent de la septoriose. La souche 15017 utilisée, est issue d'une collaboration avec l'UMR BIOGER (INRAE Versailles-Grignon). L'inoculation se fait de la même façon que pour *Z. tritici* ainsi que la mesure de la surface nécrosée sur la surface inoculée. Les plantes témoins sont inoculées avec une solution d'eau et Tween®20 à 1%.

3. Les différents traitements :

3.1. Application de *Streptomyces* dans le sol ou sur les feuilles de blé

Les souches utilisées m'ont été fournies par l'UMR QualiSud (Université de Montpellier). L'espèce de ces souches est indéterminée pour le moment. Leur génome est en cours de séquençage pour répondre à cette question. Seule l'espèce de la souche du produit commercial Mycostop® est identifiée comme étant *S. griseoviridis*. La figure 12 représente les schémas expérimentaux réalisés pour tester l'effet de souches de *Streptomyces* sur les symptômes des maladies RB, SNB, STB et les défenses basales de la plante via une application dans le sol ou sur les feuilles. Dans ces deux expériences, un lot identique de plantules est inoculé (dans la terre ou sur les feuilles) avec de l'eau afin de servir de condition témoin.

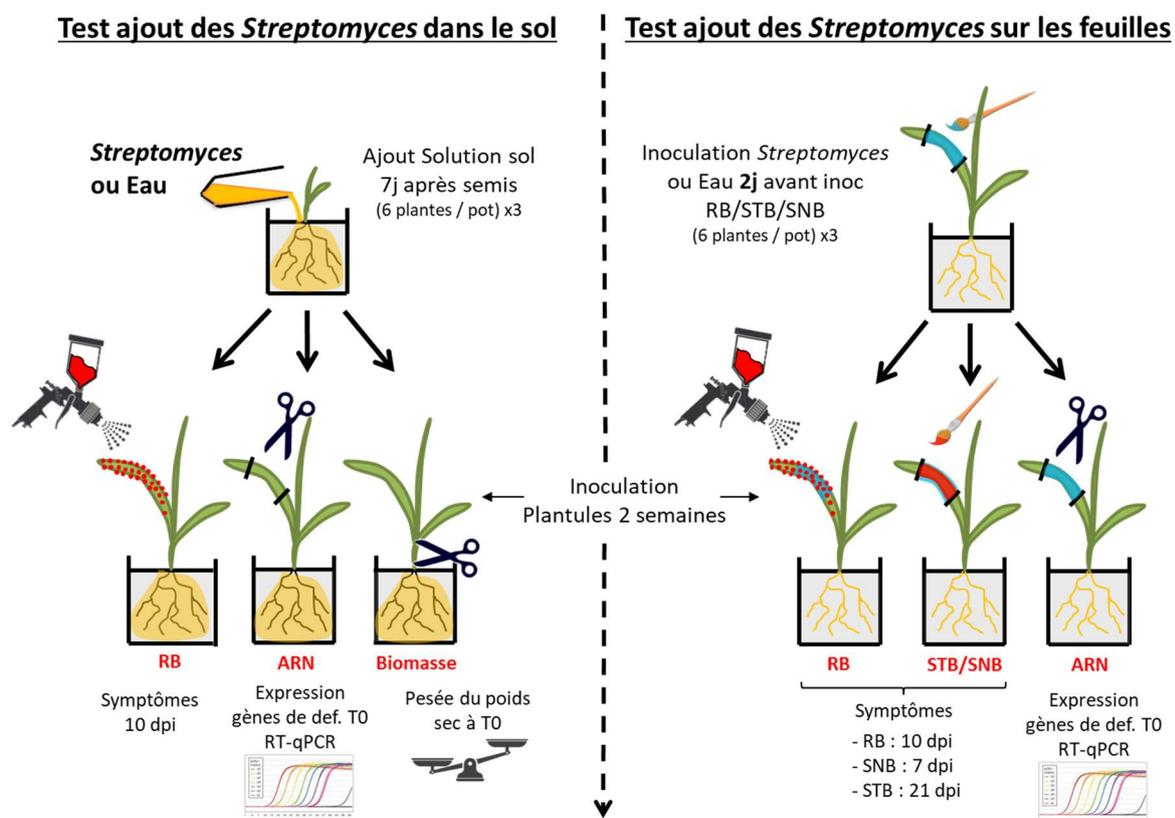


Figure 12 : Schémas expérimentaux pour tester l'effet de souches de *Streptomyces* sur les symptômes des maladies RB, SNB, STB et les défenses basales de la plante via une application dans le sol ou sur les feuilles.

3.2. Pulvérisation d'une solution de chitine sur les feuilles de blé

Chaque plateau de plantules (environ 120 plantes âgées de deux semaines) est pulvérisé avec 30ml d'eau et de gélatine 0,5% contenant 100 µg/ml de chitine selon un protocole déjà établi (Cruz et al., 2011). Les prélèvements ARN ou les inoculations de champignons se font 4 heures après le traitement par la chitine (figure 13). Un second lot de plantules, identique à celui-ci, est pulvérisé avec une solution d'eau et gélatine 0,5% et sert de condition témoin.

3.3. Génération d'un stress hydrique

Suite à l'inoculation de pathogènes, les plantes sont placées en condition saturante en humidité afin de permettre aux spores de germer et de pénétrer la surface des feuilles. A la fin de ce traitement (une nuit pour RB et 3 jours pour STB et SNB), les plantes sont transférées dans un plateau sec avec une hygrométrie normale et cessent d'être arrosées pendant 3 jours pour RB et 4 jours pour STB et SNB (car les plantes sont dans des pots un peu plus grands à cause de leur mode d'inoculation). A la fin de ce stress, les plantes sont de nouveau arrosées jusqu'à la lecture des symptômes (figure 13). Un second lot de plantules, identique à celui-ci, ne subit pas de stress hydrique et sert de condition témoin.

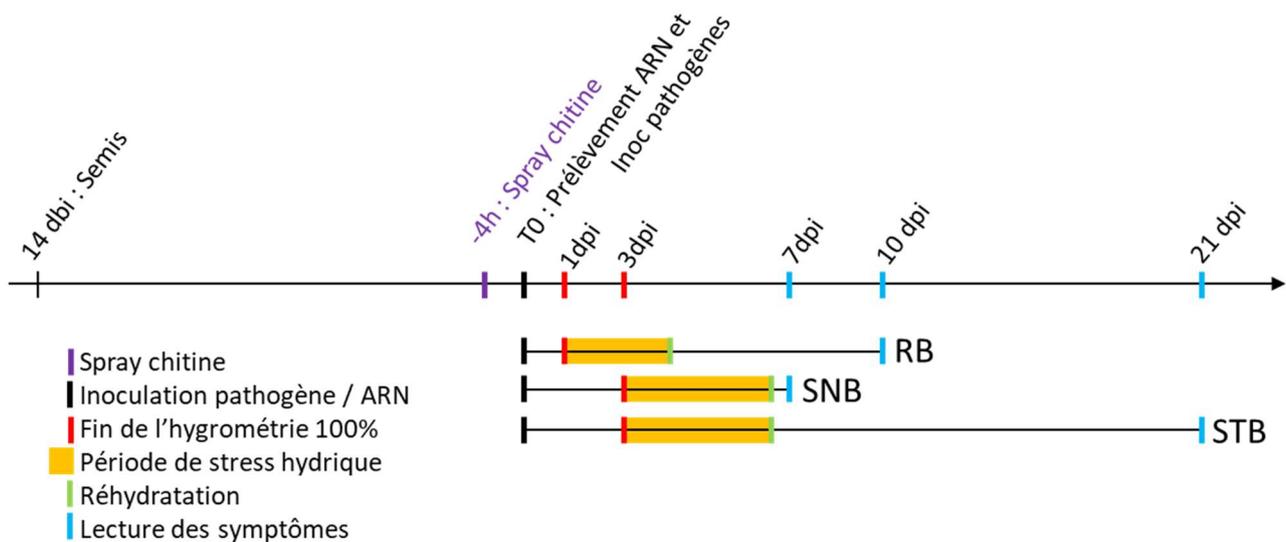


Figure 13 : Chronologie des expérimentations testant l'effet d'un spray chitine ou d'un stress hydrique sur les symptômes des maladies RB, SNB et STB.

4. Biologie moléculaire

4.1. Plant direct PCR

Le kit « Phire™ Plant Direct PCR Kit » de chez Thermo Fischer™ permet d'amplifier l'ADN de végétaux par PCR sans avoir à faire une extraction d'ADN. 5 poinçons de feuilles de blé de 0,5mm de diamètre sont placés dans 20µL de tampon de dilution et mélangés par aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette. 0,5µL de cette infusion servent de matrice au volume réactionnel final de 20µL comprenant

également 10µL de tampon 2X Phire Plant PCR Buffer, 1µL de chaque amorce à 10µM, 0,4µL de Phire Hot Start II DNA Polymerase et 7,1µL d'eau. La PCR est réalisée dans un thermocycleur selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 5 min à 98°C, suivi de 40 cycles à successivement 5sec à 98°C, 5 sec à 60°C, 20sec à 72°C, puis une élongation finale de 1min à 72°C. L'amplification est révélée sur gel d'agarose 1%.

4.2. Extraction d'ADN de blé

L'extraction d'ADN se fait à partir de feuilles de blé coupées dans un tube 2ml contenant 2 billes d'acier puis plongées dans de l'azote liquide puis broyées. 750µL de tampon CTAB est ajouté au broyat suivi d'une incubation de 45min à 65°C. Après centrifugation (5min à 13000g) le surnageant (500µL) est transféré dans un nouveau tube. Les acides nucléiques sont retenus dans la phase aqueuse grâce au mélange avec 450µL de dichlorométhane-IAA (24 :1). L'ARN est dégradé par une incubation du surnageant 20min à 37°C en présence de RNaseA (5µL à 10mg/mL). Puis l'ADN est précipité avec une solution d'isopropanol 100% (0,8 volume). Après centrifugation le culot obtenu est rincé avec de l'éthanol 70% puis séché et resuspendu dans 50µL d'eau.

4.3. Extraction d'ARN, préparation d'ADNc et qPCR :

L'ARN total a été isolé en utilisant le TRI-Reagent™ (Euromedex) (équivalent du TRIzol™) puis traité avec de la DNase I (Invitrogen) selon les instructions des fabricants. La qualité et la quantité de l'ARN isolé sont contrôlées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop® ND-2000 (NanoDrop Technologies). L'intégrité des échantillons d'ARN a également été vérifiée sur un gel d'agarose à 1%. L'ADNc a été synthétisé à partir de 5µg d'ARN total dans un volume réactionnel de 20µl avec le kit MMLV-RT (Promega) selon les instructions du fabricant. Les réactions de PCR quantitative sont réalisées dans un volume réactionnel de 8µl contenant 2µl d'ADNc dilués au 1/10 ; 0,24µl d'un mix d'amorces sens et antisens à 10µM chacune ; 4µl de Master 2x Sybr Green (Promega) ; 1,76µl d'eau ultra pure. La PCR en temps réel est effectuée en plaque 384 puits dans un LightCycler®480 (Roche) selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, suivi de 45 cycles à successivement 10sec à 95°C et 20 sec à 60°C, puis une rampe de dénaturation de 60°C à 95°C avec un incrément de 0,5°C. Le logiciel lié à la machine détermine le ratio entre la fluorescence détectée dans l'échantillon X du gène d'intérêt par rapport à la fluorescence détectée dans le même échantillon pour le gène de référence (gène à expression constitutive). Les gènes d'intérêts sont la chitinase I, la β-glucanase II, la noduline, la PR4 (pathogenesis-related 4), la chitinase IV (Chi4), la peroxydase (POX) et la lipoxygénase (LOX) car il a été montré dans le laboratoire que ces gènes étaient induits lors d'infections par des champignons, et le gène constitutif est l'ubiquitine. Trois gènes de tolérance à la sécheresse ont également été utilisés dans ce projet (aWLIP19, TaMYB33 et TaDREB2b). Les séquences et conditions d'utilisation de ces gènes sont indiquées dans le tableau 1.

Gène	Séquence sens	Séquence anti-sens	Concentration finale	Efficacité
ChitinaseI	TGCGCTACTGCAGCATACTC	ACCATACGAATCAACTGATCACA	300nM	1,836
PR4	ATAAAAGGCTAGCTAAAAGTAAGTTGA	TTGAATAGATAACCCGTTTGG	300nM	1,883
Noduline	GCCGGTTGCACGAGTAAA	TTACGAAAAGCGGAAGAGGA	300nM	1,848
b_Glucanase	TGCGGCATCCAAGTGTAAC	CTGCTTCATCTCTTTATTCATCA	300nM	1,896
PAL	CCCCATTGGTGTCTCCAT	ACTGCGCGAACATCAGCTT	600nM	2,024
LOX	GGGCACCAAGGAGTACAAGGA	GCTCGTGATGGTGTGGATGA	600nM	1,941
POX	GAGATTCCACAGATGCAAACGAG	GGAGGCCCTTGTTTCTGAATG	600nM	2,067
Chi4	TTCTGGTTCTGGATGACCAAC	ACTGCTTGCACTACTCCGTG	600nM	1,815
Ubiquitine	CTGGCGAGGATATGTTCCAT	TCGGATGGAAGACCTTTGTC	600nM	2,000
aWLIP19	GGATGCTGTCCAACAGGGAG	GTCAGCTCGGTCGTGTAGG	600nM	1,75
TaMYB33	TCCATGCCAGTGTCTCACC	TCATTGCCAGTGTCTCCGAC	600nM	1,829
TaDREB2b	CTCTGAAACGATCAGGCGATGG	GTGTATTCTCAGGTCCTCCTTCC	600nM	1,928

Tableau 1 : Séquences et conditions d'utilisation des différents gènes utilisés dans ce projet.

5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques et représentations graphiques des résultats ont été réalisées avec R Studio. Les principaux packages utilisés sont : car, DescTools, dplyr, ggplot2, ggpubr, ggsignif, multcomp, nparcomp, plyr, pscl, rstatix, stats.

Avant toute analyse, la distribution de chaque jeu de données est évaluée afin de déterminer si les données suivent une loi Normale ou une loi de Poisson. Mes données suivent souvent une loi de Poisson car pour la plupart, il s'agit de données de comptage bornées.

Pour les données normales avec un $n > 15$, les analyses statistiques sont paramétriques (modèle linéaire, comparaison de moyenne (Anova, Student) et test post-hoc (Tukey, Dunnett)). Lorsque « n » est petit ou lorsque la loi n'est pas Normale, alors les analyses statistiques sont non paramétriques (comparaison de médiane (Kruskal-Wallis, Wilcoxon) et test post-hoc de comparaisons multiples (Conover-Iman, Dunn ou Pairwise Wilcoxon, ou Tukey et Dunnett via le package « nparcomp »). Des modèles linéaires généralisés (GLM) sont également employés.

Résultats et discussion

Chapitre 1 : La lutte génétique.

1. Cartographie d'associations à l'échelle du génome (GWAS) pour la détection de résistances génétiques à RB et STB.

Les variétés élités de blé dur utilisées de nos jours sont issues de la domestication où est survenu un goulot d'étranglement génétique (Haudry et al., 2007) ce qui a laissé ces variétés avec moins d'allèles de résistance que les variétés sauvages ou primitives. Les populations croisées composites ont été proposées comme une alternative efficace pour remobiliser la diversité en croisant un grand nombre de parents et en permettant la recombinaison (Enjalbert et al. 2011). Ainsi, les lignées de blé dur EPO, issues d'une population de présélection évolutive, ont l'avantage d'être très diversifiées et peu structurées, ce qui en fait un panel idéal pour les analyses de GWAS (David et al. 2014). J'ai participé à la réalisation d'une publication de mon équipe (Ballini et al., 2020) utilisant le panel EPO dans une série de GWAS dans le but d'identifier des loci de résistance, potentiellement rares ou absents dans les populations domestiquées modernes, à quatre principaux agents pathogènes fongiques du blé dur (STB, SNB, RB et WB (Wheat Blast)). De plus, les associations avec la résistance à RB ont été évaluées à la fois avec et sans induction par la chitine, un inducteur de l'immunité, afin d'évaluer l'impact de ce traitement sur la résistance. Dans ce chapitre, je ne parlerai que des expérimentations que j'ai réalisées et des résultats auxquels j'ai contribué, à savoir la recherche de QTL de résistance à RB et STB.

1.1. QTLs de résistance à RB

Les 180 lignées EPO ont été criblées une première fois pour la résistance à RB par inoculation avec la souche RB15. Puis elles ont été criblées une seconde fois toujours avec la souche RB15 mais également avec un traitement chitine 4h avant l'inoculation du pathogène. Le but principal de cette seconde expérimentation était de détecter un QTL de défenses mais cela n'a pas été fructueux, le traitement chitine n'ayant pas d'effet significatif sur la variation des symptômes de RB (voir chapitre chitine). Nous avons identifié 4 QTLs dans la première expérimentation qui ont également été identifiés dans la seconde expérimentation (figure 14, encadrés bleus). L'identification de QTLs avec une deuxième expérimentation indépendante constitue une validation. Les 100 variétés élités dont nous disposons n'ont pas pu servir à une validation car, après criblage, aucune n'est résistante à RB. Le QTL (LR_6B11) avec le score d'héritabilité le plus élevé (0,49) se situe sur le bras court du chromosome 6B et a une taille de 3,24Mb. L'allèle de résistance de LR_6B11 confère aux 26 lignées qui le possèdent une résistance totale à RB. Cette très grande région comportent 33 gènes candidats dont un groupe de LRR-Kinases et un groupe de NLRs mais aussi 2 gènes majeurs de résistance connus chez le blé tendre, *Lr36* (Dvořák and Knott, 1990) et *Lr61* (Kthiri et al., 2018). En raison du faible nombre de marqueur SNP dans cette région, on ne peut pas certifier s'il s'agit d'un nouveau gène de résistance ou non. Mais ce QTL mériterait de plus amples investigations car il confère une résistance inédite dans les variétés élités. Les 3 autres QTLs identifiés et validés sont LR_6B135 également situé sur le bras court du

chromosome 6B, LR_2B situé sur le chromosome 2B colocalisant avec le gène de résistance *Lr50* du blé tendre (Brown-Guedira et al., 2003), et LR_6A situé sur le chromosome 6A colocalisant avec un QTL déjà identifié par de précédentes études chez le blé dur (Maccaferri et al., 2010; Aoun et al., 2016).

1.2. QTLs de résistance à STB

1.2.1. Identification de QTLs

Les 180 lignées ont été criblées pour la résistance à STB par inoculation avec la souche P1a. Lors de ma notation, j'ai dissocié et comptabilisé deux sortes de symptômes. Tout d'abord, le pourcentage de surface foliaire avec nécroses sur la surface inoculée (STB_Nec), qui représente la résistance à l'infection primaire, donc la capacité de la plante à bloquer ou non le développement du champignon dans ses cellules. Puis le pourcentage de cette même surface foliaire nécrotique mais comportant des pycnides cette fois (STB_Pyc), ce qui représente la résistance à la reproduction du champignon. Le score de l'héritabilité de ces deux caractères est élevé (0,69 et 0,68 respectivement). Cela a permis de trouver deux QTL associés à la résistance à la primo-infection (figure 14 encadrés rouges) : STB_Nec5A cartographié sur une région de 4,7 Mbp sur le chromosome 5A contenant 51 gènes candidats, dont six codent pour des récepteurs kinases et trois pour des protéines liées à la pathogenèse ; STB_Nec3A correspond à une région de 327 kpb sur le chromosome 3A contenant un groupe de six gènes WAK, dont l'un est homologue au gène de résistance connu *Stb6*. Cela a également permis de trouver un QTL associé à la production de pycnides (figure 14 encadré vert), le QTL STB_Pycn3A cartographié sur une région de 326 kpb sur le chromosome 3 contenant neuf gènes candidats dont un homologue du régulateur négatif des défenses NRR du riz (Chern et al., 2005) et une tryptophane synthase orthologue de la variété de blé tendre Chining Spring accession TraesCS3A01G041800. Une réduction de la production de pycnides pourrait être due à un niveau de défense basale plus élevé (Ors et al., 2018), et dans ce cas, le gène NRR situé dans cette région serait un excellent candidat. La tryptophane synthase est également un bon candidat puisque cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse de la sérotonine, un acteur clé pour la défense du riz et du blé (Erland et al., 2016; Ishihara et al., 2015). Les réductions des pycnides peuvent être liées à un accès restreint aux nutriments (Bancal et al., 2016; Zhan et al., 2005). Cependant, les annotations des neuf gènes de la région ne suggèrent pas de rôle dans l'accès aux nutriments.

Les QTL STB_Nec3A et STB_Pyc3A sont assez proches l'un de l'autre sur le chromosome 3, seulement 3,3 Mbp les séparent. Mais nous n'avons trouvé aucune lignée EPO dans le panel testé cumulant les allèles de résistance de ces deux loci. En effet, les lignées contenant l'allèle de résistance STB_Pyc3A ont développé une surface nécrosée importante (à l'exception de Plussur pour la souche P1a) (figure 14), démontrant que ces deux QTL sont proches mais distincts.

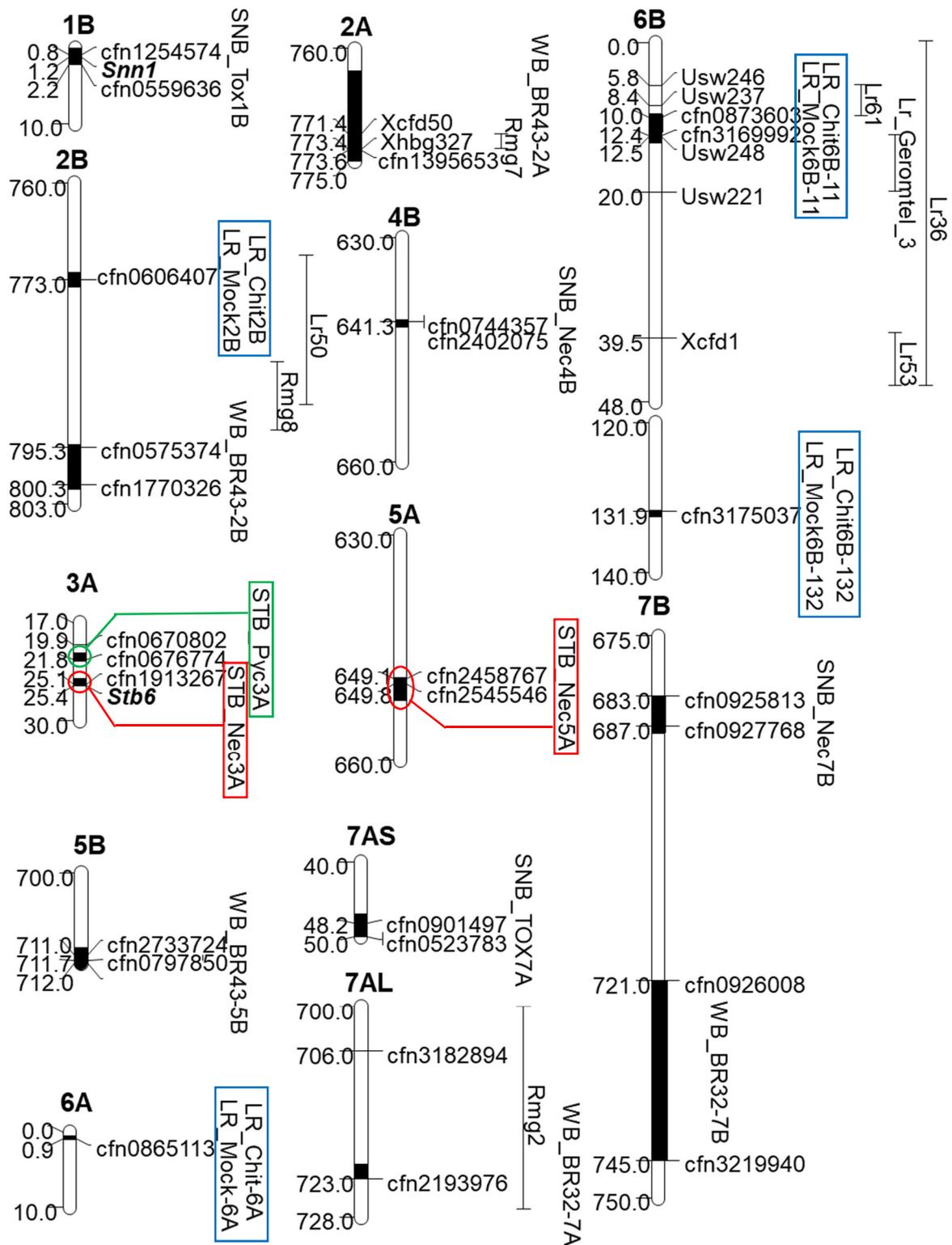


Figure 14 : Carte de la position des QTL sur Zavitan (blé dur de référence).

La distance de la carte est donnée à gauche en paires de mégabase (Mbp) en fonction de la position génomique de la carte Zavitan v1.0. Les noms de QTL sont situés à droite du chromosome et sont représentés par un segment noir sur le chromosome. Certains marqueurs SNP pertinents sont représentés à droite du chromosome pour chaque QTL cartographié. En vert le QTL STB associé aux symptômes pycnides, en rouge, les deux QTL STB associés aux symptômes nécroses et en bleu les 4 QTLs RB.

1.2.2. Validation des QTLs STB_Nec3A et STB_Pyc3A

Les expérimentations de validations ont été concentrées sur STB_Nec3A et STB_Pyc3A car c'était les QTLs avec le meilleur score.

Afin de valider l'effet du locus STB_Pyc3A, j'ai séquencé ce marqueur chez 74 variétés élités. 17 variétés ont été retenues parmi lesquelles 4 avaient l'allèle de résistance. Cette faible fréquence nous a conforté dans le choix de prendre les lignées EPO pour cette GWAS plutôt que les élités avec qui la puissance pour détecter ce QTL aurait été insuffisante. J'ai ensuite inoculé ces 17 lignées élités et 23 lignées EPO avec deux souches de STB (P1a (celle utilisée lors de la GWAS) et une autre souche : M1a). Pour les variétés EPO, les résultats de résistance obtenus lors de la GWAS avec la souche P1a sont confirmés (sauf pour EPO_239 où il était déjà sensible lors de la GWAS) et la souche M1a donne des résultats similaires (figure 15.A et Ballini et al., 2020). Pour les variétés élités, les résultats montrent que, pour les deux souches de STB, les 4 variétés avec l'allèle de résistance ne produisent quasiment plus de pycnides (figure 15.A). Ainsi, j'ai pu établir la fiabilité du marqueur STB_Pyc3A pour prédire cette résistance et la présence d'une résistance génétique à STB dans quatre lignées élités : Coussur, Miradoux, Nefer et Plussur.

Le même groupe de variété a été utilisé pour la validation du locus STB_Nec3A. Cette fois-ci, seule la souche P1a confirme les résistances de nécroses obtenues lors de la GWAS (figure 15.B et Ballini et al., 2020). Ce locus semble donc spécifique de la souche comme dans un schéma gène-pour-gène, de manière semblable à *Stb6* (Saintenac et al., 2018). Cependant, du côté des variétés élités, aucune des trois lignées portant l'allèle résistant pour le locus STB_Nec3A (Tomclair, Voilur, Pharaon) n'est résistante à au moins une des deux souches (figure 15.B). Il est logique d'observer une réduction des symptômes pycnides pour les variétés qui ont une réduction des symptômes nécroses car s'il n'y a plus de nécroses, il ne peut pas y avoir de pycnides. Ainsi, le marqueur STB_Nec3A trouvé dans la population EPO n'est pas un bon prédicteur de résistance dans la population élite de blé dur. On peut tout de même observer une résistance partielle à la souche M1a pour les souches ayant l'allèle de résistance pour le locus STB_Nec3A.

L'allèle de résistance du gène *Stb6* identifié dans le blé tendre est présent dans environ 15% des cultivars européens de cette espèce (Brown et al., 2015). Afin d'évaluer la relation possible entre *Stb6* et STB_Nec3A, j'ai génotypé *Stb6* dans les 17 lignées élités de blé dur et 23 lignées EPO. Trois allèles différents ont été identifiés et comparés aux allèles de *Stb6* publiés (Saintenac et al., 2018). L'un d'eux est similaire à l'allèle STB6-1 qui confère la résistance chez le blé tendre. Les deux autres allèles

identifiés correspondent aux allèles STB6-7 et STB6-12 pour lesquels nous n'avons pas de données disponibles sur la résistance chez le blé tendre.

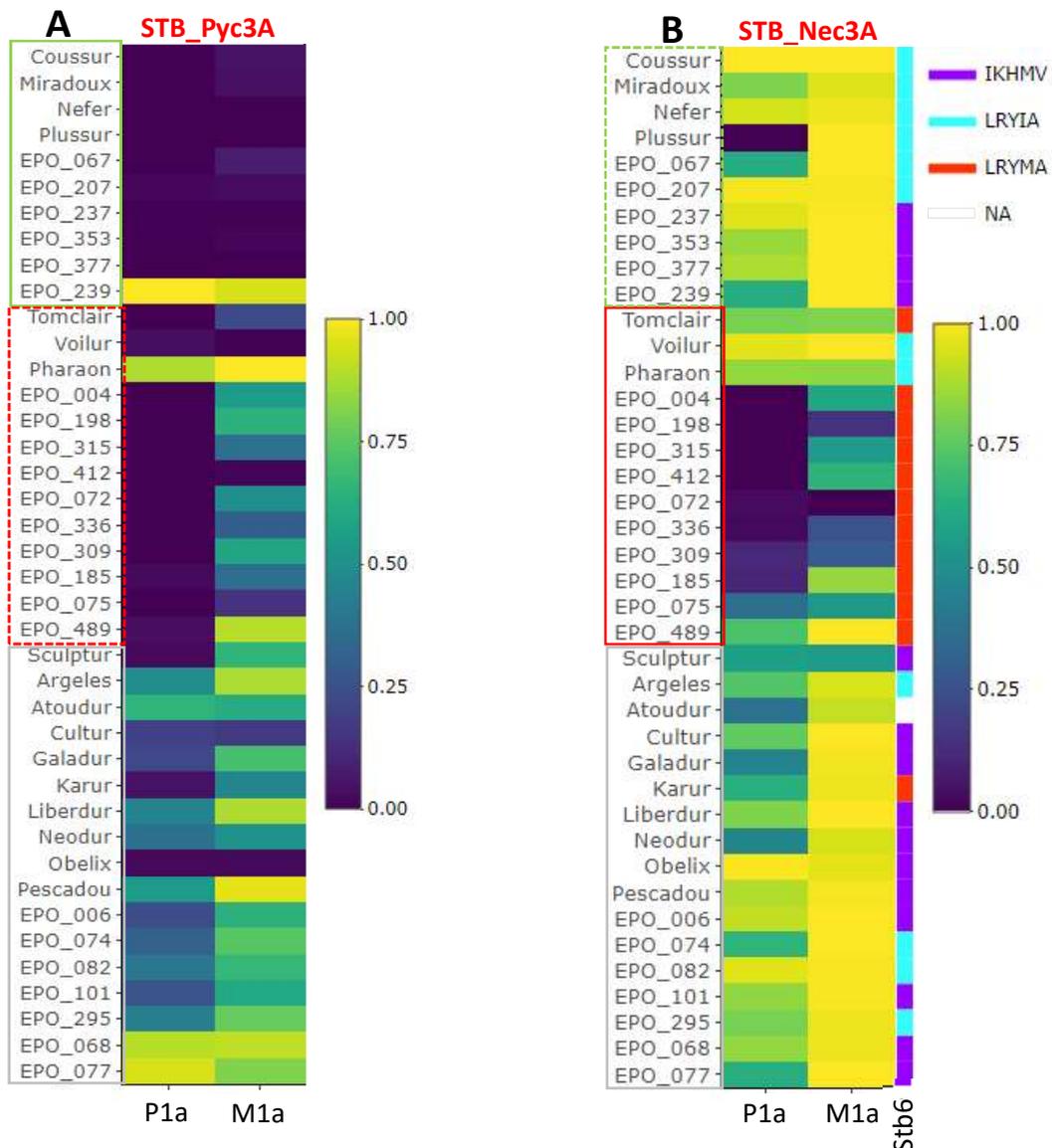


Figure 15 : Symptômes STB des variétés du panel de validation des QTLs selon deux souches.

Heatmaps représentant les données des symptômes STB des 40 variétés élites et accessions EPO servant à la validation des QTLs identifiés. Les données ne suivant pas une loi Normale, elles ont été normalisées par la fonction « normalize » du package Heatmaply. Les variétés et accessions sont en lignes et les symptômes selon les deux souches P1a et M1a sont en colonnes. Les encadrés verts désignent les variétés et accessions possédant l'allèle de résistance du QTL STB_Pyc_3A et les encadrés rouges désignent celles possédant l'allèle de résistance du QTL STB_Nec_3A. Les encadrés gris désignent les variétés n'ayant les allèles de résistance ni au locus STB_Pyc3A ni au locus STB_Nec3A. **(A)** Heatmap représentant les symptômes « Pyc » qui sont le pourcentage de nécroses avec pycnides sur le pourcentage de nécroses de la zone inoculée. **(B)** Heatmap représentant les symptômes « Nec » qui sont le pourcentage de nécrose de la zone inoculée. La colonne « Stb6 » indique pour chaque variétés et accessions de blé dur, l'allèle du gène majeur de résistance *Stb6* obtenu par séquençage.

L'allèle LRYIA correspond à l'allèle Stb6-1 publié qui confère la résistance aux souches STB qui possèdent l'allèle reconnu d'AvrStb6. Il n'est présent que chez deux variétés élités (Voilur et Pharaon) qui possèdent l'allèle de résistance au locus STB_Nec3A mais ces deux variétés ne sont pas résistantes aux souches utilisées de STB (figure 15 : colonnes Nec et STB6). L'allèle IKHMY (Stb6-7) n'a pas été caractérisé chez le blé tendre, mais chez le blé dur, il ne semble pas conférer une résistance à STB. L'allèle LRYMA (Stb6-12) dont la résistance à STB chez le blé tendre n'a pas non plus été caractérisée, est présent chez toutes les lignées portant l'allèle de résistance au locus STB_Nec3A mais ce n'est pas le cas pour les lignées élités de ce groupe sauf Tomclair (figure 15 : colonne STB6). On peut ainsi considérer que cet allèle LRYMA sur ce gène candidat est un assez bon prédicteur de résistance à STB chez les lignées EPO mais pas chez les blés durs élités (car Tomclair le possède mais n'est pas résistant).

Cet allèle (et par association le locus STB_Nec3A) n'offre pas une résistance à absolument toutes les lignées le portant et cette résistance est remise en question avec la souche M1a, alors que le vrai locus Stb6 confère une résistance totale (Saintenac et al., 2018). Afin d'éclaircir la situation, j'ai séquencé le gène AvrStb6 chez les deux souches utilisées (P1a et M1a) (Brunner and McDonald, 2018). Il s'est avéré qu'aucune des deux souches ne portait l'allèle connu pour être reconnu par Stb6. De ce fait, nous ne pouvons pas conclure définitivement avec ces résultats si la résistance partielle observée associée à STB_Nec3A est conférée par l'allèle Stb6-12 ou par un autre WAK paralogue dans cette région qui reconnaîtrait des allèles encore inconnus d'AvrStb6.

2. Rôle des récepteurs *CERK1* et *CeBIP* dans l'immunité basale

2.1. Sélection des mutants

Nous avons obtenu d'une équipe à Rothamsted UK des mutants blé tendre pour les gènes *CERK1* et *CeBIP*. Ils ont réalisé des mutants par RNAi (figure 16).

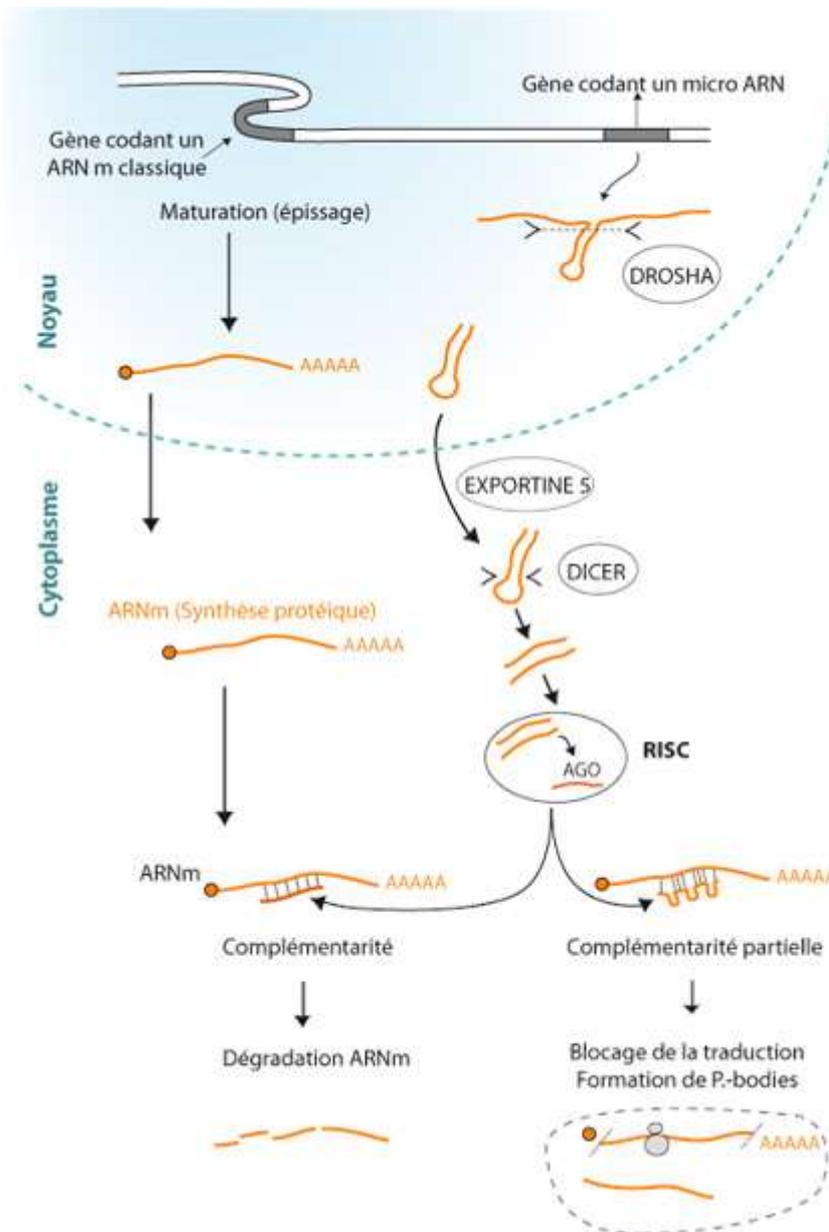


Figure 16 : Principe de la régulation du taux d'ARNm traduit d'un gène dans une cellule par interférence à ARN (RNAi).

Image : Initiation à la virologie (UC Louvain (Be), 2020).

1. Insertion dans le génome par transgénèse d'une cassette comportant notamment un gène de résistance à un antibiotique et une séquence codant une séquence sens et anti-sens d'une partie du gène cible séparées par quelques nucléotides. La transcription de cette séquence produit un ARN avec une structure tige-boucle.

2. Cette structure est clivée par une endonucléase (DROSHA).

3. Le pré-micro-ARN généré est exporté de noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5.

4. Une nucléase DICER clive cet ARN et libère ainsi plusieurs fragments d'ARN double brin de 21pb environ.

5. Le complexe protéique RISC (RNAi Induced Silencing Complex) comportant des enzymes de la famille argonaute (AGO), dégrade le brin sens de l'ARN double brin et reste fixé au brin anti-sens (brin « guide »).

6. Puis lorsque que le RNAi du complexe s'hybride à un ARNm par complémentarité, l'ARNm est dégradé. Si la complémentarité est partielle, l'ARNm sera acheminé vers des P-bodies ou des granules de stress et il y aura une inhibition de la traduction.

Pour chaque plante mutée (plante mère), ils ont établi le nombre de transgènes insérés (plantes F1) et la réduction de la sensibilité à la maladie STB en mesurant la taille des lésions nécrotiques. L'insertion

n'ayant lieu que sur un des deux chromosomes, il y a une ségrégation dans la descendance (plantes F2 et suivantes). Il nous a donc fallu identifier dans la descendance des lignées homozygotes mutantes et des lignées non mutantes dites sauvages (wild-type WT).

En effet, selon la loi de Mendel (dans le cas où il n'y a eu qu'une insertion), la ségrégation suivra le modèle décrit en figure 17.

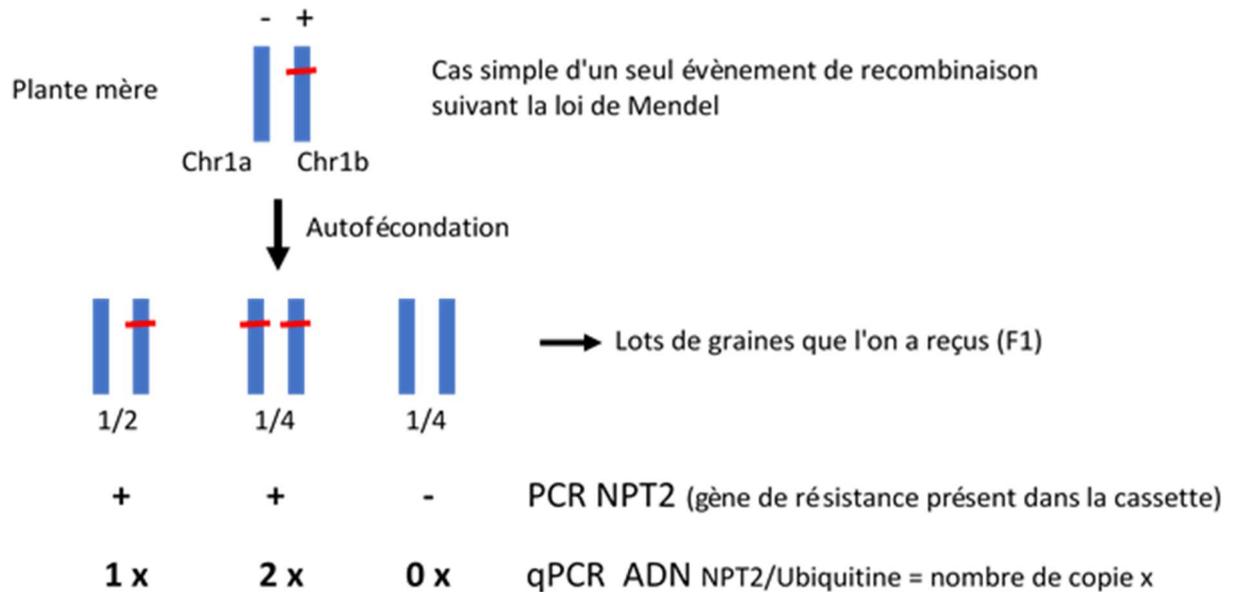


Figure 17 : Schéma de sélection des lots de graines reçus selon la ségrégation de la loi de Mendel.

Les traits bleus verticaux représentent les chromosomes et les traits rouges les insertions du transgène.

Afin d'identifier les lignées homozygotes mutantes et WT (sauvages), 10 graines de chaque lignée reçue sont semées. L'identification se fait en trois étapes : détecter les lignées ne possédant qu'une seule insertion, détecter les lignées WT et mutantes homozygotes et vérifier l'expression des gènes cibles dans ces lignées.

Puis la présence du gène NPTII (néomycine phosphotransférase II) est recherchée par PCR (Polymerase Chain Reaction) directement sur des poinçons de feuille et révélé sur gel d'agarose. Il s'agit du gène de résistance à la génétycine (G418) présent dans la cassette RNAi utilisé pour sélectionner sur milieu sélectif les cals transformés. J'ai conservé les lignées ayant environ 25% de WT, c'est-à-dire celles suivant une loi Mendelienne.

Mais cette étape ne permet pas de différencier les plantes hétérozygotes des homozygotes. J'ai alors réalisé une extraction d'ADN des plantes des lignées sélectionnées à partir d'une feuille afin de réaliser une qPCR (PCR quantitative). Grâce à cette technique, je peux voir quel individu à une quantité double de matrice (gène de la génétycine), et donc dissocier les hétérozygotes des homozygotes.

Pour *CERK1*, sur les 3 lignées ayant un seul événement d'insertion, une seule présentait un WT (homozygote sauvage) et des Mut (homozygote mutant). Pour *CeBIP*, deux lignées étaient Mut et deux WT. Ces plantes ont été menées jusqu'à épiaison et les graines obtenues ont été ressemées, puis encore une fois multipliées, afin d'obtenir suffisamment de graines pour conduire des expérimentations. Le tableau 2 reprend les lignées sélectionnées pour la suite des expérimentations.

Gène	Variété	Expression	Lignée	Code
CERK1	Fielder	RNAi	30.12-8	WT1
CERK1	Fielder	RNAi	30.12-2	Mut1a
CERK1	Fielder	RNAi	30.12-7	Mut1b
CERK1	Fielder	RNAi	30.12-10	Mut1c
CeBIP	Fielder	RNAi	31.6-2	WT2
CeBIP	Fielder	RNAi	31.6-11	Mut2
CeBIP	Fielder	RNAi	31.20-10	WT3
CeBIP	Fielder	RNAi	31.20-5	Mut3

Tableau 2 : Tableau de correspondance des noms des lignées CERK1 et CeBIP sélectionnées.

La colonne « code » indique les noms utilisés dans ce mémoire pour évoquer les différentes lignées *CERK1* et *CeBIP* pour plus de simplicité.

2.2. Rôle du récepteur *CERK1* dans le développement des maladies STB et RB

Chez les plantes mutantes *CERK1*-RNAi et *CeBIP*-RNAi, le système de perception de la chitine est théoriquement moins exprimé, donc la perception de la présence de l'agent pathogène et la transmission du signal qui en découle devraient être moindres. Ainsi on s'attend à avoir plus de symptômes de maladie chez les mutants que chez les plantes WT et un niveau de défense plus faible. Sur les trois mutants RNAi de *CERK1*, aucun ne présente une augmentation significative des symptômes de STB (figure 18 A). En ce qui concerne les symptômes de RB (figure 18 B), le pourcentage de symptômes présents sur les plantes mutantes ne sont pas significativement différents du pourcentage de symptômes du WT. Lors de cette expérience, le dispositif expérimental a été dupliqué afin de prélever les feuilles des plantules pour extraire les ARN à T0, c'est-à-dire au moment où les autres plantes du dispositif sont inoculées. Ainsi en parallèle des symptômes, j'ai effectué des qRT-PCR afin de vérifier l'expression des gènes *CERK1* (notamment pour m'assurer du silencing des mutants). J'ai également regardé l'expression du gène *CeBIP* sur ces plantes afin de m'assurer que l'expression du gène *CeBIP* n'est pas impacté par le silencing de *CERK1* et ces résultats peuvent servir de témoin. Les résultats présentés dans la figure 19, montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les sauvages et les mutants pour aucun des gènes. Le fait qu'il n'y ait pas de différence WT/Mut pour l'expression de *CeBIP* est attendu car *CERK1* est censé être diminué, *CeBIP* ne doit pas en être impacté. Par contre, l'absence de différence WT/Mut pour l'expression de *CERK1* est inattendue. Les plantes *CERK1*-RNAi semblent ne plus être silencées pour *CERK1* et cela peut expliquer qu'il n'y ait pas de différence majeure de symptômes (STB ou RB) entre WT et Mut.

Je ne peux donc pas conclure sur le rôle de *CERK1* dans le développement des maladies STB et RB.

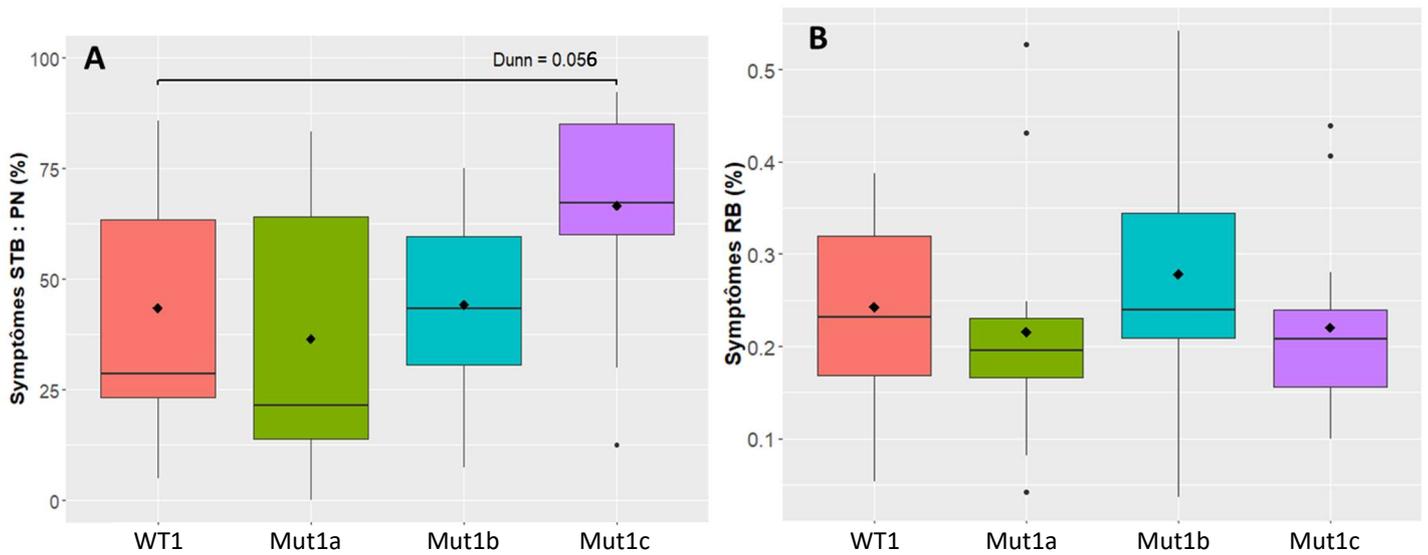


Figure 18 : Symptômes STB et RB chez les lignées WT et Mut CERK1.

A. Symptômes PN de Septoriose (STB) représentant le pourcentage de surface avec pycnidies sur la surface nécrosée par rapport à la surface inoculée. **B.** Symptômes de Rouille brune (RB) représentant le pourcentage de surface de feuille couverte par les pustules de rouille. Pour A et B, la barre horizontale des boxplots représente la valeur médiane des données et le losange représente la valeur moyenne. Utilisation du test de Dunnett pour comparer les symptômes de chaque mutant aux symptômes du WT, $n=20$, l'astérisque indique une différence significative de $P < 0,05$.

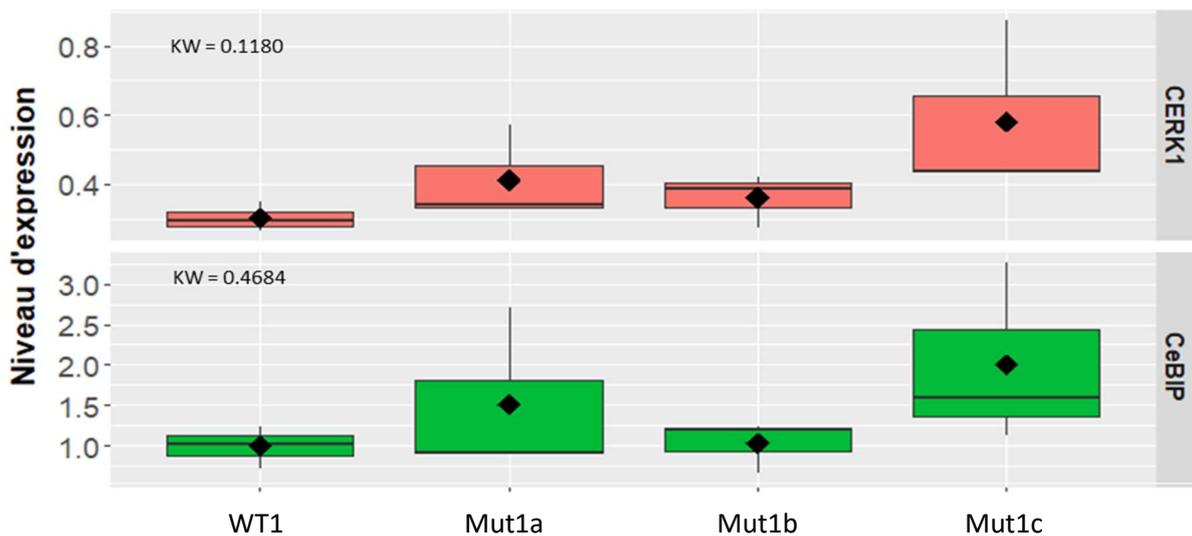


Figure 19 : Expression des gènes CERK1 et CeBIP dans les lignées CERK1 WT et Mut.

Le niveau d'expression de chaque gène est calculé par qRT-PCR par rapport au gène de ménage Ubiquitine. KW est le résultat du test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis avec $p = 0.05$.

2.3. Rôle du récepteur *CeBIP* dans le développement des maladies STB et RB

De la même façon que pour *CERK1*, on s'attend à ce que les plantes *CeBIP* RNAi aient moins de récepteur *CeBIP*, et donc que la détection de l'agent pathogène et la transmission du signal qui en découle soit diminués. Ainsi on s'attend à avoir plus de symptômes de maladie chez les mutants que chez les plantes sauvages (WT) et un niveau de défense plus faible.

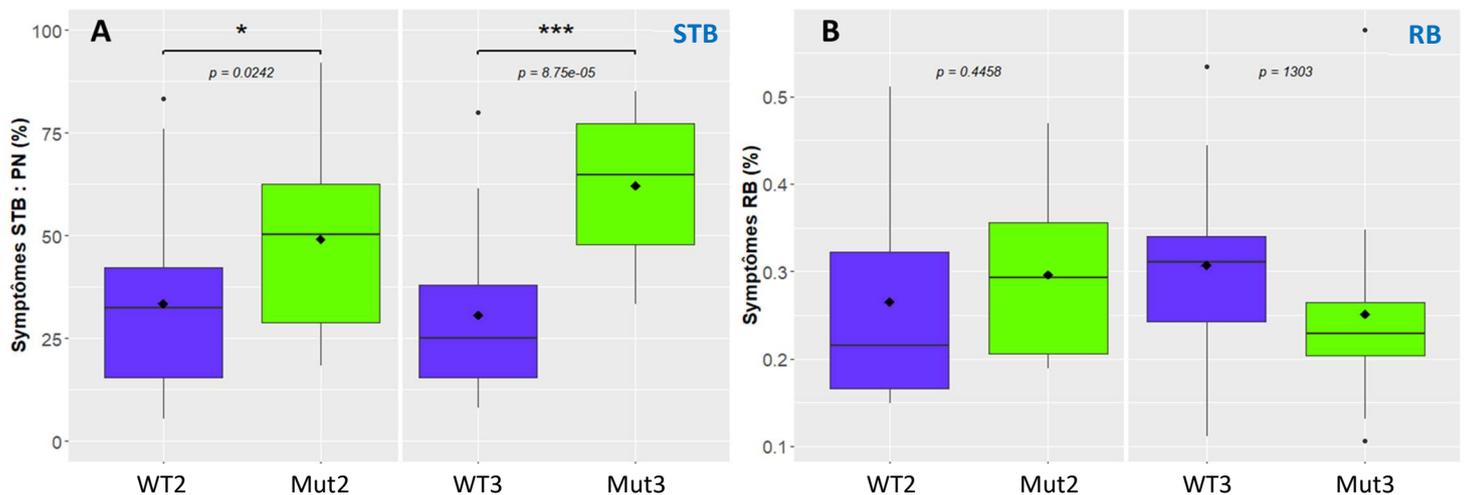


Figure 21 : Symptômes STB et RB chez les lignées WT et Mut *CeBIP*.

A. Symptômes PN de Septoriose (STB) représentant le pourcentage de surface avec pycnides sur la surface nécrosée par rapport à la surface inoculée. **B.** Symptômes de Rouille brune (RB) représentant le pourcentage de surface de feuille couverte par les pustules de rouille.

Pour A et B, la barre horizontale des boxplots représente la valeur médiane des données et le losange représente la valeur moyenne. Utilisation du test de Student pour comparer les symptômes de chaque mutant à son WT respectif, $n=20$, l'astérisque indique une différence significative de $P < 0,05$.

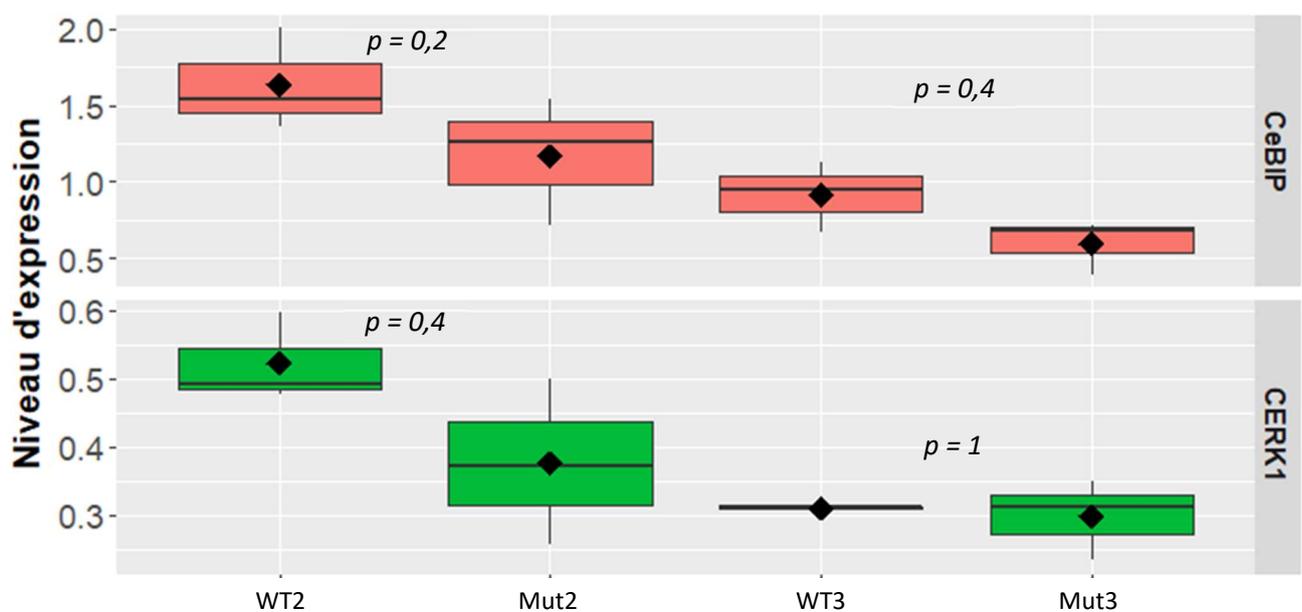


Figure 20 : Expression des gènes *CERK1* et *CeBIP* dans les lignées *CeBIP* WT et Ho.

Le niveau d'expression de chaque gène est calculé par qRT-PCR par rapport au gène de ménage Ubiquitine. La valeur de la p value est le résultat du test statistique non paramétrique de Wilcoxon avec un seuil de $\alpha=0,05$.

Les deux mutants de *CeBIP* ont plus de symptômes STB que leurs WT de façon significative (figure 20A). En revanche, aucune différence n'est à noter entre les Mut et WT pour les symptômes de RB (figure 20B). Dans cette expérience le dispositif expérimental a également été dupliqué afin de prélever les feuilles des plantules pour extraire les ARN à T0. J'ai effectué des qRT-PCR sur ces ARN afin de vérifier le silencing ou non de *CeBIP*. J'ai également regardé l'expression du gène *CERK1* sur ces plantes afin de m'assurer que son expression n'était pas impactée par le potentiel silencing de *CeBIP*. Malgré une tendance (figure 21), il n'y a pas d'atténuation significative de *CeBIP* chez ces mutants. J'ai également vérifié le niveau des défenses préformées (figure 22). Pour le couple WT2 / Mut2, bien que non significatif, l'expression de 6 gènes sur 7 est diminuée. Ainsi, le niveau de base des défenses basales est plus bas chez le mutant Mut2. Entre WT3 et Mut3, il n'y a majoritairement pas de différences, même tendancielle.

En somme, les mutants RNAi *CeBIP* présentent une augmentation des symptômes de STB qui pourraient être expliqués par une diminution tendancielle du niveau d'expression des défenses. Mais comme nous n'avons pas pu confirmer le silencing des mutants, ce résultat attendu ne peut être attribué de façon certaine à ces derniers. De ce fait, nous ne pouvons conclure sur le rôle du récepteur à la chitine *CeBip* dans l'immunité du blé.

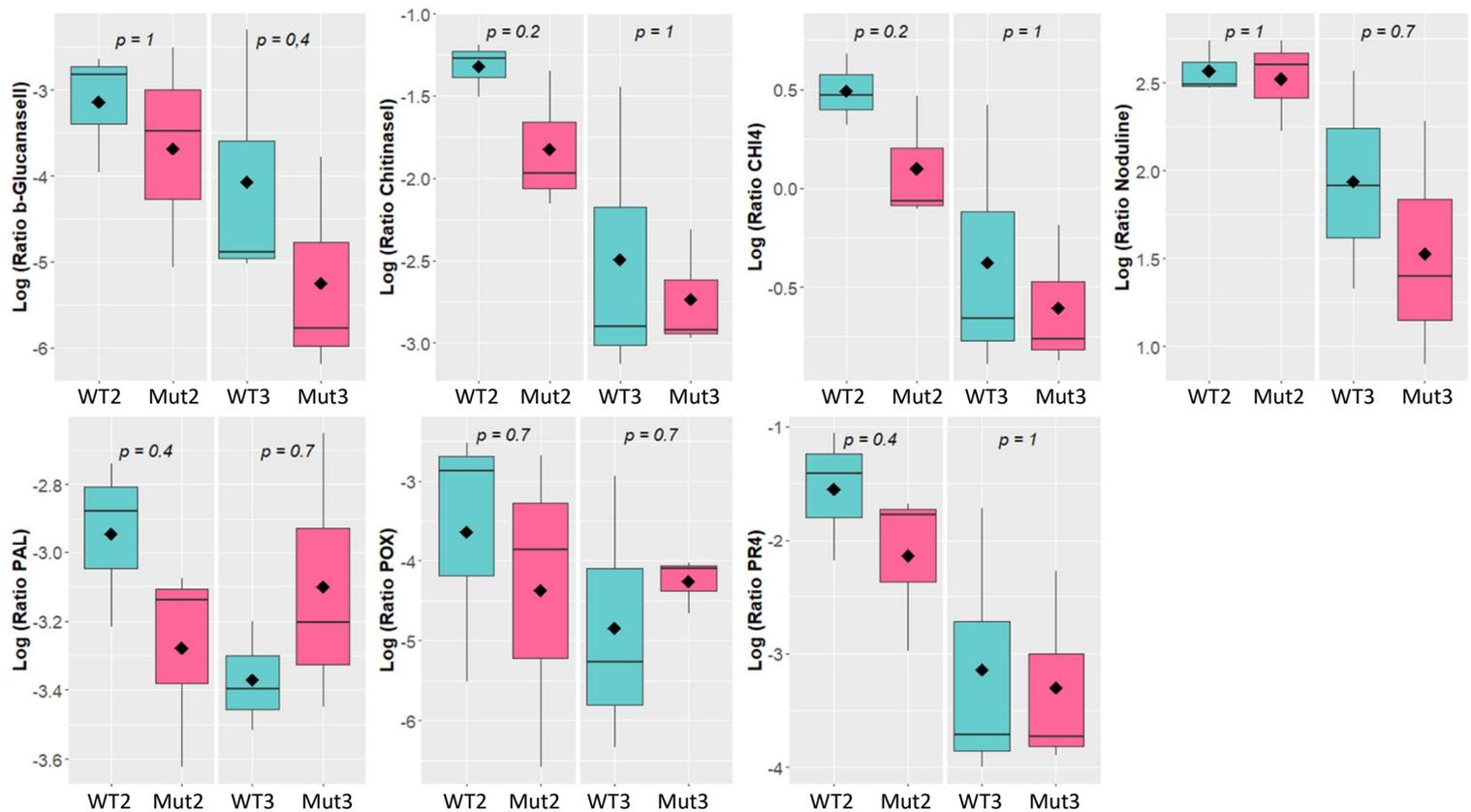


Figure 22 : Niveau d'expression de gènes de défense basale chez les lignées WT et Mut *CeBIP*.

Le niveau d'expression de chaque gène est calculé par rapport à l'expression constitutive du gène ubiquitine par qRT-PCR. La valeur de la p value est le résultat du test statistique non paramétrique de Wilcoxon avec un seuil de $\alpha=0,05$.

Chapitre 2 : Modulation des défenses par l'environnement.

1. Le stress hydrique.

1.1. Effets et conséquences sur la sensibilité aux maladies

Pour savoir si le stress hydrique a un effet sur différentes maladies foliaires du blé (STB, SNB et RB) j'ai semé, pour chaque maladie testée, 3 pots de 6 plantes de 20 variétés de blé dur. Ces panels de variétés, composées de 10 variétés EPO et 10 variétés élites, ont été constitués lors d'une autre étude menée dans l'équipe sur la base de variété sensibles à la rouille brune et avec des profils d'expression constitutifs différentiels de gènes de défenses. Parmi ces variétés, deux possèdent l'allèle de résistance du gène *Stb6* à STB (EPO_072 et EPO_309) d'après les données de la GWAS (Chapitre 1.2.). Pour chaque maladie, le dispositif est doublé, l'un arrosé normalement, l'autre subit une sécheresse post-inoculation (cf Matériels et méthodes). Puis les symptômes de chaque maladie sont comptabilisés.

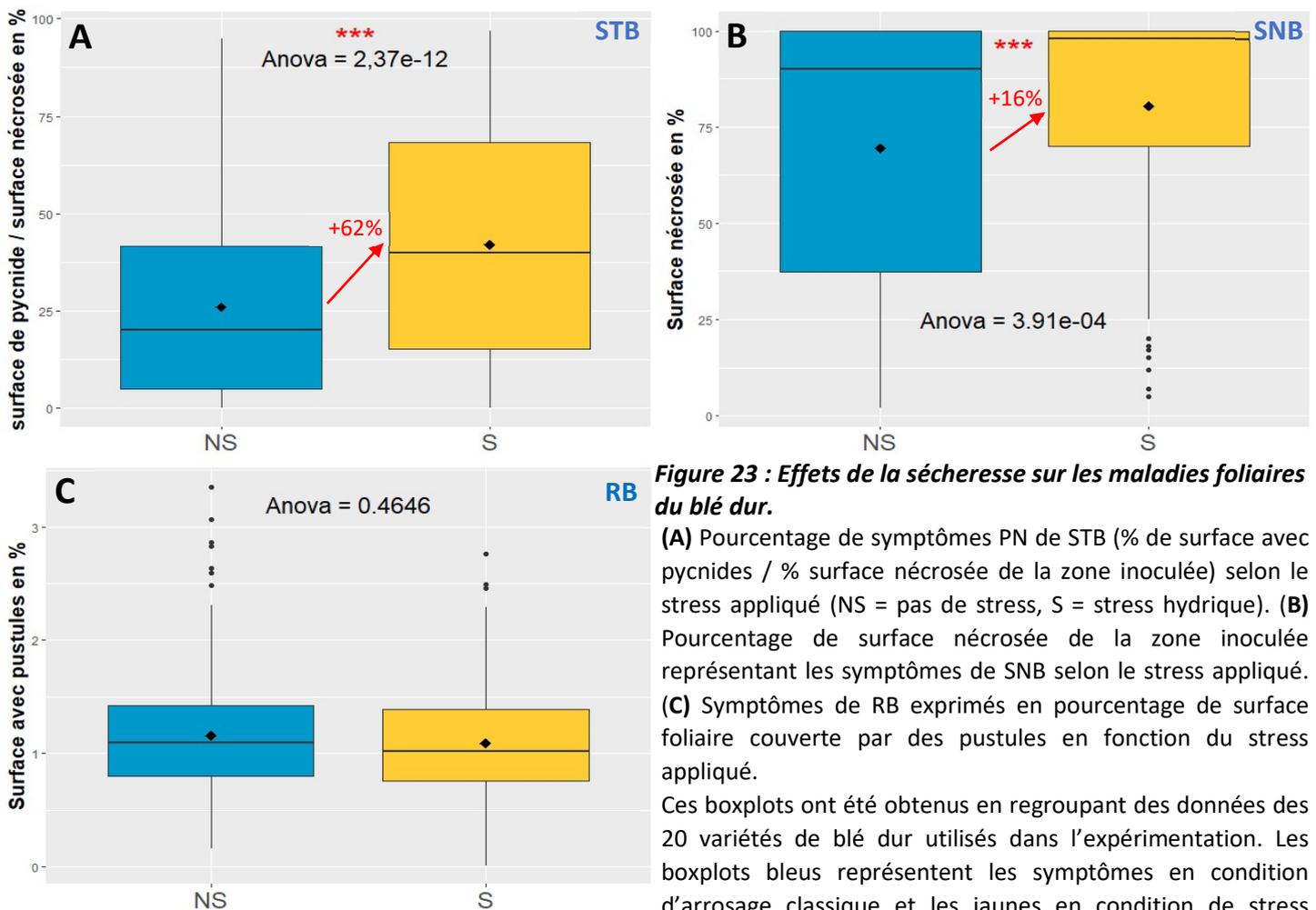


Figure 23 : Effets de la sécheresse sur les maladies foliaires du blé dur.

(A) Pourcentage de symptômes PN de STB (% de surface avec pycnides / % surface nécrosée de la zone inoculée) selon le stress appliqué (NS = pas de stress, S = stress hydrique). (B) Pourcentage de surface nécrosée de la zone inoculée représentant les symptômes de SNB selon le stress appliqué. (C) Symptômes de RB exprimés en pourcentage de surface foliaire couverte par des pustules en fonction du stress appliqué.

Ces boxplots ont été obtenus en regroupant des données des 20 variétés de blé dur utilisés dans l'expérimentation. Les boxplots bleus représentent les symptômes en condition d'arrosage classique et les jaunes en condition de stress hydrique.

Les étoiles rouges sont le résultat d'un test Anova entre NS et S, $n > 100$, et avec un seuil de significativité $\alpha < 0,05$. Le trait horizontal des boxplots représente la valeur médiane des données et le losange représente la valeur moyenne.

Lorsque l'on regarde globalement les résultats, c'est-à-dire toutes variétés confondues (figure 23), on observe que pour la septoriose (STB et SNB), la quantité de symptôme augmente respectivement de 62% et 16% en condition de stress hydrique. En revanche, le stress appliqué ne change pas significativement la quantité de symptômes pour la RB.

Même si cette analyse globale nous apporte ces informations intéressantes, il n'est pas judicieux de s'y fier uniquement car les analyses statistiques indiquent qu'un modèle contenant juste le facteur stress explique peu les symptômes obtenus. En effet, le tableau de résultat de l'Anova de type II à deux facteurs (stress et variété) indique l'influence significative ou non des deux facteurs ainsi que l'interaction entre ces deux facteurs par une valeur de p-value. Pour chaque maladie, j'ai testé l'importance de chaque facteur et leur interaction mais j'ai aussi calculé le R² de chaque modèle afin de déterminer lequel explique le mieux la part de variabilité des données (symptômes). Les résultats sont récapitulés dans le tableau 3. Pour STB et SNB, la relation linéaire entre la variable de réponse et la variable prédictive est significative pour le modèle avec interaction stress*variété mais aussi avec les modèles simples à un facteur. Le modèle avec interaction est celui qui explique le mieux la variabilité dans les symptômes de ces deux maladies. Autrement dit, 44% de la variabilité des symptômes de STB sont expliqués par le modèle avec interaction Stress*Variété et 43% pour les symptômes de SNB. Pour RB, aucun des trois modèles n'a de p-value significative. Ni le stress hydrique, ni la variabilité génétique des variétés, ni l'interaction de ces deux facteurs n'ont d'effet majeur sur les symptômes des RB. Il n'y a donc aucun sens à calculer ou à interpréter le R² des différents modèles. Une analyse par variété révèle tout de même quelques variétés pour lesquelles il y a une différence de symptômes significative entre les deux traitements (Annexe 1) mais comme aucun des trois modèles n'est significatif, ces différences ont peu de sens. Cela laisse penser que le stress appliqué en début d'infection n'impacte pas le développement de cette maladie. Et la variabilité génétique de ces 20 variétés non plus.

	Modèle	Stress Hyd.	Variété	Stress*Variété
STB	p-value du modèle	1,05E-14	2,20E-16	0,021
	Explication des données (R ²)	7,80%	32,20%	44,20%
SNB	p-value du modèle	4,95E-05	2,20E-16	6,79E-07
	Explication des données (R ²)	2,80%	32,30%	43,40%
RB	p-value du modèle	0,4324	0,7037	0,9347
	Explication des données (R ²)	0,50%	12,70%	20,30%

Tableau 3 : Récapitulatif des p-value et R² des différents modèles statistiques appliqués aux résultats de symptômes STB, SNB, et RB en condition de stress hydrique ou non.

La p-value de chaque modèle est calculé par un test Anova comme suivant : Anova (glm (maladie~modèle, data = D, family = "quasipoisson"), test="F"). Puis, le R² est obtenu par le calcul du pseudo R² de Efron car il s'agit d'un modèle linéaire généralisé de données non normales : PseudoR2 (glm (PN~Modèle, data = D, family = "quasipoisson"), "Efron").

Suite à ces résultats il est donc important de regarder par variété et non plus globalement, la différence de symptômes avec et sans stress hydrique, pour chaque maladie. Pour STB (figure 24A) on voit que globalement les symptômes en stress hydrique sont au-dessus des symptômes en condition normale, et un peu moins de la moitié des variétés (8/20) présente une différence significative. Il est à noter qu'aucune des trois lignées présentant un niveau de résistance élevée (dont EPO_072 et EPO_309 qui ont l'allèle de résistance Stb6) n'a été impactée par le stress hydrique. De ce fait, on peut dire que le mode de fonctionnement du gène majeur de résistance Stb6 n'est pas altéré par le stress hydrique. Pour SNB (figure 24B), la différence globale est moins visible car la variabilité des résultats est plus grande, et plusieurs variétés atteignent 100% de nécrose. Seulement un peu plus d'un quart des variétés (6/20) présente une différence significative et ce ne sont pas les mêmes que pour STB (sauf Galadur). Cela n'est pas étonnant étant donné qu'il s'agit de deux champignons avec des modes de vie très différents.

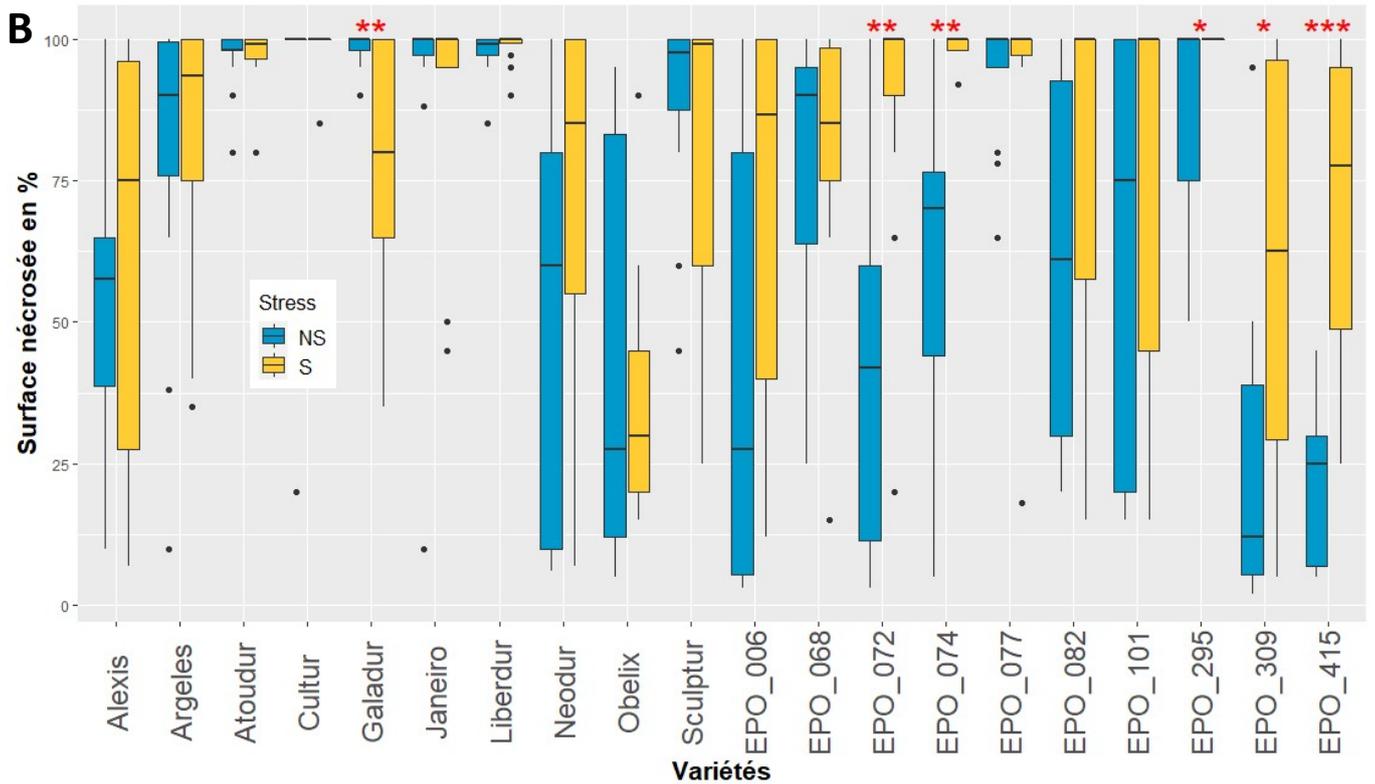
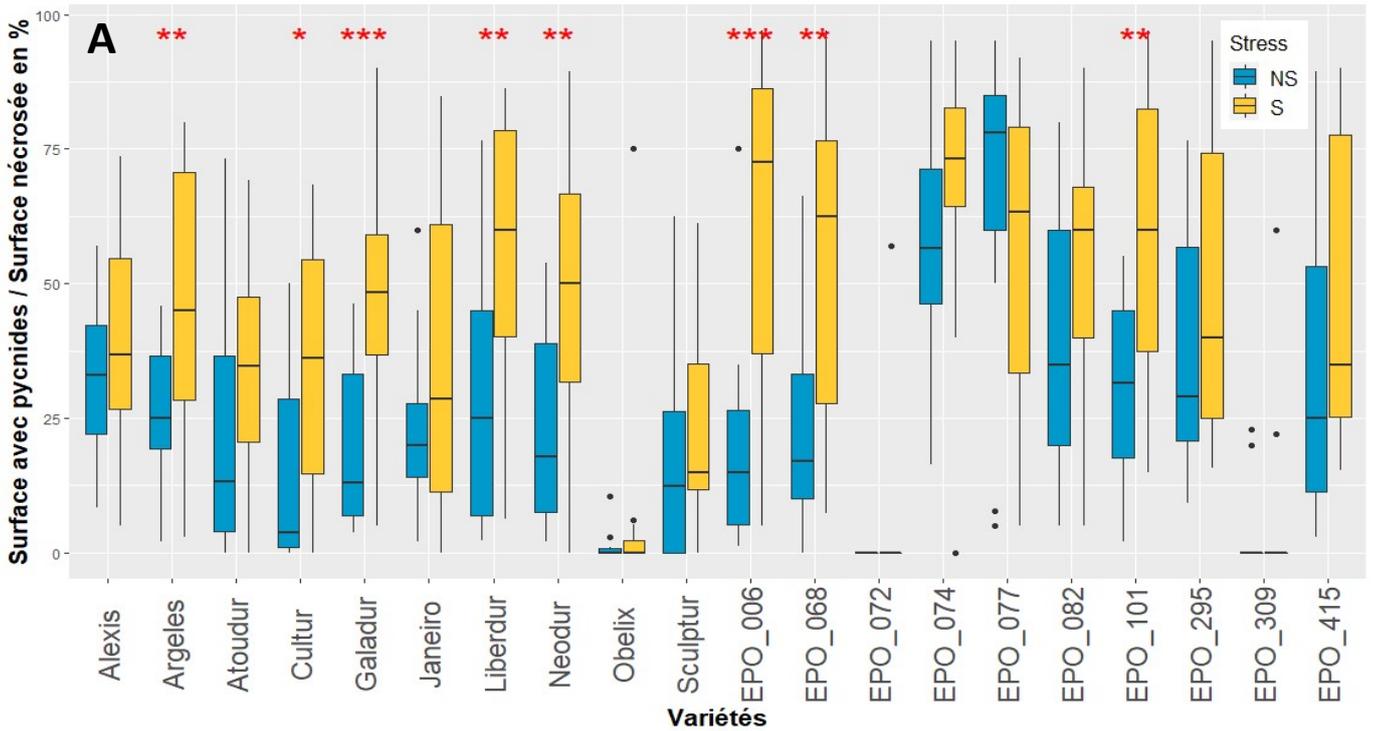


Figure 24 : Symptômes de STB et SNB en condition de stress hydrique ou non pour 20 variétés de blé dur.

A. Symptômes STB. **B.** Symptômes SNB.

NS = pas de stress, S = stress hydrique. Les étoiles rouges correspondent à une différence significative entre les symptômes NS et les symptômes S, obtenues par un test statistique de Wilcoxon par variété : `compare_means(STB~Stress, data=D, group.by = "Variete", p.adjust.method = "bonferroni", method = "wilcox.test")` avec un seuil $\alpha < 0,05$. Le même test a été réalisé pour les symptômes SNB.

Lorsque l'on considère uniquement les variétés réactives au stress hydrique appliqué pour STB et SNB (Tableau 4), on peut déterminer la part de variation due au stress et à la génétique. Pour STB, avec uniquement les 8 variétés réactives significativement, on constate que la génétique n'explique que 4,5% de la variabilité (au lieu de 32,2%). Ainsi, le niveau de résistance chez ces variétés paraît semblable. Cela explique que le modèle avec interaction Stress*Variété n'est plus significatif. Par contre, l'effet du stress est passé de 7,8% à 26%. Pour ce type de variété « sensible » à une contrainte hydrique, l'irrigation pourrait être un levier intéressant pour un agriculteur qui pourrait réduire d'un quart la maladie dans son champ. Il est à noter que ce pourcentage est de l'ordre de grandeur d'une résistance partielle.

Pour SNB, même avec seulement 6 variétés, la part génétique dans la variabilité des symptômes reste identique. L'effet du stress hydrique est multiplié par 5 même s'il a un effet mineur dans l'explication des données. Et l'interaction Stress*Variété reste le meilleur modèle en passant de 43,4% à 59,9% pour expliquer la variabilité des symptômes en condition de stress hydrique. Contrairement à STB, il est possible que les mécanismes de résistance au stress hydrique dans cette expérimentation, soient différents d'une variété à une autre.

	Modèle :	Stress Hyd.		Variété		Stress*Variété	
STB	Nb variété	20 var	8 var	20 var	8 var	20 var	8 var
	p-value du modèle	1,05E-14	<2,2e-16	<2,2e-16	1,63E-02	0,021	0,9107
	Explication des données (R ²)	7,8%	26,0%	32,2%	4,5%	44,2%	
SNB	Nb variété	20 var	6 var	20 var	6 var	20 var	6 var
	p-value du modèle	4,95E-05	2,13E-07	2,20E-16	3,74E-11	6,79E-07	6,34E-07
	Explication des données (R ²)	2,8%	15,0%	32,3%	33,2%	43,4%	59,9%

Tableau 4 : Comparaison des p-value et R² des différents modèles statistiques appliqués aux résultats de symptômes STB et SNB en condition de stress hydrique ou non entre toutes les variétés de blé dur étudiées et des sous-groupes de variétés réagissant significativement au stress hydrique.

Les valeurs sont obtenues de la même façon que dans le tableau précédant. Pour chaque maladie, le sous-groupe de variétés est constitué des variétés dont la différence de symptômes entre la condition stress et non stress était significative, identifiées par des étoiles rouges dans la figure 24.

En parallèle, un dispositif expérimental identique a été réalisé afin de prélever des feuilles similaires à celles qui ont servi à l'inoculation afin d'extraire les ARN et regarder par RT-qPCR l'expression de gènes marqueurs de sécheresse et de gènes de défenses en condition de stress ou de non stress. Ces plantes sont non inoculées ce qui permet d'avoir un état des défenses au moment où elles auraient dû être inoculées. Grâce à ces données, j'ai réalisé une matrice de corrélation de Kendall (figure 25). Il s'agit de calculer les coefficients de corrélation statistiques de plusieurs variables prises deux par deux. Les données de symptômes STB ne suivant pas une loi normale, les coefficients ne sont pas calculés à partir des valeurs des variables mais de leurs rangs. Les résultats de cette matrice montrent que les symptômes STB ne sont pas corrélés ni au niveau d'expression des gènes de défenses, ni à celui des gènes de tolérance à la sécheresse car les valeurs des coefficients sont très faibles et non significatives (figure 25 encadré rouge). Mais cette matrice est réalisée avec les données de toutes les variétés

confondues. On peut donc en conclure qu'il n'y a pas de corrélation globale entre symptômes STB et expression des gènes de défenses et/ou sécheresse. Mais comme nous l'avons vu, dans cette interaction il est essentiel de prendre en compte l'effet variétal et il y a peut-être une corrélation à l'échelle de la variété. De plus, cette figure nous montre que les 5 gènes de défenses de l'expérimentation sont tous corrélés entre eux (figure 25 encadré bleu), et le gène de tolérance à la sécheresse TaDREB2b, qui fait partie de la voie ABA-indépendant contrairement à TaMYB33, corrèle avec les gènes de défenses (figure 25 encadré vert). Cela montre que les voies de défense et de tolérance à la sécheresse (ABA indépendant) peuvent être partiellement corrélées.

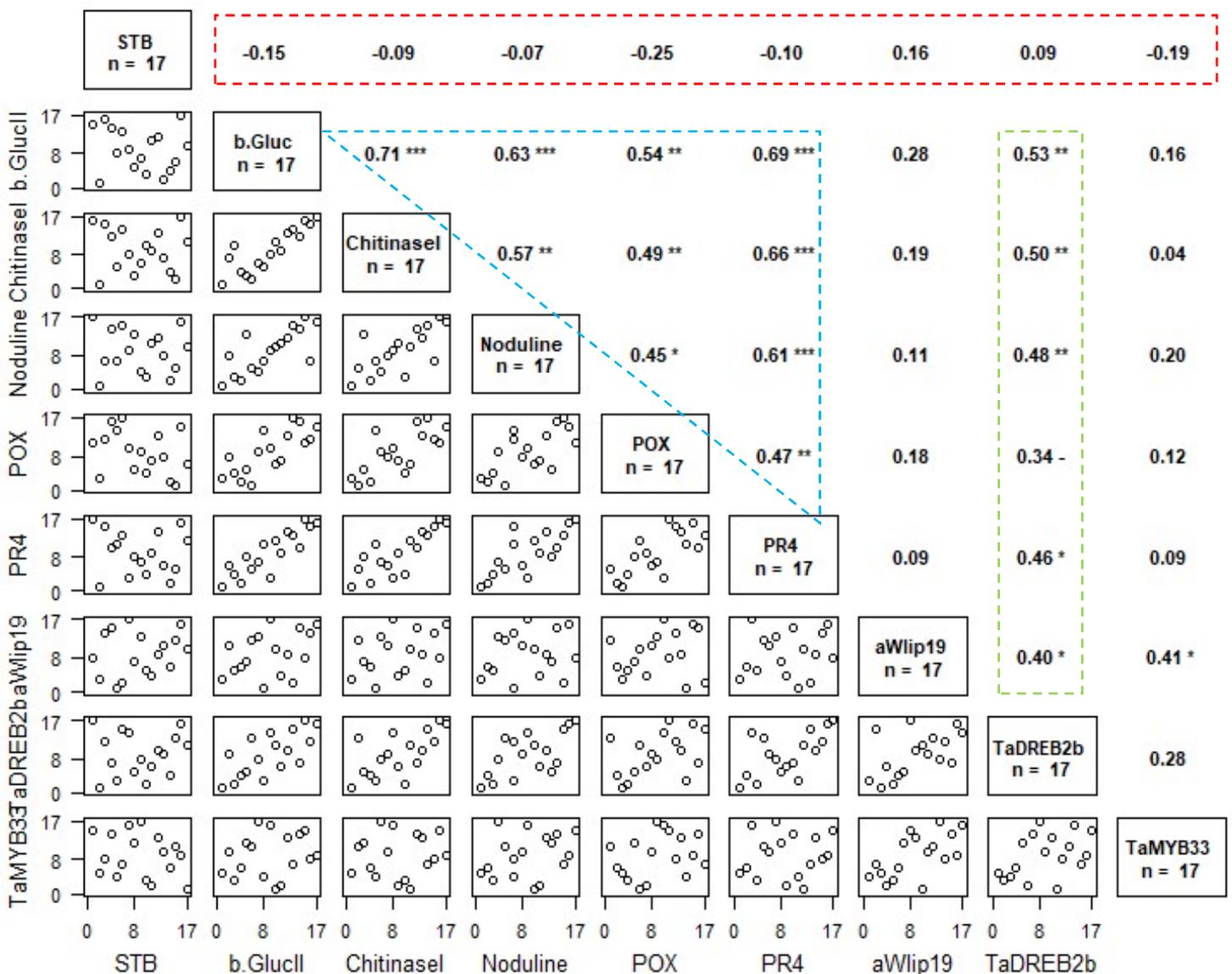


Figure 25 : Matrice de corrélation de Kendall dont les variables sont les symptômes STB et l'expression des gènes de défenses et de tolérance à la sécheresse.

La moitié inférieure montre les nuages de points de rangs des variables. La moitié supérieure montre les coefficients de corrélation correspondants et les étoiles indiquent leur significativité. La diagonale rappelle les variables considérées et le nombre de variétés utilisées pour l'analyse (17 c'est-à-dire toutes sauf les 3 résistantes (Obélix, EPO_72 et EPO_309)).

Ensuite, j'ai réalisé une Heatmap pour visualiser une éventuelle corrélation entre tolérance à la sécheresse, expression de défenses préformées et sensibilité aux maladies par variété (figure 26). Cette analyse montre encore une fois qu'il n'y a pas de règle universelle et que les relations observées sont variétés-dépendantes. Un groupe de variété (Alexis, Argeles, EPO_082, EPO_309, Atoudur, EPO_295 et Galadur) surexprime les gènes de tolérance à la sécheresse tout en ayant une surexpression de gènes de défenses préformés. Chez ces individus il n'y aurait pas de compromis. Ils peuvent à la fois tolérer la sécheresse et avoir un niveau de défenses préformées élevé pour lutter contre les maladies. D'ailleurs, on constate que dans l'ensemble (mis à part Galadur et Argeles) les symptômes STB n'augmentent pas sous stress hydrique dans ce groupe. Pourtant, Galadur et Argeles n'ont pas un niveau de défense plus bas que les autres variétés, ce qui aurait pu expliquer que les

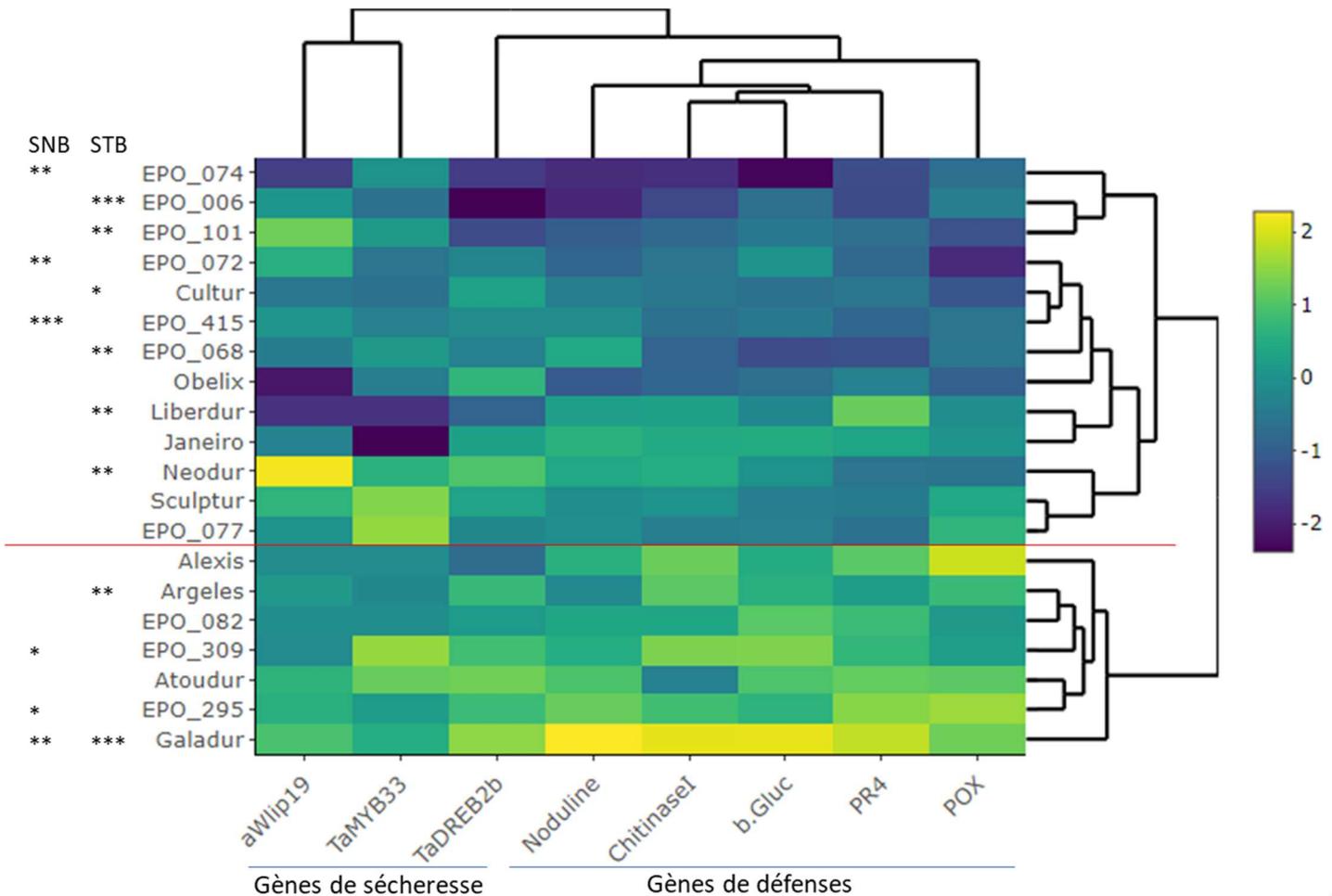


Figure 26 : Niveau d'expression de gènes de sécheresse et défenses préformées par variété de blé dur en condition de stress hydrique.

Chaque ligne est une variété de blé dur et chaque colonne représente un gène de sécheresse ou de défenses préformées. Chaque case colorée est le niveau d'expression d'un gène pour une variété en condition de stress obtenu en divisant le niveau d'expression en stress hydrique par le niveau d'expression en condition normale pour ce même gène et variété. Plus la couleur est jaune, plus ce rapport est élevé donc plus le gène est sur-exprimé en condition de stress, et inversement, plus la couleur est bleu foncé, plus le gène est réprimé. La Heatmap réalise des groupes par association de valeurs. En haut de la figure il s'agit de regroupement de gènes et à droite, des regroupements de variétés. Le trait rouge marque la séparation entre les deux grands groupes de variétés. Sur la gauche sont reportées les étoiles correspondant aux différences significatives de symptômes obtenues précédemment en condition de stress hydrique pour les maladies STB et SNB par variété.

défenses n'aient pas atteint un seuil suffisant lors de la contrainte hydrique pour permettre la résistance. Nous n'avons donc pas d'hypothèse pour expliquer la sensibilité accrue de ces deux variétés. Dans l'autre groupe de variétés (haut de la figure 26), les défenses sont plutôt sous-exprimées et de manière intéressante la proportion de variétés avec plus de symptômes STB est plus importante. On observe donc une tendance globale de corrélation entre l'induction des défenses par le stress hydrique et l'absence de sensibilité accrue, même si des lignées s'écartent de cette norme, notamment EPO_74 et Galadur. Par contre, on ne peut dégager une corrélation même tendancielle entre les symptômes SNB et les résultats de la Heatmap.

Ces expérimentations préliminaires ont permis d'observer que la sécheresse n'a pas un impact universel sur les symptômes des différentes maladies foliaires du blé dur. De plus, les effets sont très variétés-dépendants, on ne peut donc pas prédire que le stress hydrique augmente les symptômes pour telle maladie ni prédire une norme de réaction (la norme de réaction étant le terme utilisé en stress abiotique car on s'attend à ce que tous les individus réagissent au stress selon cette norme). Le niveau d'expression des gènes de défenses préformées étant également variétés-dépendant, on ne peut donc pas statuer sur un éventuel compromis défenses-tolérance au stress hydrique ou à une corrélation générale quelconque.

1.2. Rôle du facteur de transcription *bZIP* dans la régulation du stress hydrique

Au travers d'une collaboration avec les sociétés Biogemma et Limagrain, j'ai reçu des graines de lignées homozygotes mutantes et de lignées sauvages associées. J'ai multiplié ces lignées plusieurs fois successivement afin d'avoir suffisamment de graines pour réaliser des expérimentations. Lors de la première multiplication, j'ai extrait l'ARN de ces plantes à partir d'une feuille pour vérifier l'expression du gène *bZIP* afin de choisir les meilleures lignées (figure 27). Parmi les lignées sur-expresser (OX), j'ai retenu le couple 003 que l'on appellera WT4/Mut4 (tableau 5) et parmi les lignées RNAi, j'ai retenu les couples 004, 007 et 011 que l'on appellera respectivement WT5/Mut5 ; WT6/Mut6 ; WT7/Mut7 (tableau 5). Malgré la grande différence d'expression entre le WT et le mutant du couple 018, je n'ai pas retenu ce couple car il y a potentiellement un problème avec la donnée d'expression du WT.

	Nom officiel de la lignée	Code pour le mémoire
OX	003_003	WT4
	003_001	Mut4
RNAi	004_006	WT5
	004_004	Mut5
RNAi	007_005	WT6
	007_003	Mut6
RNAi	011_004	WT7
	011_003	Mut7

Tableau 5 : Tableau de correspondance de nom des lignées *bZIP*.

Pour une lecture plus simple des résultats, un code (colonne de droite) a été attribué à chaque lignée dont le nom officiel est dans la colonne de gauche.

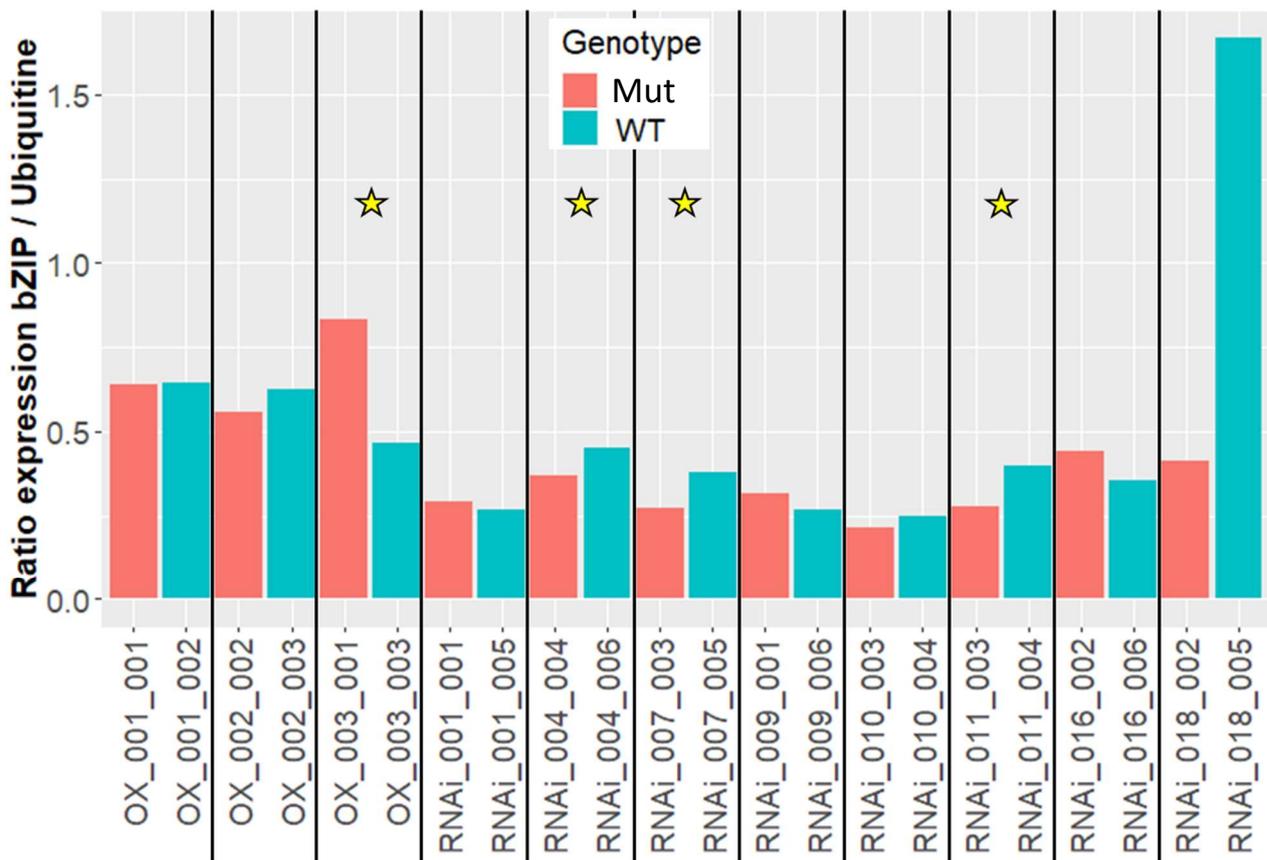


Figure 27 : Expression du gène bZIP chez différentes lignées OX et RNAi.

L'ARN d'une plante sauvage (WT) et d'une plante mutante (Mut) de chaque lignée a été extrait afin de vérifier l'expression du gène *bZIP* par qRT-PCR (donc pas de test statistique possible). Les étoiles jaunes désignent les lignées retenues pour faire les multiplications de graines et conduire les expérimentations de phénotypage.

Ces 4 couples de lignées (1 OX et 3 RNAi) ont été inoculées par RB et STB puis ont subi un stress hydrique. Il s'est avéré que la lignée OX (Mut4) et son sauvage (WT4) ont été créés dans une variété de blé tendre résistante à RB c'est pourquoi ce couple n'apparaîtront pas dans les résultats des symptômes RB.

Les résultats de symptômes RB montrent de façon générale une augmentation du pourcentage de lésions en condition de stress hydrique qu'il s'agisse des lignées sauvages ou mutantes RNAi (figure 28 A et B). Si on regarde un peu plus en détail, on peut observer que pour les trois couples RNAi, le pourcentage de symptômes RB est équivalent entre les WT et les Mut en condition normale d'irrigation mais en condition de stress hydrique, l'augmentation des symptômes est moindre chez les plantes mutantes RNAi (figure 28 B).

En ce qui concerne les symptômes STB, on observe le même phénomène sur les trois lignées RNAi (figure 29 A). Les plantes mutantes RNAi ont une augmentation de symptômes beaucoup moins importante que les plantes sauvages après avoir subi un stress hydrique. Les ratios d'induction (qui sont les valeurs de chaque lignée en condition S divisées par la moyenne des symptômes STB en condition NS de ces mêmes lignées) montrent clairement qu'avec un stress hydrique, les 3 lignées mutantes indépendantes présentent une réduction significative des symptômes STB par rapport aux lignées sauvages (figure 29 B). Par contre, il n'y a aucune différence significative de symptômes pour la lignée Mut4 sur-exprimant le facteur de transcription entre les deux traitements.

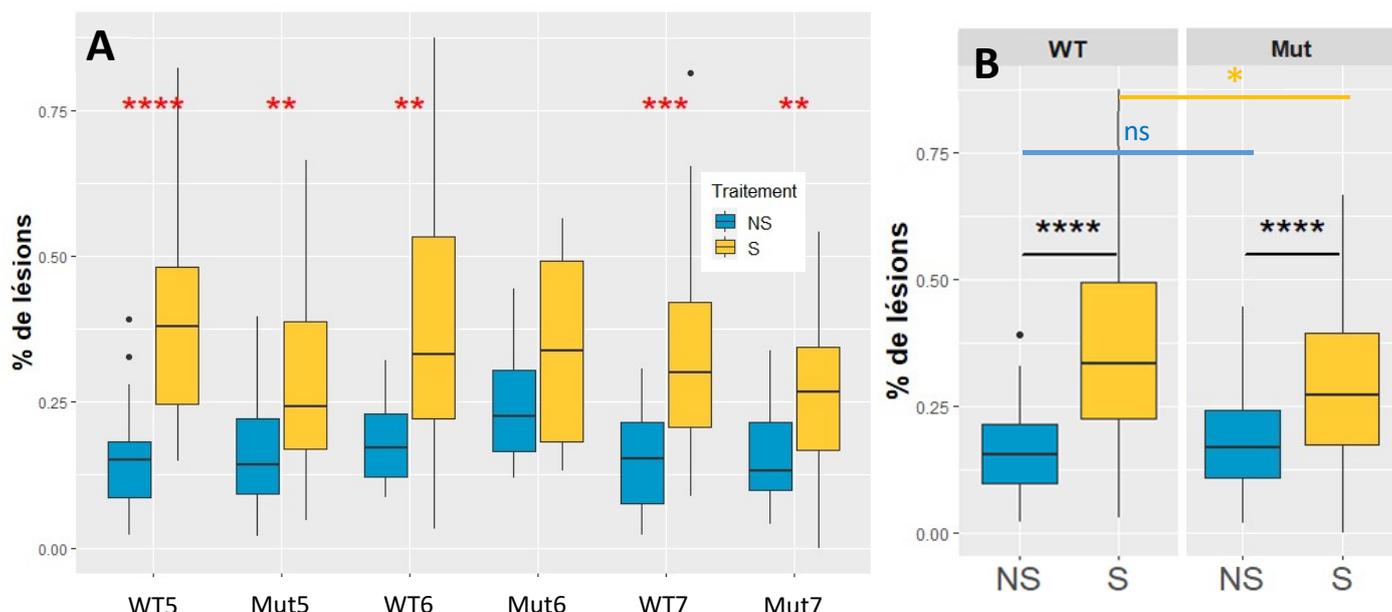


Figure 29 : Effets du stress hydrique sur les symptômes RB des lignées RNAi bZIP.

Un stress hydrique de 3-4 jours est appliqué 24h après inoculation par RB de plantules de blé âgées de deux semaines. Les boxplots jaunes représentent le pourcentage de lésions dans la condition de stress (S) et les boxplots bleus représentent le pourcentage de lésions dans la condition de non stress (NS). **(A)** Effets du stress hydrique sur les symptômes de RB par lignées. Les étoiles rouges désignent une différence significative (test de Wilcoxon) entre la condition S et NS. **(B)** Les effets du stress hydrique sont regroupés par le type de lignées : mutantes RNAi (Mut) et sauvages (WT). Les étoiles noires désignent une différence significative (test de Wilcoxon) entre les conditions S et NS. Les annotations bleues et jaunes représentent une différence significative ou non (test de Wilcoxon) entre les symptômes RB des deux types de lignées.

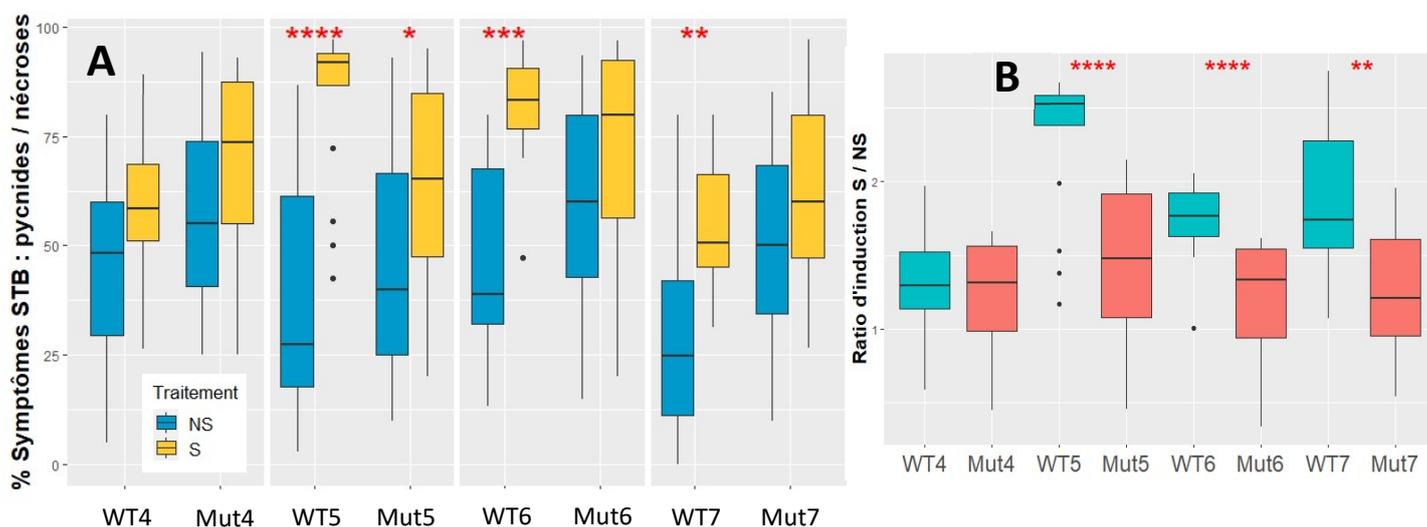


Figure 28 : Effets d'un stress hydrique sur les symptômes STB des lignées OX et RNAi bZIP.

Un stress hydrique est appliqué 72h après inoculation par STB de plantules de blé âgées de deux semaines. **(A)** Les boxplots jaunes représentent le pourcentage de lésions dans la condition de stress (S) et les boxplots bleus représentent le pourcentage de lésions dans la condition de non stress (NS). Les étoiles rouges désignent une différence significative (test de Wilcoxon) entre la condition S et NS. **(B)** Ratios d'induction des symptômes STB de la figure A ci-contre causé par le traitement stress hydrique (S). Les étoiles rouges désignent une différence significative (test de Wilcoxon) de ce ratio entre Mut et WT.

Ces observations pourraient être dues à une modification du niveau d'expression des défenses basales chez les mutants *bZIP*. J'ai alors regardé le niveau d'expression de 4 gènes des défenses préformées (β -glucanase II, Chitinase I, Noduline et PR4) et j'ai également vérifié le niveau d'expression de *bZIP*. Il s'avère que le niveau d'expression des gènes de défenses testés n'est pas impacté par la diminution d'expression ou la surexpression de *bZIP* (figure 30) car quelles que soient les lignées et la condition (NS ou S), le niveau d'expression est similaire. En effet, il n'y a aucune différence significative entre WT et Mut quelques soient les couples en condition de stress hydrique ni en condition témoin (test de wilcoxon réalisé entre chaque Mut et WT associé pour chaque gène) (figure 30 et 31). On peut noter

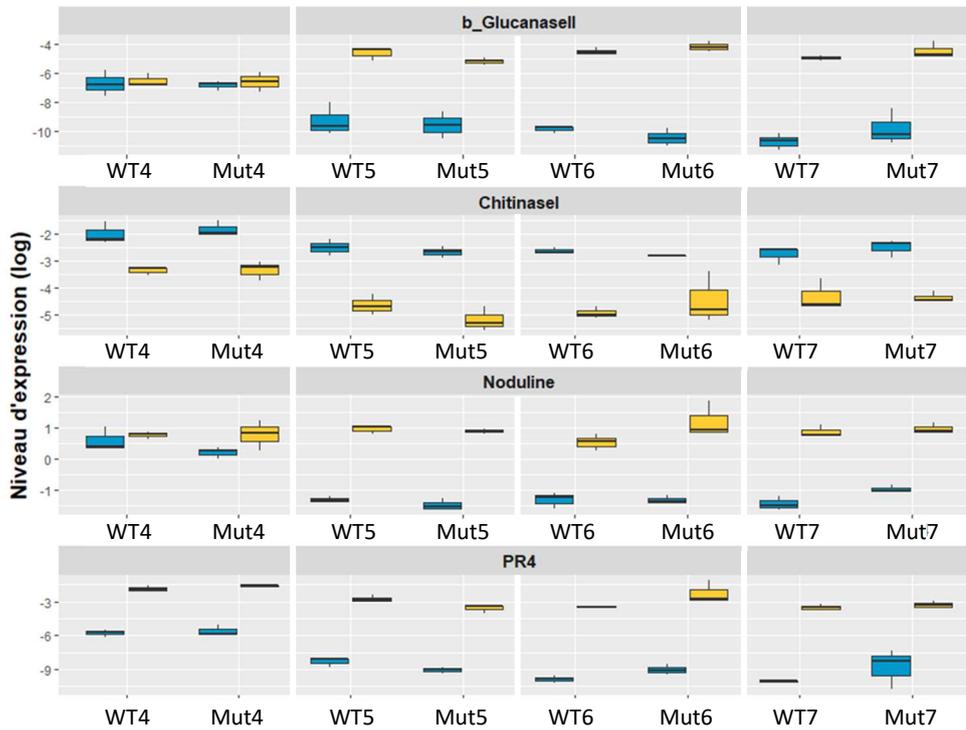


Figure 30 : Niveau d'expression de 4 gènes de défenses préformées dans les lignées *bZIP* WT et Mut sous l'effet d'un stress hydrique ou non.

Les boxplots bleus représentent le niveau d'expression des différents gènes en condition d'irrigation normale. Les boxplots jaunes représentent le niveau d'expression des différents gènes en condition de stress hydrique. Un test de wilcoxon est utilisé pour comparer WT/Mut par traitement et par gène.

Traitement

 NS
 S

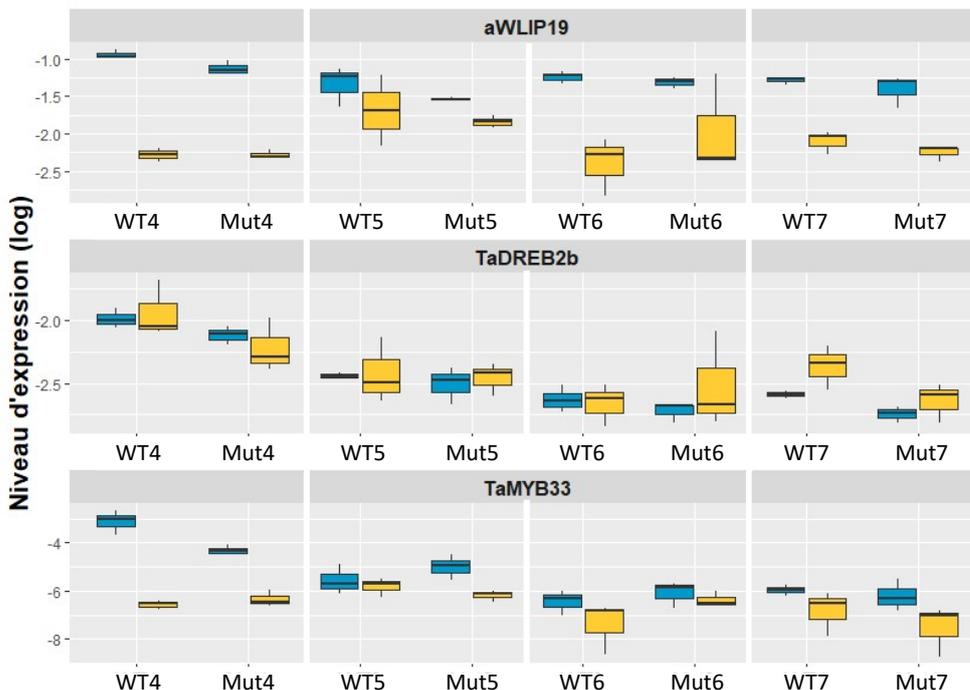


Figure 31 : Niveau d'expression de gènes de tolérance à la sécheresse dans les lignées *bZIP* WT et Mut sous l'effet d'un stress hydrique ou non.

Les boxplots bleus représentent le niveau d'expression des différents gènes en condition d'irrigation normale. Les boxplots jaunes représentent le niveau d'expression des différents gènes en condition de stress hydrique. Un test de wilcoxon est utilisé pour comparer WT/Mut par traitement et par gène.

Traitement

 NS
 S

une différence de profil entre le couple WT4/Mut4 et les autres mais cela s'explique du fait qu'il ne s'agit pas du même fond génétique (NB1 pour le couple WT4/Mut4 et Fielder pour les autres). Par ailleurs, une vérification du niveau d'expression du gène *bZIP* chez les lignées sauvages et mutantes montre que les lignées dites mutantes, semblent ne pas l'être (figure 32).

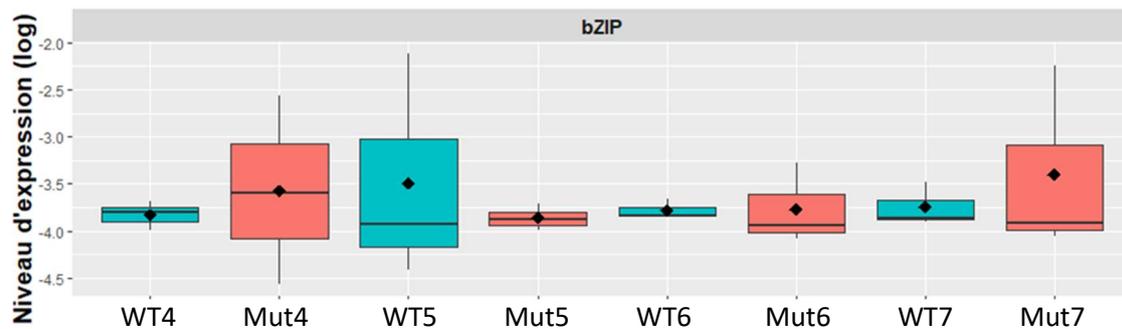


Figure 32 : Niveau d'expression du gène *bZIP* dans les lignées *bZIP*.

Niveau d'expression obtenu par RT-qPCR d'ARN de feuilles prélevées lors d'une expérimentation parallèle à celles des figures 28 et 29. Utilisation d'un test de Wilcoxon pour comparer WT et Mut.

Pour résumer ces différentes expérimentations, les plantes de blé tendre *bZIP*, sauvages et mutantes, accusent une augmentation de symptômes STB et RB en condition de stress hydrique. Pour STB, cette observation est similaire aux résultats obtenus chez le blé dur dans le chapitre précédent, alors que pour RB, nous n'observons pas d'effets particuliers du stress hydrique chez le blé dur.

Ces augmentations de symptômes STB et RB sont moindres chez les 3 lignées mutantes RNAi de *bZIP* qui sont indépendantes. Par contre, il n'y a aucune différence de niveau d'expression de gènes de défenses ou de gènes de tolérance à la sécheresse entre les plantes mutantes et sauvages. Le gène *bZIP* semble donc réprimer une tolérance à la sécheresse indépendamment de ces gènes là. Il se peut qu'il régule d'autres gènes dont nous n'avons pas regardé le niveau d'expression.

Si nous nous fions à la vérification du niveau d'expression de *bZIP* effectué dans les plantes mutantes par rapport aux plantes sauvages, nous ne pouvons pas confirmer le caractère mutant des plantes. Mais un tel phénotype commun aux 3 lignées RNAi nous pousse à remettre en question cette vérification. En effet, il s'agit de graines mutantes reçues de partenaires privés et nous n'avons pas d'informations sur la construction du transgène ni sur la localisation des amorces utilisées pour la vérification. Il se peut que ces amorces amplifient une séquence présente sur le transgène, dans ce cas nous détecterions l'expression du transgène et non de l'expression réelle du gène *bZIP* endogène. Alternativement, ces amorces peuvent amplifier une partie non clivée de l'ARNm de *bZIP* demeurant quelques temps dans la cellule sans pour autant que cela puisse donner une protéine fonctionnelle. Pour vérifier de façon plus certaine le silencing de ces mutants, il faudrait connaître la construction du transgène et réaliser des amorces qPCR qui seraient situées de part et d'autre d'un site de clivage de l'ARNm de *bZIP* par la construction RNAi.

2. Stimulation de l'immunité basale par le biocontrôle (exemple de la Chitine)

La chitine compose entre autres, la paroi des champignons et pourrait ainsi être utilisé comme un stimulateur des défenses des plantes (SDP). Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé une expérimentation mettant en jeu trois maladies foliaires du blé (STB, SNB et RB) et deux variétés de blé dur de référence dans notre équipe (Pescadou et Casteldoux) car ces variétés sont sensibles à ces trois maladies. Le dispositif est doublé pour qu'un lot de plantes reçoive un traitement chitine et l'autre lot servira de témoin (traitement eau). Des expérimentations antérieures à ce projet m'ont permis de déterminer que le pic d'induction des défenses post pulvérisation chitine sur les feuilles était à 4h-5h avec une dose optimale de 100mg/ml. Les résultats (figure 33 A / B / C) montrent que si on ne regarde que l'effet du traitement sans se soucier des variétés, les symptômes de STB diminuent significativement avec le traitement chitine (A) alors qu'ils augmentent pour SNB (B) et RB (C). Ces premiers résultats étayent l'hypothèse qu'un traitement chitine, présumément en stimulant les défenses préformées (figure 36), ralentit le développement de STB lors de sa phase biotrophe ce qui conduit à une diminution des symptômes. Mais le traitement chitine à contrario favorise le

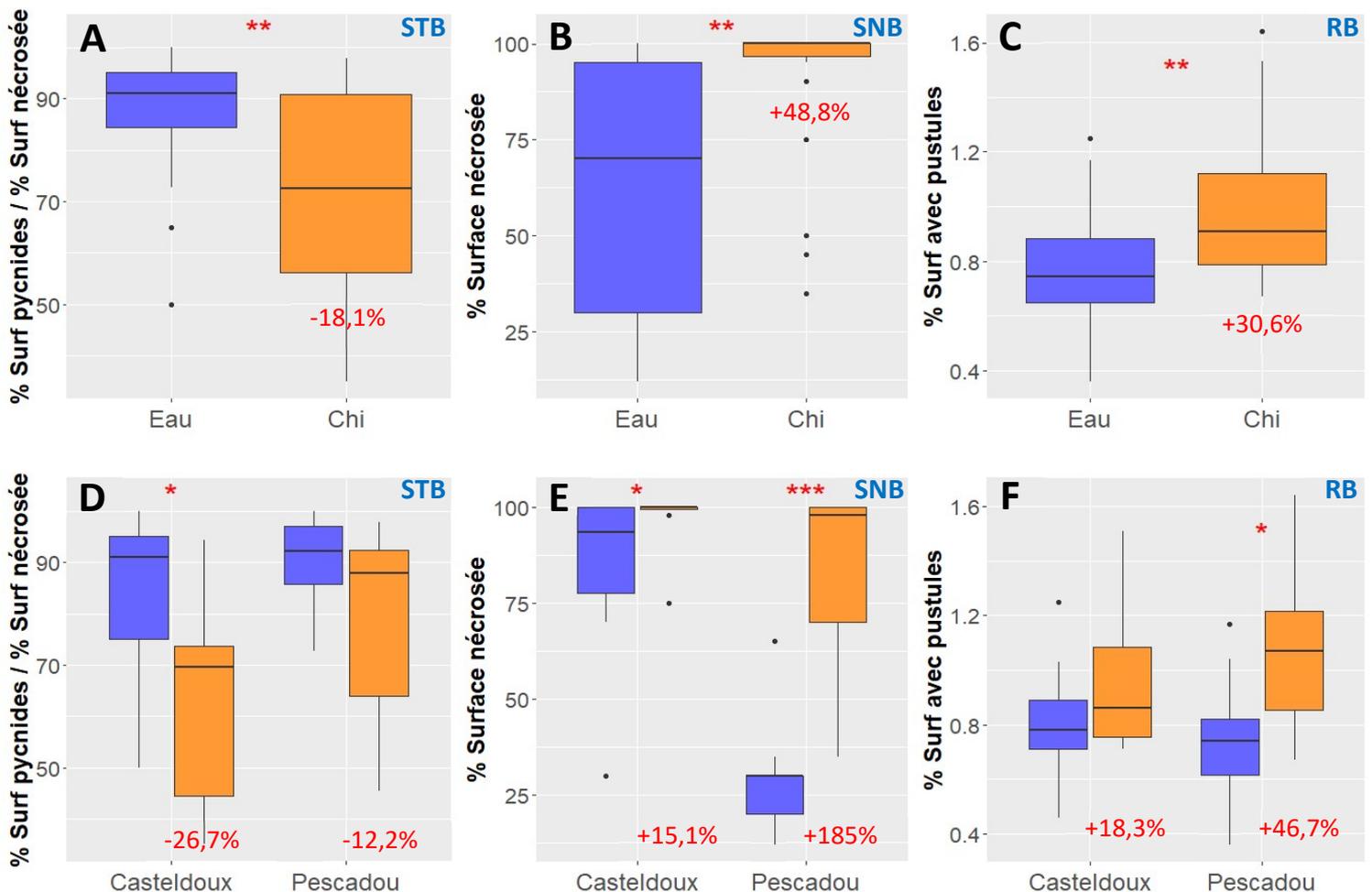


Figure 33 : Effets d'un traitement chitine sur les symptômes de 3 maladies foliaires du blé : STB, SNB et RB.

A / B / C. Symptômes de STB / SNB / RB respectivement, avec traitement eau ou chitine toutes variétés confondues de blé dur testées. D / E / F. Symptômes de STB / SNB / RB respectivement, avec traitement eau ou chitine par variété de blé dur (Casteldoux et Pescadou). Les tests statistiques effectués sont des tests de Wilcoxon avec un seuil de significativité $\alpha = 0,05$.

développement de champignons nécrotrophes tels que SNB. Par contre, l'augmentation des symptômes de RB va à l'encontre de notre hypothèse car RB est un champignon biotrophe, ses symptômes devraient diminuer. Lorsque l'on regarde ces résultats en intégrant la dimension variétale (figure 33 D / E / F), on voit que la différence de symptômes entre les deux traitements, quelle que soit la maladie, n'est pas significative à chaque fois pour les deux variétés mais la tendance reste la même. Il se pourrait donc que, tout comme pour les résultats sécheresse, la génétique vienne moduler les effets d'un spray chitine sur les symptômes de ces maladies.

Pour creuser un peu cette question et le comportement étrange de RB face au spray chitine, j'ai réalisé une nouvelle expérimentation de spray chitine avec la maladie RB mais cette fois sur 21 variétés. Il s'agit des 20 mêmes variétés utilisées dans le chapitre2_1.1. (stress hydrique) auxquelles j'ai ajouté Pescadou issu de la précédente expérimentation. Les résultats (figure 34) confirment que le traitement chitine augmente les symptômes de RB chez Pescadou. Parmi les 20 variétés de blé dur testées, 6 montrent une différence significative de symptômes entre les deux traitements dont seulement une (EPO_006) a le même comportement que Pescadou. Les 5 autres voient leurs symptômes diminuer avec le traitement chitine (Cultur, Janeiro, Liberdur, Obelix et EPO_068). Les autres variétés qui ne sont pas significatives ont tendance également majoritairement à voir leurs symptômes diminuer avec le traitement Chitine. Il y a donc, une fois de plus, une dimension variétale non négligeable qui ne permet pas de généraliser un effet positif d'un traitement Chitine sur les symptômes de blé dur. D'ailleurs, si

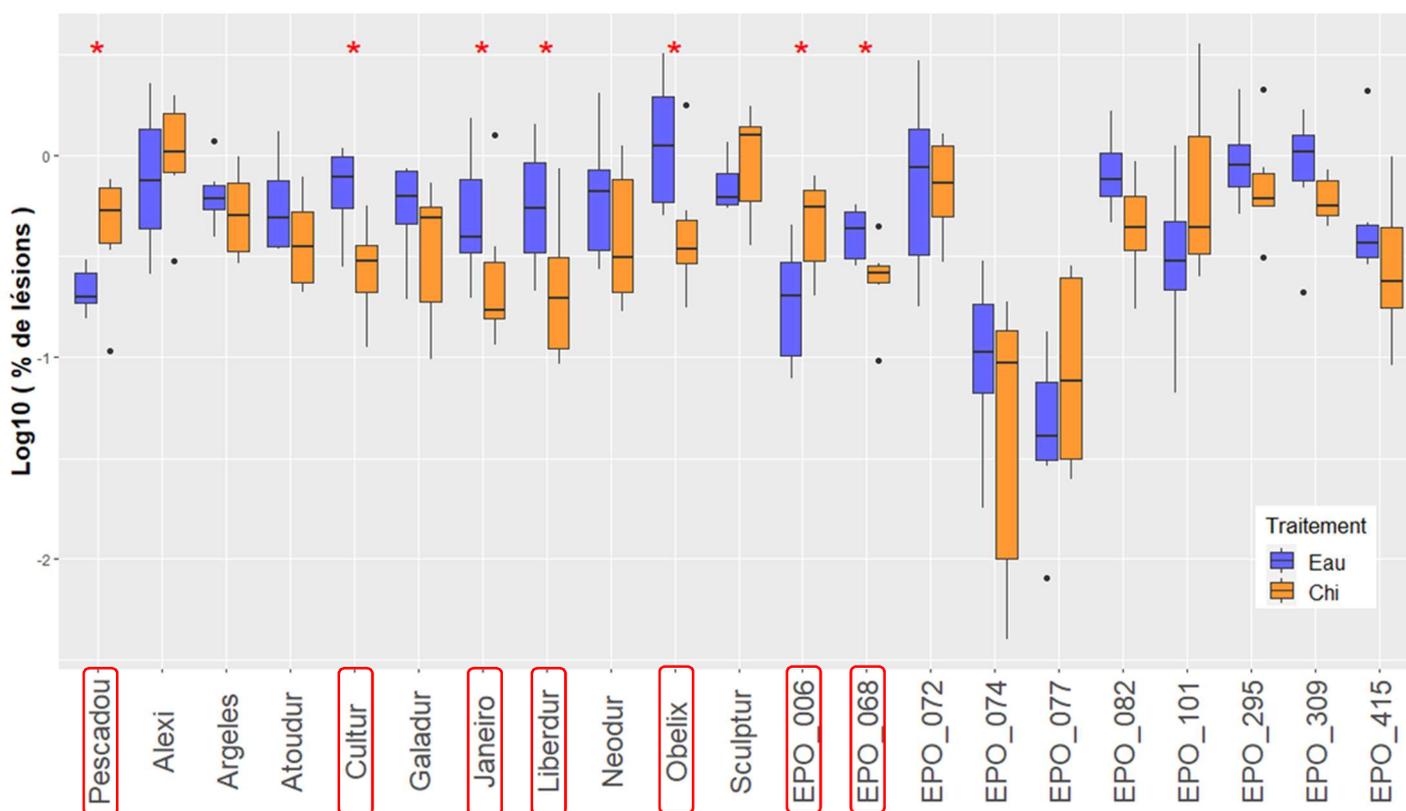


Figure 34 : Effet du traitement Chitine sur les symptômes RB selon un panel de variétés de blé dur.

Le traitement chitine est réalisé sous forme d'un spray d'une solution de chitine 4h avant l'inoculation de RB sur les feuilles de plantules de blé dur. Le pourcentage de surface avec lésions par feuille est exprimé en échelle logarithmique pour une meilleure visibilité. Les étoiles représentent une différence significative de symptômes entre le traitement Eau et le traitement Chitine établie via un test de Wilcoxon avec un seuil $\alpha = 0,05$. Les variétés estampillées d'une étoile sont encadrées en rouge.

on regarde l'effet du spray Chitine toutes variétés confondues (figure 35), on peut dégager une tendance de réduction de symptômes RB lors d'un spray Chitine mais rien de significativement notable. Selon l'analyse statistique des différents modèles pouvant expliquer les symptômes (tableau 6), seul le facteur génétique est significatif mais n'explique que 24,7% de la variabilité des symptômes.

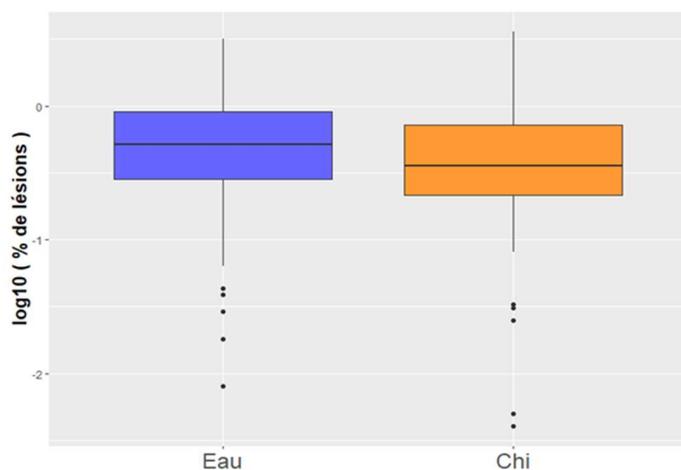


Figure 35 : Effet global (21 variétés confondues) du traitement Chitine sur les symptômes de RB.

Utilisation d'un test statistique de Wilcoxon pour comparer le pourcentage de lésions de RB du traitement chitine avec le traitement témoin (eau).

	Modèle :	Trait. Chi	Variété	Trait.*Variété
RB	p-value du modèle	0,1932	0,0241 *	0,9577
	R ²		24,70%	

Tableau 6 : Comparaison des p-value et R² des différents modèles statistiques expliquant les données symptômes RB selon le traitement appliqué.

La méthode statistique est la même que dans le tableau 3.

Le spray chitine créant un pic d'expression des défenses basales, je me suis demandé si le comportement différentiel des variétés face à RB suite à un spray chitine ne pouvait pas être causé par un niveau plus bas de base des défenses préformées ou par des difficultés à répondre à la chitine ou du moins des difficultés à produire le pic d'induction des défenses suite au spray chitine. J'ai alors regardé le niveau d'expression de différents gènes de défenses préformées chez ces différentes variétés. Le niveau d'expression de chaque gène n'ayant pas la même échelle, j'ai standardisé les résultats afin de pouvoir les mettre sur un même graphique. J'ai sélectionné 3 variétés qui présentent une augmentation de symptômes avec le spray chitine (groupe A : Pescadou, EPO_006, EPO_101) et 3 variétés qui présentent une diminution des symptômes (groupe B : Cultur, Liberdur, Obelix). Les résultats (figure 36) montrent que le spray chitine induit bien l'expression des gènes de défenses préformées chez toutes les variétés, qu'elles aient plus de symptômes RB avec le spray chitine (groupe A) (figure 36A) ou moins de symptômes (figure 36B). En revanche, on peut observer que le niveau d'expression des gènes de défenses préformées (traitement eau) des variétés du groupe A est plus faible que celui des variétés du groupe B et que l'induction par la chitine ne parvient pas à rattraper le décalage. Comme cela est peut-être peu visible sur cette figure, j'ai rassemblé les données d'expression par groupe de variétés (A et B) et par traitement étant donné que les données sont standardisées. Cette représentation des données (figure 37) confirme bien que les variétés du groupe A ont un niveau de défenses préformées inférieur à celui du groupe B et que cette différence n'est pas compensée par l'induction engendrée par le spray chitine. On pourrait donc émettre l'hypothèse que pour lutter contre la Rouille Brune avec un spray chitine préventif, il faut que les variétés de blé dur aient un niveau d'expression des défenses préformées assez élevé dès le début de l'attaque.

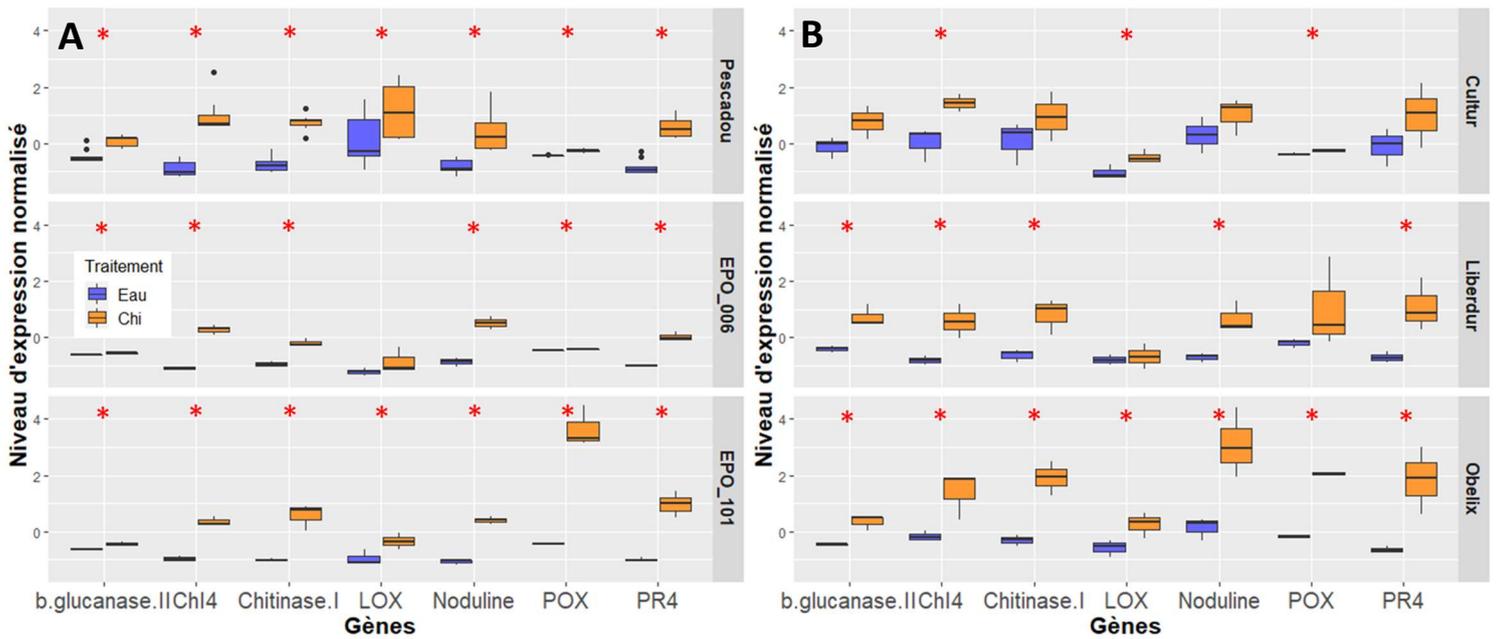


Figure 37 : Niveau d'expression de gènes de défense par variété selon un traitement eau ou chitine.

Le niveau d'expression de chaque gène est normalisé par rapport au niveau d'expression de l'ubiquitine, puis les données sont standardisées pour avoir une échelle commune. Les étoiles rouges représentent une différence significative entre les deux traitements, établie par un test statistique de Wilcoxon avec $\alpha = 0,05$ et $n = 6$. **(A)** Niveau d'expression de gènes de défense des variétés de blé dur du groupe A (Pescadou, EPO_006 et EPO_101). **(B)** Niveau d'expression de gènes de défense des variétés de blé dur du groupe B (Cultur, Liberdur et Obelix). La composition de ces deux groupes a été choisi selon les résultats de la figure 34.

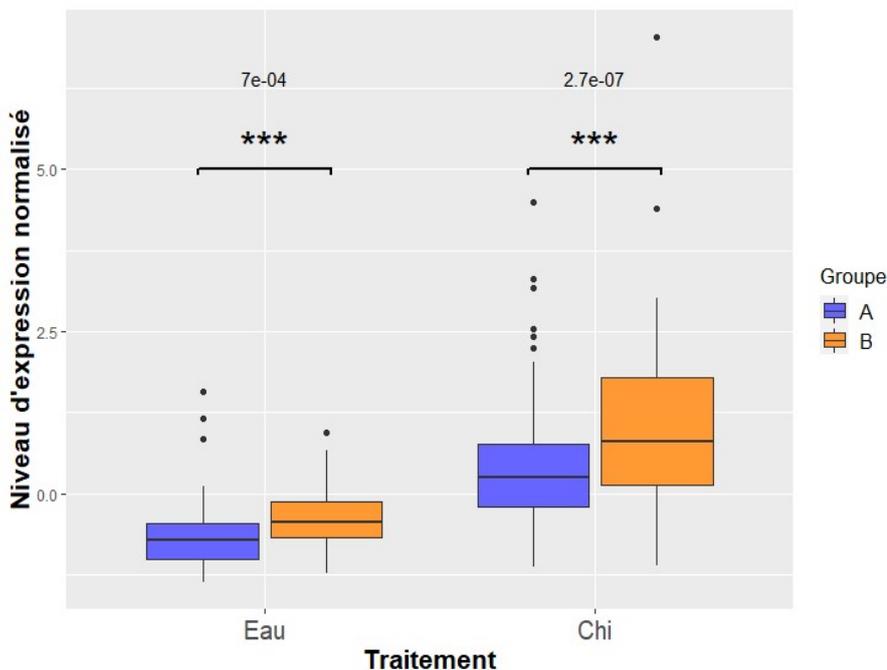


Figure 36 : Différence du niveau d'expression des défenses préformées par groupe de variété et par traitement.

Les groupes de variétés A et B sont les groupes de la figure 36. Le niveau d'expression des gènes de défenses préformées étant standardisé, a été regroupé par traitement. Les étoiles représentent une différence statistique du niveau d'expression global des gènes entre les deux groupes de variétés par traitement (test de Wilcoxon, $\alpha = 0,05$).

La pulvérisation de chitine qui amplifie les défenses qui participeraient à la lutte contre RB et à la réduction des symptômes. En revanche, pour les variétés qui n'ont pas suffisamment de défenses de base, la pulvérisation de chitine amplifie les défenses mais cela ne permettrait pas d'atteindre un seuil suffisant pour lutter contre RB et semblerait même favoriser le développement de RB.

Ces différentes expérimentations et résultats montrent qu'une pulvérisation de chitine 4h avant inoculation induit les défenses préformées de la plante. Cette induction est favorable lors d'attaques de champignons biotrophes ou hémibiotrophes mais contre-productive pour des champignons nécrotrophes.

Ce fonctionnement est modulé par la génétique des variétés de blé qui peut changer ces effets comme ce que l'on a pu voir dans le cas de la rouille brune. Il faudrait bien évidemment faire le même type d'expérimentations plus poussées pour STB et SNB pour lesquelles seules les variétés Pescadou et Casteldoux ont été étudiées, afin de vérifier si la diversité génétique des variétés impacte également l'effet de la chitine pour ces deux maladies.

3. Stimulation de l'immunité basale par la lutte biologique (cas des actinomycètes)

Dans ce projet, j'ai voulu employer les Actinomycètes comme de possibles stimulateurs de l'immunité du blé afin de lutter contre les maladies fongiques foliaires RB, STB et SNB. En collaboration avec Ixchel Campos, étudiante en thèse à l'université de Montpellier dans l'UMR Qualisud, j'ai pu tester différentes souches de *Streptomyces* ainsi que la souche de la solution commerciale Mycostop® que l'on appellera « Myc ». Hormis cette dernière, les souches testées ont été isolées et sélectionnées par Ixchel Campos dans le cadre de sa thèse pour être des PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

La première expérimentation fut de tester l'effet de ces différentes souches de *Streptomyces* sur les symptômes de RB et sur le niveau d'expression des défenses préformées en les ajoutant dans le terreau au moment du semis de blé dur (variété Pescadou) sous forme d'une solution de spores non germées. Les résultats montrent qu'en présence des souches IX-06, IX-09 et IX-48 dans le sol, il y a une augmentation des symptômes de RB (figure 38). Aucune souche testée n'induit une réduction des symptômes. Pour rappel, il s'agit de la variété Pescadou et on a vu précédemment que cette variété a un niveau d'expression faible et que si on induit ses défenses artificiellement (cf chapitre 2_1.2. « chitine »), alors les symptômes de RB augmentent. Il se pourrait donc que ces 3 souches de *Streptomyces* induisent les défenses de la plante. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai extrait les ARN des

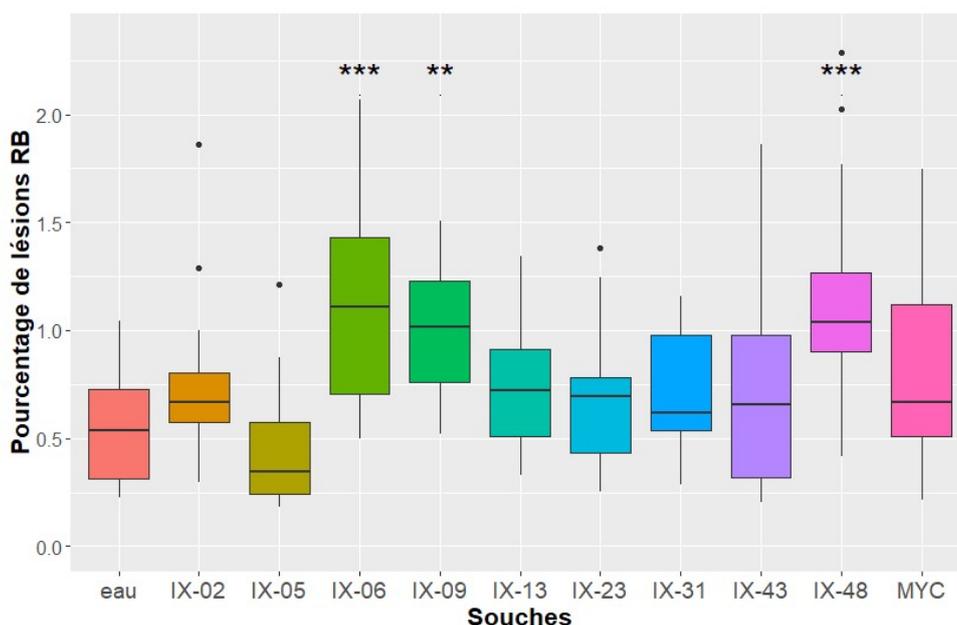


Figure 38 : Effets de l'ajout de souches de *Streptomyces* dans le sol sur les symptômes de RB.

Les boxplots indiquent la distribution des symptômes de RB en pourcentage de lésions par feuille. Les étoiles représentent une différence significative entre la souche de *Streptomyces* et l'eau (condition témoin) calculée par un test de Dunnett.

plantes dont le terreau avait été inoculé par les souches de *Streptomyces* pour évaluer par RT-qPCR le niveau d'expression de gènes de défenses préformées. J'ai standardisé puis regroupé les gènes afin de regarder le niveau global des défenses (figure 39). L'hypothèse n'est pas vérifiée : IX48 n'induit pas les défenses qui ont un niveau équivalent à la condition témoin. IX06 et IX09 induisent un peu les défenses alors que les souches qui induisent les plus les défenses ne provoquent pas de différences de symptômes. Ces analyses ne permettent pas d'établir d'autres hypothèses ou de trouver une souche d'intérêt pour la lutte biologique.

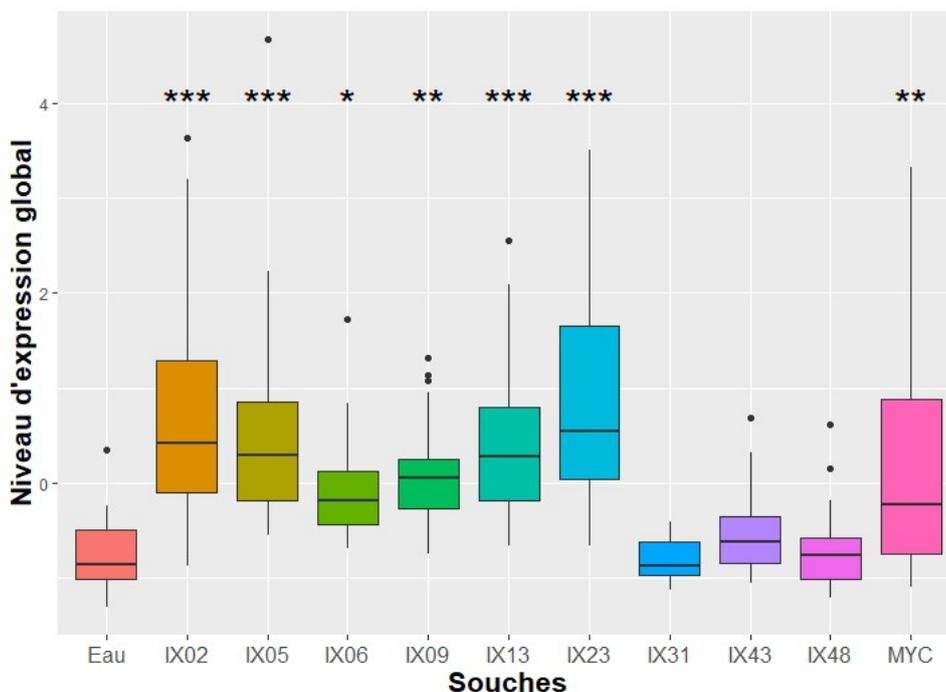


Figure 39 : Effets de l'ajout de souches de *Streptomyces* dans le sol sur le niveau d'expression global des défenses préformées.

Les boxplots indiquent la distribution du niveau des défenses global. Ils regroupent l'expression de 6 gènes (b-Glucanase II, Chitinase I, Chi4, Noduline, POX et PR4) dont les données ont été standardisées. Les étoiles représentent une différence significative entre la souche de *Streptomyces* et l'eau (condition témoin) calculée par un test de Dunnett.

De plus, je ne peux pas vérifier si les souches que j'ai ajoutées au terreau se sont développées ou non car le terreau utilisé n'est pas stérile et les *Streptomyces* représentent plus de 95% des Actinomycètes naturellement présents dans le sol (Barka et al. 2016).

Ces résultats étant difficilement interprétables, les expérimentations suivantes ont été orientées vers les propriétés fongicides des *Streptomyces*. Pour tester l'effet d'une application foliaire sur les symptômes de SNB, il a fallu d'abord déterminer si les spores de *Streptomyces* devaient être appliquées en dormance (non germées) ou à l'état végétatif (germées) pendant les essais *in planta*. L'efficacité de la souche de référence de Mycostop® (MYC) a été évaluée selon les deux modalités contre SNB. On peut voir que seules les spores germées ont réduit significativement de plus de 95% les lésions de SNB sur les feuilles de blé (figure 40). Parallèlement, de son côté Ixchel Campos a réalisé des tests de compétition sur milieu synthétique afin de cribler un plus grand panel de souches de *Streptomyces* précédemment isolées et a sélectionné 5 souches dont MYC inhibant ou réduisant significativement la croissance de SNB et STB sur boîte de Petri (RB étant un biotrophe obligatoire, il n'a pu faire partie de ces tests). Par conséquent, les essais suivants ont été effectués avec des spores germées de IX19, IX23, IX51, IX52 et MYC.

Ces 5 souches et la condition contrôle (eau) ont été inoculées au pinceau sur les feuilles de blé dur (variété Pescadou). Deux jours après, les différents champignons ont été inoculés. Les symptômes obtenus (figure 41) montrent que IX23 et MYC diminuent les moyennes des symptômes de SNB de

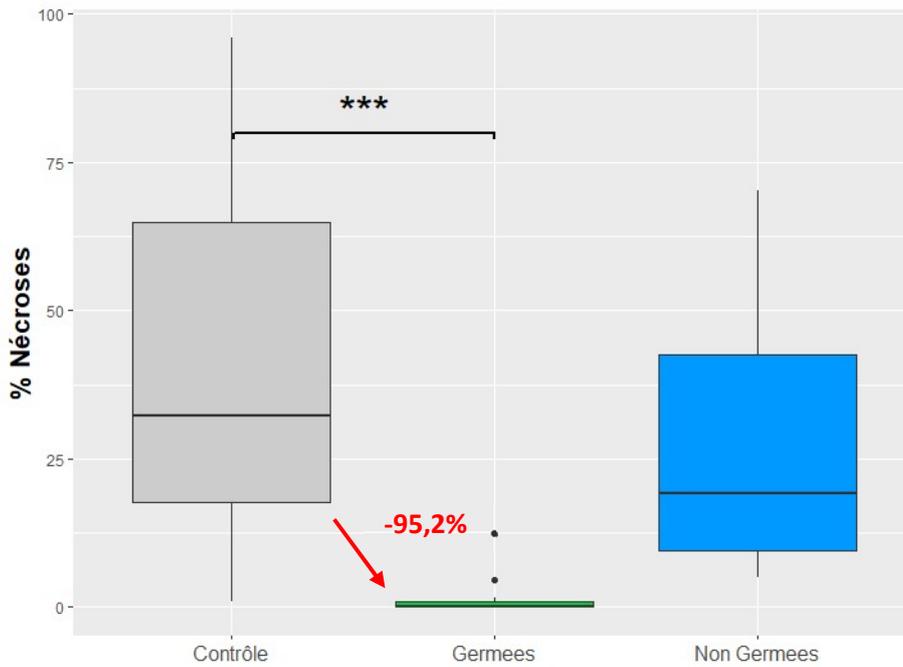
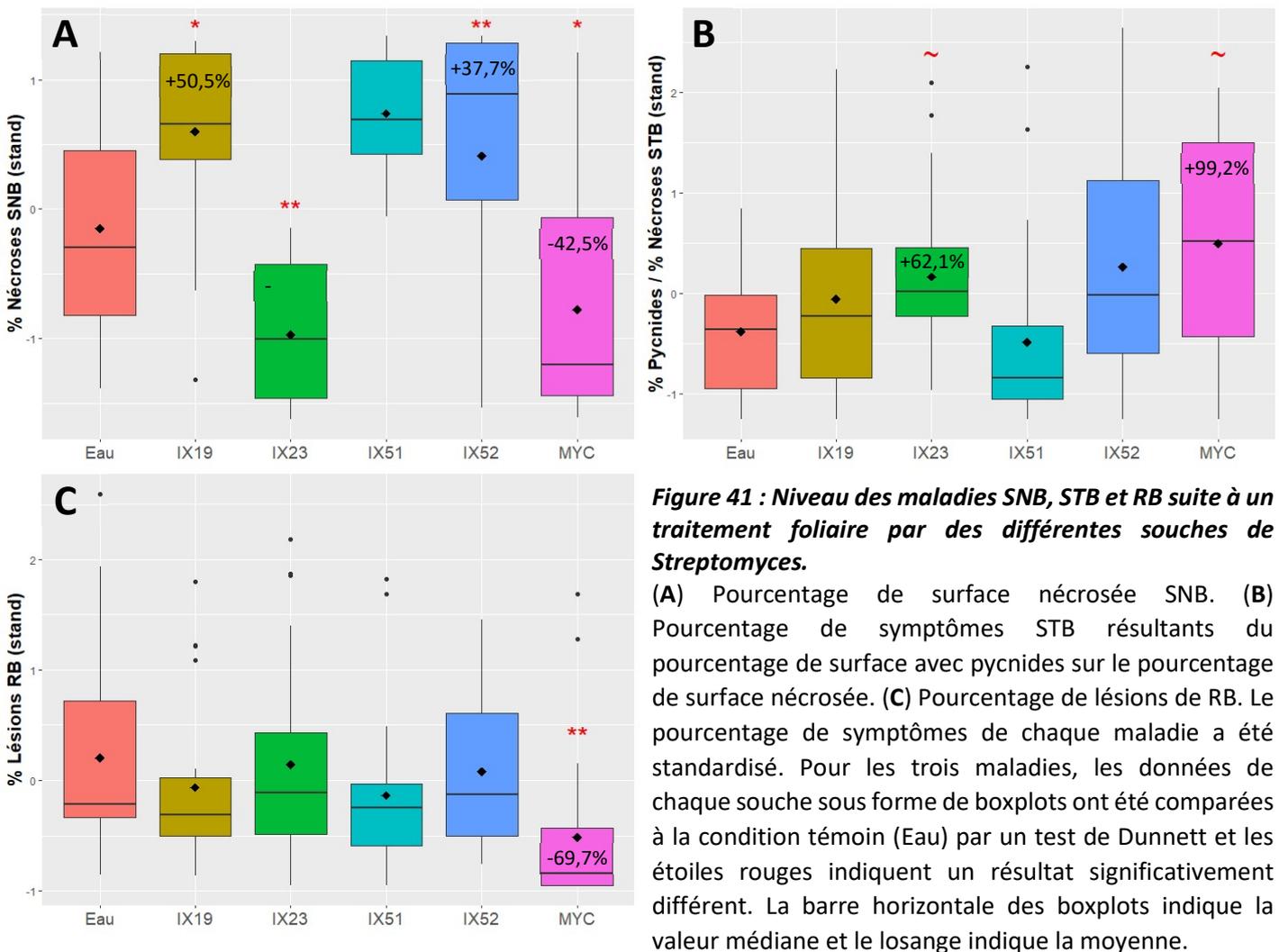


Figure 40 : Effets de l'application de spores (germées ou non germées) de *Streptomyces* (souche MYC) sur les symptômes de SNB.

Le pourcentage de nécroses causé par SNB est évalué suite à trois traitements : de l'eau (contrôle), une solution de spores germées, une solution de spores non germées. La souche utilisée est MYC. Un test de Dunnett a été utilisé pour comparer les deux conditions de spores par rapport à la condition contrôle.



55,3% et 42,5% respectivement, alors que les autres souches augmentent les moyennes des symptômes de SNB. IX23 et MYC augmentent (presque significativement) les moyennes des symptômes de STB de 62,1% et 99,2% respectivement. Aucune souche ne diminue les symptômes de STB. Pour RB, seul MYC diminue significativement les symptômes en faisant chuter la moyenne des symptômes de 69,7%. Les autres souches ont des résultats similaires à la condition contrôle. Donc d'après ces résultats, les souches IX23 et MYC seraient efficaces pour lutter contre SNB mais favoriseraient STB ; ces deux souches ne peuvent être conseillées pour lutter contre la septoriose du blé dur. En revanche, MYC semble être efficace pour lutter contre RB.

Les *Streptomyces* pouvant induire les défenses liées à la SAR et à l'ISR, le niveau d'expression de gènes de défense a été mesuré par RT-qPCR selon les souches. Les feuilles dont ont été extraits les ARN ont été prélevées à T0, c'est-à-dire au moment où les autres feuilles ont été inoculées par les champignons STB, SNB et RB. Seul IX52 induit une augmentation significative du niveau d'expression de ces deux catégories de gènes (figure 42), mais cette induction des défenses ne correspond pas au profil de résistance / sensibilité aux maladies fongiques provoqués par cette souche. Les effets des *Streptomyces* sur le développement de SNB, STB et RB sont peut-être dus à une production de métabolites secondaires fongicides et non pas à une activation des défenses.

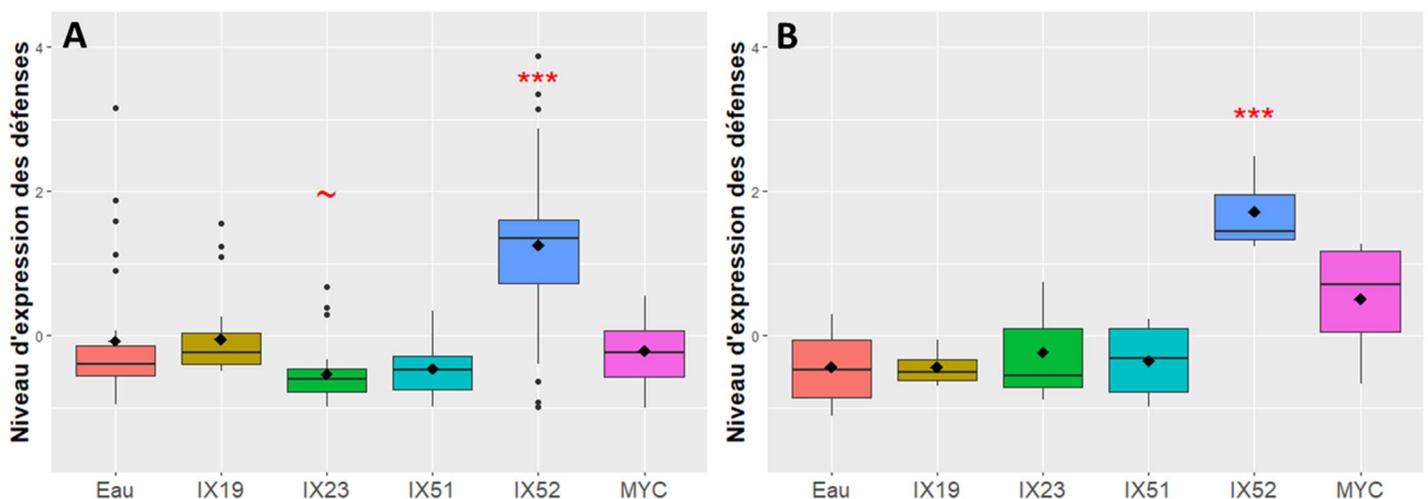


Figure 42 : Niveau d'expression de gènes de défenses préformées selon la souche de *Streptomyces* appliquée sur les feuilles de blé dur (Pescadou)

(A) Niveau d'expression de gènes de défenses induit lors de la SAR. **(B)** Niveau d'expression d'un gène de défenses (LOX) induit lors de la ISR. Les données d'expression ont été standardisée pour avoir une échelle commune.

Bien évidemment, ces observations sont au conditionnel car ces expérimentations n'ont été faites que sur la variété Pescadou et comme on a pu le voir dans plusieurs chapitres précédents, la génétique des variétés pourraient faire que ces observations ne soient que des cas particuliers et pas une généralité. Il faudrait reconduire des expérimentations sur un plus grand nombre de variété afin de s'en assurer.

Discussion générale et perspectives

L'objectif de ce projet était d'acquies une vision d'ensemble sur les différents facteurs intervenant ou pouvant modifier la résistance du blé dur aux principales maladies foliaires fongiques.

Dans un premier temps, nous avons recherché et identifié par génétique d'association des locus conférant une résistance accrue aux principales maladies RB et STB en s'appuyant sur des lignées issues de la population EPO. Ainsi nous avons mis en évidence un QTL de résistance totale à RB (LR_6B11) validé par deux expérimentations indépendantes. Ce QTL étant très grand du fait de la faible densité de marqueurs dans cette région, il ne nous a pas été possible d'assigner cette résistance à un nouveau gène. En effet, au moins deux gènes majeurs de résistance du blé tendre connus sont présents dans cette région, Lr36 et Lr61. Malgré tout, ce QTL demeure d'un grand intérêt car aucune variété élite (parmi les 100 variétés dont nous disposons) n'est résistante à RB. De ce fait, les 26 lignées EPO possédant l'allèle de résistance représentent une ressource génétique pour les sélectionneurs.

Nous avons mis également en évidence deux QTLs de résistance à STB positionnés sur le même chromosome mais distincts. L'un (STB_Nec3A) permet de réduire les nécroses (et par ricochet la quantité de pycnides) de STB mais semble souche spécifique. Bien que très proche, la résistance conférée par ce locus ne semble pas être due au gène majeur *Stb6* mais pourrait impliquer un des 6 autres gènes WAK présents à ce locus. L'autre locus, STB_Pyc3A, permet de réduire considérablement la formation de pycnides sans réduire pour autant les nécroses. En raison du taux de recombinaison élevé dans la population d'EPO (David et al. 2014), et du fait que cette population a continué à évoluer au champ depuis l'échantillonnage en 2010 des lignées que nous avons utilisées, une analyse génétique plus poussée de ces deux locus serait possible en utilisant les descendants actuels de la population EPO. On pourrait peut-être y trouver des accessions avec des allèles recombinants au locus cible et ces lignées pourraient être utilisées dans des programmes de sélection conçus pour augmenter la durabilité de la résistance à STB. En effet, une réduction de la production de pycnides limite non seulement la propagation épidémique, en diminuant le nombre de spores produites, mais réduit également la taille de l'inoculum d'une souche virulente pouvant apparaître au cours de la saison. La combinaison des deux locus pourrait donc conférer une résistance à STB plus durable. En outre, dans le cas du locus STB_Pyc3A, étant donné le faible nombre de gènes candidats (9 gènes dont 4 sont exprimés) présents dans ce dernier locus, il pourrait être intéressant de caractériser certains de ces candidats au niveau fonctionnel. Cependant, lorsque nous avons utilisé ce type d'approche fonctionnelle dans le cadre de ce projet, nous avons dû faire face à un certain nombre de difficultés. En effet nous avons cherché à caractériser des lignées de blé tendre mutantes (RNAi) pour les récepteurs de la chitine, *CERK1* et *CeBIP* (Lee et al., 2014) et des lignées de blé tendre mutantes (OX et RNAi) du facteur de transcription *bZIP*. Malheureusement, il s'est avéré que l'expression de ces récepteurs dans les plantes mutantes RNAi dont nous disposions n'était pas suffisamment diminuée pour voir un phénotype différencié par rapport aux plantes sauvages pour les récepteurs *CERK1* et *CeBip*. Pour le facteur de transcription *bZIP*, un phénotype différentiel entre lignées sauvages et mutantes a pu être démontré mais les moyens de vérification des mutants n'étaient peut-être pas adaptés. Cela m'a permis de me rendre compte de la difficulté de ce type d'approche. Pour une caractérisation fonctionnelle du locus STB_Pyc3A je recommanderais (1) la création de mutants CRISPR-CAS9 qui est une technique bien plus fiable et efficace que des mutants RNAi, (2) de vérifier le phénotype à chaque étape de multiplication, et (3) réaliser en interne la construction des transgènes afin de pouvoir créer les outils adéquats pour la vérification des mutants.

La résistance, en particulier la résistance partielle, peut être perturbée par des stress abiotiques. L'un des stress le plus courant dans les parcelles de blé dur, du fait du changement climatique, est le stress hydrique. De manière intéressante j'ai pu mettre en évidence, sur un panel de 20 variétés de blé dur, que le stress hydrique augmente globalement les symptômes de STB et SNB mais ne semble pas affecter les symptômes de RB. De plus, contrairement à SNB, les symptômes de STB sous stress hydrique dépendent fortement de la génétique des variétés. Par ailleurs, j'ai mis en lumière que chez certaines variétés, le niveau d'expression constitutif des gènes de défense et de tolérance aux stress hydriques était faible. Ces variétés pourraient être plus sensibles à STB du fait d'une mauvaise tolérance du stress hydrique ou d'interférences moléculaires entre les réponses à ces deux stress. Ainsi, si les agriculteurs étaient avertis de cette particularité sur ces variétés, ils pourraient éviter une augmentation de 26% des symptômes en utilisant une irrigation contrôlée pour gérer les maladies sur ces cultures. D'autres variétés semblent mieux gérer le compromis entre tolérance à la sécheresse et défenses avec des gènes exprimés de manière constitutive à un niveau élevé. Ces variétés pourraient être privilégiées par les agriculteurs dans les régions régulièrement touchées par la sécheresse ou qui ne souhaitent pas irriguer leurs cultures.

Ces expérimentations ont également mis en exergue que les symptômes de STB ont peu de variabilité dans nos conditions expérimentales (contrairement à SNB). Afin de caractériser les liens entre tolérance au stress hydrique et résistance à la maladie, il est ainsi possible de sélectionner des variétés différentielles pour leur niveau de défenses préformées, leur tolérance au stress hydrique et leur résistance à STB pour faire des analyses fonctionnelles plus poussées (suivi du métabolisme ou du transcriptome pendant l'infection). De plus, le fait d'avoir mis en évidence un effet d'interaction génotype x traitement, montre que l'on peut envisager des études d'associations telles que celles qui ont pu être mise en œuvre dans l'équipe pour étudier l'effet de la fertilisation azotée sur la résistance du riz à la pyriculariose (Frontini et al., 2021). Cela permettrait de détecter d'éventuels QTL de résistance à STB en condition de stress hydrique et d'identifier des locus qui favorisent une résistance robuste sous stress hydrique. De manière intéressante, parmi les 20 variétés utilisées, 2 possèdent l'allèle de résistance du locus STB-Nec3A que nous avons identifié et le stress hydrique n'a pas modifié la résistance totale de ces variétés à STB. Ce résultat est très intéressant car par exemple, chez le riz, le gène majeur de résistance à la pyriculariose Pi-ta ne fonctionne plus sous stress hydrique (Bidzinski et al., 2016). Il semble donc, que dans la population EPO, il soit déjà possible d'identifier une résistance à STB robuste à la sécheresse, et que nous ayons une diversité suffisante pour identifier des locus de gestion du compromis tolérance à la sécheresse/résistance à STB.

Une autre part importante de ce projet, était de tenter de voir si le biocontrôle et la lutte biologique pouvaient induire une résistance chez le blé face aux maladies STB, SNB et RB. La chitine est un produit de biocontrôle qui, en simulant l'attaque d'un champignon, induit un pic d'expression de gènes des défenses. Ainsi les expérimentations menées ont établi qu'une pulvérisation de chitine quelques heures avant l'inoculation de champignons phytopathogène permettait de réduire les symptômes dans le cas de champignons biotrophes (RB) ou hémibiotrophes (STB) mais provoque une augmentation importante des symptômes dans le cas d'un champignon nécrotrophe (SNB). Cependant ces effets protecteurs dépendent, notamment pour RB, du niveau d'expression de base de gènes des défenses des variétés. Les variétés avec un niveau suffisant de défenses bénéficient de l'effet positif de cette stimulation et montrent une réduction des symptômes. Pour les variétés avec un niveau faible de défenses, la chitine induit les défenses également mais cela ne semble pas suffisant pour protéger les variétés. Le choix de traiter avec la chitine 4h avant l'inoculation n'est peut-être pas optimale chez ces variétés si l'induction des défenses est plus tardive par rapport à l'attaque de RB. Dans tous les cas nous avons mis en évidence que chez ces variétés, on observe une augmentation des symptômes malgré l'induction des défenses par la chitine. Ce phénomène avait déjà été observé au laboratoire

dans le cadre de la réponse à la fertilisation azotée où une augmentation des défenses est observée sans que cela n'empêche une augmentation de sensibilité accrue à la pyriculariose chez le riz ou le blé (Ballini et al., 2013). Une hypothèse pourrait être que face à un niveau faible de défense, *P. recondita sp tritici* infecte et réalise facilement son cycle dans la feuille. Mais avec une petite induction de ce niveau de défenses ou d'un signal lié, qui n'est pas suffisante pour le bloquer, le champignon doit déclencher son arsenal d'effecteurs, ce qui le rendrait bien plus agressif et expliquerait qu'il y ait plus de symptômes suite à la pulvérisation de chitine pour ces variétés. En effet, chez le riz, nous avons mis en évidence que la sensibilité accrue pouvait être liée à des modifications d'agressivité de l'agent pathogène (Bidzinski et al., 2016; Fernandez et al., 2014). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait suivre le niveau d'expression des effecteurs de *P. recondita sp tritici* via une cinétique de prélèvement de feuille lors de l'infection, avec et sans traitement chitine.

Même s'il est tentant pour les entreprises de produits phytosanitaires de commercialiser la chitine comme un SDP (Stimulateur des Défenses Plantes) aidant à lutter contre les épidémies de Septoriose et de Rouille brune, cela nécessiterait dans ce cas d'accompagner la mise sur le marché, d'un conseil particulier. En tout cas nos expériences montrent l'importance d'effectuer certains criblages au laboratoire en amont des tests au champ afin de mieux les orienter. La première question qui a été abordée est l'impact du produit sur de multiples agents pathogènes. La Septoriose du blé dur est provoquée par *Z. tritici* mais aussi par *P. nodorum* en des proportions presque équivalentes. La chitine favorisant le développement des symptômes de SNB, cela n'en fait pas un produit idéal pour lutter contre la septoriose du blé dur car il pourrait augmenter les symptômes si SNB est présent. Lors des essais produits au champ, il faudra donc être particulièrement vigilant sur les souches présentes pour tester l'efficacité. Il serait également intéressant au laboratoire de tester l'efficacité de la chitine en cas de co-infection par les deux espèces de pathogène. La deuxième question en matière de bio-contrôle qui a été abordée est l'effet variétal. Ainsi, même si une majorité des variétés testées répondent favorablement au traitement chitine pour les symptômes de RB, certaines voient leurs symptômes augmenter. Donc il faudrait ainsi tester un panel de variétés commercialisées afin de pouvoir identifier celles pour lesquelles le traitement aurait un intérêt phytosanitaire. Lors de test au champ, l'efficacité serait testée sur certaines familles de variétés pour permettre des préconisations prenant en compte la variété. Cela permettrait de donner des informations éclairées aux agriculteurs afin de les guider dans leurs choix d'utilisation de produits phytosanitaires. Ce type de criblage peut se faire facilement au laboratoire. De la même manière, l'importance du stress hydrique notamment pour la septoriose a été mis en évidence. On peut ainsi se demander quelle serait l'efficacité de la chitine pour contrôler STB sur des plantes ayant subi un stress hydrique.

Pour explorer le possible emploi de la lutte biologique, des souches de *Streptomyces* ont été utilisées. L'ajout de celles-ci dans le sol a permis de mettre en évidence une induction des défenses avec certaines souches mais sans lien avec une modification des symptômes pour nos trois maladies. Il était difficile d'exploiter davantage cette utilisation dans le sol de par les conditions d'expérimentations et nos compétences. Nous nous sommes alors orientés vers une application foliaire de souches de *Streptomyces*. Parmi les souches testées, seule la souche issue de la solution commerciale Mycostop® a modifié significativement les symptômes des trois maladies. Elle a augmenté les symptômes de STB et diminué ceux de SNB et RB. Ceci montre une nouvelle fois l'intérêt d'un criblage multi-pathogènes. Ces observations semblent sans lien avec le niveau d'expression de gènes de défenses préformées. Cependant, comme les *Streptomyces* sont capables d'induire les voies de défenses de la SAR et de l'ISR, je n'ai peut-être pas porté mon attention sur les « bons » gènes de défense. Par ailleurs, l'importance de tester un panel de variété pour ces tests a précédemment été mis en évidence. Ces expérimentations n'ont été réalisées qu'avec la variété Pescadou, qui a un niveau de défenses de base

assez faible et réagit de manière inhabituelle à un SDP comme la chitine. A posteriori, je proposerais de tester les *Streptomyces* sur un panel de variétés choisies pour représenter une diversité de défenses préformée et de capacité à induire ces défenses lors de multiples contraintes (stress hydrique, traitement SDP, fertilisation, ...). De plus, la souche témoin de Mycostop® utilisée est commercialisée particulièrement pour ses propriétés fongicides, c'est pourquoi nous nous sommes orientés vers une application foliaire et nous avons confirmé qu'elle n'agissait pas comme SDP. Ainsi la diminution de symptômes SNB et RB observé est peut-être dû à la présence de métabolites secondaires à caractère fongicide relargués par cette souche dans la feuille. Pour valider cette hypothèse, il faudrait faire une étude biochimique d'un broyat de feuilles avec *Streptomyces* par HPLC par exemple et comparer le profil obtenu avec celui de feuilles témoins sans *Streptomyces*.

Ce projet a révélé que j'étais en mesure de proposer un protocole de criblage au laboratoire permettant, pour un produit SDP, de tester : un effet multipathogène, un effet variétal, un effet compromis croissance/défense, un effet compromis stress hydrique/défense, de vérifier l'inductibilité des défenses et au final la résistance aux maladies fongiques. Suite à ce projet, à l'expertise acquise et termes d'expérimentations et d'analyses, nous avons obtenu un projet avec une entreprise privée qui propose des fertilisants organiques et des biostimulants élaborés à partir de matières premières naturelles (Frayssinet) afin de tester les effets potentiels de leurs produits face à la septoriose du blé. L'idée est notamment de tester : un effet face à différents pathogènes, un effet variétal, un effet sur les compromis croissance/ défense, un effet lorsqu'on combine leur produit avec un traitement SDP. Le criblage dans nos conditions de laboratoire permet d'élaborer les bonnes conditions pour un test au champ : choix de variétés, attendus sur les différents pathogènes, risque en cas de stress hydrique. D'autres projets similaires suivront. Si ce type de demande se généralise, il faudrait que le laboratoire mette en place un criblage efficace comprenant un panel type de variétés regroupant les différents profils trouvés dans ce projet, croisé à un stress hydrique et à un traitement : fertilisant ou SDP selon le produit à tester.

Références Bibliographiques

- Aaronsohn, M.A., 1909. Contribution à l'histoire des céréales. Le Blé, l'Orge et le Seigle à l'état sauvage. Bulletin de la Société Botanique de France 56, 196–203. <https://doi.org/10.1080/00378941.1909.10831391>
- Achuo, E.A., Prinsen, E., Höfte, M., 2006. Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. Plant Pathology 55, 178–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x>
- Agreste- Chiffres et Données, 2019. Pratiques culturales en grandes cultures 2017. www.agreste.agriculture.gouv.fr.
- Agriculture.gouv.fr, 2021. Qu'est-ce que le biocontrôle ? [WWW Document]. <https://agriculture.gouv.fr/quest-ce-que-le-biocontrole>. URL (accessed 3.17.21).
- Aktar-Uz-Zaman, M., Tuhina-Khatun, M., Hanafi, M.M., Sahebi, M., 2017. Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: an overview. Biotechnology & Biotechnological Equipment 31, 431–445. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1304180>
- Aoun, M., Breiland, M., Kathryn Turner, M., Loladze, A., Chao, S., Xu, S.S., Ammar, K., Anderson, J.A., Kolmer, J.A., Acevedo, M., 2016. Genome-Wide Association Mapping of Leaf Rust Response in a Durum Wheat Worldwide Germplasm Collection. The Plant Genome 9. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2016.01.0008>
- Avni, R., Nave, M., Barad, O., Baruch, K., Twardziok, S.O., Gundlach, H., Hale, I., Mascher, M., Spannagl, M., Wiebe, K., Jordan, K.W., Golan, G., Deek, J., Ben-Zvi, B., Ben-Zvi, G., Himmelbach, A., MacLachlan, R.P., Sharpe, A.G., Fritz, A., Ben-David, R., Budak, H., Fahima, T., Korol, A., Faris, J.D., Hernandez, A., Mikel, M.A., Levy, A.A., Steffenson, B., Maccaferri, M., Tuberosa, R., Cattivelli, L., Faccioli, P., Ceriotti, A., Kashkush, K., Pourkheirandish, M., Komatsuda, T., Eilam, T., Sela, H., Sharon, A., Ohad, N., Chamovitz, D.A., Mayer, K.F.X., Stein, N., Ronen, G., Peleg, Z., Pozniak, C.J., Akhunov, E.D., Distelfeld, A., 2017. Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. Science 357, 93–97. <https://doi.org/10.1126/science.aan0032>
- Bajard, P.E., 2016. Petite histoire des produits phytosanitaires. Jardins de France.
- Ballini, E., Nguyen, T.T., Morel, J.-B., 2013. Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. Rice 6, 32. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-32>
- Ballini, E., Tavaud, M., Ducasse, A., Sanchez, D., Paux, E., Kitt, J., Charmet, G., Audigeos, D., Roumet, P., David, J., Morel, J.-B., 2020. Genome wide association mapping for resistance to multiple fungal pathogens in a panel issued from a broad composite cross-population of tetraploid wheat *Triticum turgidum*. Euphytica 216, 92. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02631-9>
- Bancal, M.-O., Ben Slimane, R., Bancal, P., 2016. Zymoseptoria tritici development induces local senescence in wheat leaves, without affecting their monocarpic senescence under two contrasted nitrogen nutrition. Environmental and Experimental Botany 132, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.09.002>
- Banke, S., Peschon, A., McDonald, B.A., 2004. Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* populations based on three DNA sequence loci. Fungal Genetics and Biology 41, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.09.006>
- Berens, M.L., Wolinska, K.W., Spaepen, S., Ziegler, J., Nobori, T., Nair, A., Krüler, V., Winkelmüller, T.M., Wang, Y., Mine, A., Becker, D., Garrido-Oter, R., Schulze-Lefert, P., Tsuda, K., 2019. Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone cross-talk. PNAS 116, 2364–2373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817233116>

- Bidzinski, P., Ballini, E., Ducasse, A., Michel, C., Zuluaga, P., Genga, A., Chiozzotto, R., Morel, J.-B., 2016. Transcriptional Basis of Drought-Induced Susceptibility to the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01558>
- Bonjean, A., 2001. Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Dossier de l'environnement de l'INRA 9.
- Brading, P.A., Verstappen, E.C.P., Kema, G.H.J., Brown, J.K.M., 2002. A Gene-for-Gene Relationship Between Wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria Tritici* Blotch Pathogen. *Phytopathology*® 92, 439–445. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.4.439>
- Brown, J.K.M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., Saintenac, C., 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology, Septoria tritici* blotch disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen *Zymoseptoria tritici* 79, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.017>
- Brown-Guedira, G.L., Singh, S., Fritz, A.K., 2003. Performance and Mapping of Leaf Rust Resistance Transferred to Wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *armeniacum*. *Phytopathology*® 93, 784–789. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.784>
- Brunner, P.C., McDonald, B.A., 2018. Evolutionary analyses of the avirulence effector AvrStb6 in global populations of *Zymoseptoria tritici* identify candidate amino acids involved in recognition. *Molecular Plant Pathology* 19, 1836–1846. <https://doi.org/10.1111/mpp.12662>
- Buckler, E.S., Thornsberry, J.M., Kresovich, S., 2001. Molecular Diversity, Structure and Domestication of Grasses. *Genetics Research* 77, 213–218. <https://doi.org/10.1017/S0016672301005158>
- Caldwell, K.S., Dvorak, J., Lagudah, E.S., Akhunov, E., Luo, M.-C., Wolters, P., Powell, W., 2004. Sequence Polymorphism in Polyploid Wheat and Their D-Genome Diploid Ancestor. *Genetics* 167, 941–947. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.016303>
- Chern, M., Canlas, P.E., Fitzgerald, H.A., Ronald, P.C., 2005. Rice NRR, a negative regulator of disease resistance, interacts with *Arabidopsis* NPR1 and rice NH1. *The Plant Journal* 43, 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02485.x>
- Choulet, F., Alberti, A., Theil, S., Glover, N., Barbe, V., Daron, J., Pingault, L., Sourdille, P., Couloux, A., Paux, E., Leroy, P., Mangenot, S., Guilhot, N., Le Gouis, J., Balfourier, F., Alaux, M., Jamilloux, V., Poulain, J., Durand, C., Bellec, A., Gaspin, C., Safar, J., Dolezel, J., Rogers, J., Vandepoele, K., Aury, J.-M., Mayer, K., Berges, H., Quesneville, H., Wincker, P., Feuillet, C., 2014. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science* 345, 1249721. <https://doi.org/10.1126/science.1249721>
- Cohen, L., Eyal, Z., 1993. The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathology* 42, 737–743. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01560.x>
- Cohen, S.P., Leach, J.E., 2019. Abiotic and biotic stresses induce a core transcriptome response in rice. *Scientific Reports* 9, 6273. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42731-8>
- Collier, S.M., Moffett, P., 2009. NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends in Plant Science* 14, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.001>
- Conn, V., Walker, AR., Franco, CM., 2008. Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 21, 208–218.
- Corbaz R, 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes, Presses polytechniques et universitaires romandes. ed. Lausanne, Suisse.
- Couto, D., Zipfel, C., 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol* 16, 537–552. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>

- Cowger, C., Hoffer, M.E., Mundt, C.C., 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* 49, 445–451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00472.x>
- Cramer, G.R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K., 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11, 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>
- Cruz, M.F.A. da, Diniz, A.P.C., Rodrigues, F.A., Barros, E.G. de, 2011. Foliar application of products on the reduction of blast severity on wheat. *Tropical Plant Pathology* 36, 424–428. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000600014>
- Cuesta, G., García-de-la-Fuente, R., Abad, M., Fornes, F., 2012. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management, Environmental Risks and Problems, Strategies to reduce them through Biotechnology and Engineering* 95, S280–S284. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.023>
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- David, J., Holtz, Y., Ranwez, V., Santoni, S., Sarah, G., Ardisson, M., Poux, G., Choulet, F., Genthon, C., Roumet, P., Tavaud-Pirra, M., 2014. Genotyping by sequencing transcriptomes in an evolutionary pre-breeding durum wheat population. *Mol Breeding* 34, 1531–1548. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0179-z>
- de Jonge, R., Thomma, B.P.H.J., 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology* 17, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.01.002>
- de la Torre, F., Gutiérrez-Beltrán, E., Pareja-Jaime, Y., Chakravarthy, S., Martin, G.B., del Pozo, O., 2013. The Tomato Calcium Sensor Cbl10 and Its Interacting Protein Kinase Cipk6 Define a Signaling Pathway in Plant Immunity. *The Plant Cell* 25, 2748–2764. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113530>
- Dodds, P.N., Rathjen, J.P., 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11, 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dooley, H., Shaw, M.W., Spink, J., Kildea, S., 2016. Effect of azole fungicide mixtures, alternations and dose on azole sensitivity in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 65, 124–136. <https://doi.org/10.1111/ppa.12395>
- Duba, A., Goriewa-Duba, K., Wachowska, U., Duba, A., Goriewa-Duba, K., Wachowska, U., 2018. A Review of the Interactions between Wheat and Wheat Pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium* spp. and *Parastagonospora nodorum*. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 1138. <https://doi.org/10.3390/ijms19041138>
- Duncan, K.E., Howard, R.J., 2000. Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research* 104, 1074–1082. <https://doi.org/10.1017/S0953756299002294>
- Dvorak, J., Akhunov, E.D., 2005. Tempos of Gene Locus Deletions and Duplications and Their Relationship to Recombination Rate During Diploid and Polyploid Evolution in the *Aegilops-Triticum* Alliance. *Genetics* 171, 323–332. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.041632>
- Dvořák, J., Knott, D.R., 1990. Location of a *Triticum speltoides* chromosome segment conferring resistance to leaf rust in *Triticum aestivum*. *Genome* 33, 892–897. <https://doi.org/10.1139/g90-134>
- Ecophytopic.fr, 2021. Liste des produits de biocontrôle [WWW Document]. <https://ecophytopic.fr/reglementation/proteger/liste-des-produits-de-biocontrole>. URL (accessed 3.17.21).
- Egusa, M., Matsui, H., Urakami, T., Okuda, S., Ifuku, S., Nakagami, H., Kaminaka, H., 2015. Chitin Nanofiber Elucidates the Elicitor Activity of Polymeric Chitin in Plants. *Front. Plant Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01098>

- El-Gamal, N.G., El-Mougy, N.S., Abdel-Kader, M.M., Ali Khalil, M.S., 2020. Influence of inorganic salts and chitosan as foliar spray on wheat septoria leaf blotch disease severity under field conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 0, 1–13. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1854971>
- Erland, L.A.E., Turi, C.E., Saxena, P.K., 2016. Serotonin: An ancient molecule and an important regulator of plant processes. *Biotechnology Advances* 34, 1347–1361. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.002>
- Eulgem, T., 2005. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science* 10, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.006>
- Eyal, Z., 1987. The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Faris, J.D., Fellers, J.P., Brooks, S.A., Gill, B.S., 2003. A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus Q in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics* 164, 311–321.
- Feldman, M., 1995. Wheats. *Evolution of crop plants*.
- Feldman, M., Kislev, M.E., 2007. Domestication of emmer wheat and evolution of free-threshing tetraploid wheat. *Israel Journal of Plant Sciences* 55, 207–221. <https://doi.org/10.1560/IJPS.55.3-4.207>
- Feldman, M., Millet, E., 2001. The Contribution of the Discovery of Wild Emmer to an Understanding of Wheat Evolution and Domestication and to Wheat Improvement. *Israel Journal of Plant Sciences* 49, 25–36. <https://doi.org/10.1560/JCMX-WGXM-D40G-BG4P>
- Fernandez, J., Marroquin-Guzman, M., Wilson, R.A., 2014. Mechanisms of Nutrient Acquisition and Utilization During Fungal Infections of Leaves. *Annual Review of Phytopathology* 52, 155–174. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050135>
- Field, B., Jordán, F., Osbourn, A., 2006. First encounters – deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytologist* 172, 193–207. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01863.x>
- Flor, H.H., 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- Fones, H., Gurr, S., 2015. The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology, Septoria tritici blotch disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen Zymoseptoria tritici* 79, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>
- FranceAgriMer, 2020. Marché du blé dur - Union européenne - France (2019/2020). <https://www.franceagrimer.fr/content/download/63307/document/Bilan%20BI%C3%A9%20dur%202019-2020.pdf>. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.010>
- FranceAgriMer, 2018. Variétés des céréales à paille.pdf. <https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/58084/document/Enquete-varietes-cereales.pdf?version=4>.
- Frontini, M., Boisnard, A., Frouin, J., Ouikene, M., Morel, J.B., Ballini, E., 2021. Genome-wide association of rice response to blast fungus identifies loci for robust resistance under high nitrogen. *BMC Plant Biology* 21, 99. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02864-3>
- Geng, X., Zang, X., Li, H., Liu, Z., Zhao, A., Liu, J., Peng, H., Yao, Y., Hu, Z., Ni, Z., Sun, Q., Xin, M., 2018. Unconventional splicing of wheat TabZIP60 confers heat tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Science* 274, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.029>
- Ghaffary, S.M.T., Chawade, A., Singh, P.K., 2018. Practical breeding strategies to improve resistance to Septoria tritici blotch of wheat. *Euphytica* 214, 122. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2205-4>
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., Rathjen, J.P., 2009. AvrPtoB Targets the LysM Receptor Kinase CERK1 to Promote Bacterial Virulence on Plants. *Current Biology* 19, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.054>

- Göhre, V., Robatzek, S., 2008. Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology* 46, 189–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050>
- Goodwin, S.B., M'Barek, S.B., Dhillon, B., Wittenberg, A.H.J., Crane, C.F., Hane, J.K., Foster, A.J., Lee, T.A.J.V. der, Grimwood, J., Aerts, A., Antoniw, J., Bailey, A., Bluhm, B., Bowler, J., Bristow, J., Burgt, A. van der, Canto-Canché, B., Churchill, A.C.L., Conde-Ferràez, L., Cools, H.J., Coutinho, P.M., Csukai, M., Dehal, P., Wit, P.D., Donzelli, B., Geest, H.C. van de, Ham, R.C.H.J. van, Hammond-Kosack, K.E., Henrissat, B., Kilian, A., Kobayashi, A.K., Koopmann, E., Kourmpetis, Y., Kuzniar, A., Lindquist, E., Lombard, V., Maliepaard, C., Martins, N., Mehrabi, R., Nap, J.P.H., Ponomarenko, A., Rudd, J.J., Salamov, A., Schmutz, J., Schouten, H.J., Shapiro, H., Stergiopoulos, I., Torriani, S.F.F., Tu, H., Vries, R.P. de, Waalwijk, C., Ware, S.B., Wiebenga, A., Zwiers, L.-H., Oliver, R.P., Grigoriev, I.V., Kema, G.H.J., 2011. Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLOS Genetics* 7, e1002070. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002070>
- Goutam, U., Kukreja, S., Yadav, R., Salaria, N., Thakur K and Goyal AK., 2015. Recent trends and perspectives of molecular markers against fungal diseases in wheat. *Front. Microbiol.* 6.
- Goyeau, H., Berder, J., Czerepak, C., Gautier, A., Lanen, C., Lannou, C., 2012. Low diversity and fast evolution in the population of *Puccinia triticina* causing durum wheat leaf rust in France from 1999 to 2009, as revealed by an adapted differential set. *Plant Pathology* 61, 761–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02554.x>
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., Moore, G., 2006. Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* 439, 749–752. <https://doi.org/10.1038/nature04434>
- Gutiérrez, L., Germán, S., Pereyra, S., Hayes, P.M., Pérez, C.A., Capettini, F., Locatelli, A., Berberian, N.M., Falconi, E.E., Estrada, R., Fros, D., Gonza, V., Altamirano, H., Huerta-Espino, J., Neyra, E., Orjeda, G., Sandoval-Islas, S., Singh, R., Turkington, K., Castro, A.J., 2015. Multi-environment multi-QTL association mapping identifies disease resistance QTL in barley germplasm from Latin America. *Theor Appl Genet* 128, 501–516. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2448-y>
- Harding, S.A., Oh, S.-H., Roberts, D.M., 1997. Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *The EMBO Journal* 16, 1137–1144. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.6.1137>
- Haudry, A., Cenci, A., Ravel, C., Bataillon, T., Brunel, D., Poncet, C., Hochu, I., Poirier, S., Santoni, S., Glémin, S., David, J., 2007. Grinding up Wheat: A Massive Loss of Nucleotide Diversity Since Domestication. *Mol Biol Evol* 24, 1506–1517. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm077>
- Hauelsen, J., Möller, M., Eschenbrenner, C.J., Grandaubert, J., Seybold, H., Adamiak, H., Stukenbrock, E.H., 2017. Extremely flexible infection programs in a fungal plant pathogen. *bioRxiv* 229997. <https://doi.org/10.1101/229997>
- Hayden, B., 1990. Nimrods, piscators, pluckers, and planters: The emergence of food production. *Journal of Anthropological Archaeology* 9, 31–69. [https://doi.org/10.1016/0278-4165\(90\)90005-X](https://doi.org/10.1016/0278-4165(90)90005-X)
- Hayes, L.E., Sackett, K.E., Anderson, N.P., Flowers, M.D., Mundt, C.C., 2015. Evidence of Selection for Fungicide Resistance in *Zymoseptoria tritici* Populations on Wheat in Western Oregon. *Plant Disease* 100, 483–489. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0214-RE>
- Hehir, J.G., Connolly, C., O'Driscoll, A., Lynch, J.P., Spink, J., Brown, J.K.M., Doohan, F., Mullins, E., 2018. Temporal and spatial field evaluations highlight the importance of the presymptomatic phase in supporting strong partial resistance in *Triticum aestivum* against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 67, 573–583. <https://doi.org/10.1111/ppa.12780>
- Helluy, S., Holmes, J.C., 2005. Parasitic manipulation: further considerations. *Behavioural Processes* 68, 205–210.
- Hernandez-Garcia, C.M., Finer, J.J., 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science* 217–218, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007>

- Herrera-Foessel, S.A., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., Crossa, J., Yuen, J., Djurle, A., 2006. Effect of Leaf Rust on Grain Yield and Yield Traits of Durum Wheats with Race-Specific and Slow-Rusting Resistance to Leaf Rust. *Plant Disease* 90, 1065–1072. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1065>
- Hong, J.K., Yun, B.-W., Kang, J.-G., Raja, M.U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y., Loake, G.J., 2008. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany* 59, 147–154. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm244>
- Hoorn, R.A.L. van der, Kamoun, S., 2008. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell* 20, 2009–2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R., Gornicki, P., 2002. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *PNAS* 99, 8133–8138. <https://doi.org/10.1073/pnas.072223799>
- Huerta-Espino, J., Singh, R.P., Germán, S., McCallum, B.D., Park, R.F., Chen, W.Q., Bhardwaj, S.C., Goyeau, H., 2011. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* 179, 143–160. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x>
- Huerta-Espino, J., Singh, R.P., Herrera-Foessel, S.A., Perez-Lopez, J.B., 2009. Phenotypic variation among Leaf Rust isolates From Durum wheat In Northwestern Mexico.
- Ifuku, S., Ikuta, A., Egusa, M., Kaminaka, H., Izawa, H., Morimoto, M., Saimoto, H., 2013. Preparation of high-strength transparent chitosan film reinforced with surface-deacetylated chitin nanofibers. *Carbohydrate Polymers* 98, 1198–1202. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.033>
- Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., Saimoto, H., 2011. Preparation of Chitin Nanofibers from Mushrooms. *Materials* 4, 1417–1425. <https://doi.org/10.3390/ma4081417>
- Ifuku, S., Saimoto, H., 2012. Chitin nanofibers: preparations, modifications, and applications. *Nanoscale* 4, 3308–3318. <https://doi.org/10.1039/C2NR30383C>
- Ishihara, A., Matsukawa, T., Nomura, T., Sue, M., Oikawa, A., Okazaki, Y., Tebayashi, S., 2015. Involvement of tryptophan-pathway-derived secondary metabolism in the defence responses of grasses. *Amino acids in higher plants* 362–389.
- Jansen, R.C., 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135, 205.
- Jantasuriyarat, C., Vales, M.I., Watson, C.J.W., Riera-Lizarazu, O., 2004. Identification and mapping of genetic loci affecting the free-threshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 108, 261–273. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1432-8>
- Jayaraj, J., Rahman, M., Wan, A., Punja, Z.K., 2009. Enhanced resistance to foliar fungal pathogens in carrot by application of elicitors. *Annals of Applied Biology* 155, 71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00321.x>
- Jijakli, H., Lepoivre, P., 2003. *La lutte biologique en phytopathologie*, De Boeck et presse agronomique. ed. Bruxelles, Belgique.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jonge, R. de, Esse, H.P. van, Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., Krol, S. van der, Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J., Thomma, B.P.H.J., 2010. Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science* 329, 953–955. <https://doi.org/10.1126/science.1190859>
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N., 2006. Plant Cells Recognize Chitin Fragments for Defense Signaling through a Plasma Membrane Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11086–11091.
- Kema, G.H.J., Yu, D., Rijkenberg, F.H.J., Shaw, M.W., Baayen, R.P., 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *APS* 86, 777–786.

- Keon, J., Antoniw, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J.L., Baker, J.M., Beale, M.H., Hammond-Kosack, K., Rudd, J.J., 2007. Transcriptional Adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to Programmed Cell Death (PCD) of Its Susceptible Wheat Host. *MPMI* 20, 178–193. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0178>
- Kettles, G.J., Kanyuka, K., 2016. Dissecting the Molecular Interactions between Wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00508>
- Kildea, S., Ransbotyn, V., Khan, MR., Fagan, B., Leonard, G., Mullins, E., Doohan, FM., 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat - ScienceDirect. *Biological Control* 47, 37–45.
- Kliebenstein, D.J., West, M.A.L., van Leeuwen, H., Kim, K., Doerge, R.W., Michelmore, R.W., St. Clair, D.A., 2006. Genomic Survey of Gene Expression Diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 172, 1179–1189. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.049353>
- Kolmer, J., 2013. Leaf Rust of Wheat: Pathogen Biology, Variation and Host Resistance. *Forests* 4, 70–84. <https://doi.org/10.3390/f4010070>
- Kthiri, D., Loladze, A., MacLachlan, P.R., N'Diaye, A., Walkowiak, S., Nilsen, K., Dreisigacker, S., Ammar, K., Pozniak, C.J., 2018. Characterization and mapping of leaf rust resistance in four durum wheat cultivars. *PLoS ONE* 13, e0197317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197317>
- Kurusu, T., Hamada, J., Hamada, H., Hanamata, S., Kuchitsu, K., 2010. Roles of calcineurin B-like protein-interacting protein kinases in innate immunity in rice. *Plant Signaling & Behavior* 5, 1045–1047. <https://doi.org/10.4161/psb.5.8.12407>
- Lee, S.J., Lee, M.Y., Yi, S.Y., Oh, S.K., Choi, S.H., Her, N.H., Choi, D., Min, B.W., Yang, S.G., Harn, C.H., 2002. PPI1: A Novel Pathogen-Induced Basic Region-Leucine Zipper (bZIP) Transcription Factor from Pepper. *MPMI* 15, 540–548. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.6.540>
- Lee, W.-S., Rudd, J.J., Hammond-Kosack, K.E., Kanyuka, K., 2014. *Mycosphaerella graminicola* LysM Effector-Mediated Stealth Pathogenesis Subverts Recognition Through Both CERK1 and CEBiP Homologues in Wheat. *MPMI* 27, 236–243. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0201-R>
- Légifrance.gouv.fr, 2020. Article L253-6 - Code rural et de la pêche maritime - Légifrance [WWW Document]. https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000037556952/. URL (accessed 3.17.21).
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S., 2000. The Cradle of Agriculture. *Science* 288, 1602–1603. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1602>
- Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., 2004. Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 38, 800–809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02085.x>
- Lucas, J., 2003. Resistance to QoI fungicides: implications for cereal disease management in Europe. *Pesticide Outlook* 14, 268. <https://doi.org/10.1039/b314850p>
- Maccaferri, M., Harris, N.S., Twardziok, S.O., Pasam, R.K., Gundlach, H., Spannagl, M., Ormanbekova, D., Lux, T., Prade, V.M., Milner, S.G., Himmelbach, A., Mascher, M., Bagnaresi, P., Faccioli, P., Cozzi, P., Lauria, M., Lazzari, B., Stella, A., Manconi, A., Gnocchi, M., Moscatelli, M., Avni, R., Deek, J., Biyiklioglu, S., Frascaroli, E., Corneti, S., Salvi, S., Sonnante, G., Desiderio, F., Marè, C., Crosatti, C., Mica, E., Özkan, H., Kilian, B., De Vita, P., Marone, D., Joukhadar, R., Mazzucotelli, E., Nigro, D., Gadaleta, A., Chao, S., Faris, J.D., Melo, A.T.O., Pumphrey, M., Pecchioni, N., Milanesi, L., Wiebe, K., Ens, J., MacLachlan, R.P., Clarke, J.M., Sharpe, A.G., Koh, C.S., Liang, K.Y.H., Taylor, G.J., Knox, R., Budak, H., Mastrangelo, A.M., Xu, S.S., Stein, N., Hale, I., Distelfeld, A., Hayden, M.J., Tuberosa, R., Walkowiak, S., Mayer, K.F.X., Ceriotti, A., Pozniak, C.J., Cattivelli, L., 2019a. Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. *Nature Genetics* 51, 885–895. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0381-3>
- Maccaferri, M., Harris, N.S., Twardziok, S.O., Pasam, R.K., Gundlach, H., Spannagl, M., Ormanbekova, D., Lux, T., Prade, V.M., Milner, S.G., Himmelbach, A., Mascher, M., Bagnaresi, P., Faccioli, P., Cozzi, P., Lauria, M.,

- Lazzari, B., Stella, A., Manconi, A., Gnocchi, M., Moscatelli, M., Avni, R., Deek, J., Biyiklioglu, S., Frascaroli, E., Corneti, S., Salvi, S., Sonnante, G., Desiderio, F., Marè, C., Crosatti, C., Mica, E., Özkan, H., Kilian, B., De Vita, P., Marone, D., Joukhadar, R., Mazzucotelli, E., Nigro, D., Gadaleta, A., Chao, S., Faris, J.D., Melo, A.T.O., Pumphrey, M., Pecchioni, N., Milanese, L., Wiebe, K., Ens, J., MacLachlan, R.P., Clarke, J.M., Sharpe, A.G., Koh, C.S., Liang, K.Y.H., Taylor, G.J., Knox, R., Budak, H., Mastrangelo, A.M., Xu, S.S., Stein, N., Hale, I., Distelfeld, A., Hayden, M.J., Tuberosa, R., Walkowiak, S., Mayer, K.F.X., Ceriotti, A., Pozniak, C.J., Cattivelli, L., 2019b. Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. *Nature Genetics* 51, 885–895. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0381-3>
- Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Mantovani, P., Demontis, A., Massi, A., Ammar, K., Kolmer, J.A., Czembor, J.H., Ezrati, S., Tuberosa, R., 2010. Association mapping of leaf rust response in durum wheat. *Mol Breeding* 26, 189–228. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9353-0>
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K.E., Thomma, B.P.H.J., Rudd, J.J., 2011. Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat. *Plant Physiology* 156, 756–769. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176347>
- Martin, A., Wadley, G., 2000. The origins of agriculture - a biological perspective and a new hypothesis. *Journal of the Australasian College of Nutritional and Environmental Medicine* 19, 3.
- McAinsh, M.R., Hetherington, A.M., 1998. Encoding specificity in Ca²⁺ signalling systems. *Trends in Plant Science* 3, 32–36. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01150-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01150-3)
- McDonald, B.A., Stukenbrock, E.H., 2016. Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371, 20160026. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0026>
- Mehra, L.K., Adhikari, U., Ojiambo, P.S., Cowger, C., 2019. Septoria nodorum blotch of wheat. *The Plant Health Instructor*.
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P.H.J., Talbot, N.J., 2012. Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by *Magnaporthe oryzae* Is Necessary for Rice Blast Disease. *The Plant Cell* 24, 322–335. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092957>
- Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., 2009. Functional Analysis of Transcription Factors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* 50, 1232–1248. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp075>
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., Shibuya, N., 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *PNAS* 104, 19613–19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>
- Mohr, P.G., Cahill, D.M., 2003. Abscisic acid influences the susceptibility of Arabidopsis thaliana to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biol.* 30, 461–469. <https://doi.org/10.1071/fp02231>
- Mori, N., Liu, Y.-G., Tsunewaki, K., 1995. Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA. 2. Wild tetraploid wheats. *Theoret. Appl. Genetics* 90, 129–134. <https://doi.org/10.1007/BF00221006>
- Morrissey, J.P., Osbourn, A.E., 1999. Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 708–724. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.708-724.1999>
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J.T., 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1237–1247. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1237>
- Newitt, J.T., Prudence, S.M.M., Hutchings, M.I., Worsley, S.F., 2019. Biocontrol of Cereal Crop Diseases Using Streptomycetes. *Pathogens* 8, 78. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020078>

- Nobori, T., Tsuda, K., 2019. The plant immune system in heterogeneous environments. *Current Opinion in Plant Biology* 50, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.003>
- Nourozian, J., Etebarian, H.R., Khodakaramian, G., 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *J. Sci. Technol.*, 29–38.
- Okada, A., Okada, K., Miyamoto, K., Koga, J., Shibuya, N., Nojiri, H., Yamane, H., 2009. OsTGAP1, a bZIP Transcription Factor, Coordinately Regulates the Inductive Production of Diterpenoid Phytoalexins in Rice. *J. Biol. Chem.* 284, 26510–26518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.036871>
- Oliver, R.P., Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S., 2012. *Stagonospora nodorum*: From Pathology to Genomics and Host Resistance. *Annual Review of Phytopathology* 50, 23–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173019>
- Omara, R.I., El-Kot, G.A., Fadel, F.M., Abdelaal, K.A., Saleh, E.M., 2019. Efficacy of certain bioagents on pathophysiological characters of wheat plants under wheat leaf rust stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106, 102–108.
- Orellana, S., Yañez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., González, E., Ruiz-Lara, S., Casaretto, J.A., 2010. The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant, Cell & Environment* 33, 2191–2208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02220.x>
- Ors, M.E., Randoux, B., Selim, S., Siah, A., Couleaud, G., Maumené, C., Sahmer, K., Halama, P., Reignault, P., 2018. Cultivar-dependent partial resistance and associated defence mechanisms in wheat against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 67, 561–572. <https://doi.org/10.1111/ppa.12760>
- Pal, K.K., McSpadden Gardener, B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. PHI. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Zhang, L., Suh, J.-W., 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 9621–9636. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5206-1>
- Palazzini, J.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2007. Potential biocontrol agents for *Fusarium head blight* and deoxynivalenol production in wheat - ScienceDirect. *Crop Protection* 26, 1702–1710.
- Parada, R.Y., Egusa, M., Aklog, Y.F., Miura, C., Ifuku, S., Kaminaka, H., 2018. Optimization of nanofibrillation degree of chitin for induction of plant disease resistance: Elicitor activity and systemic resistance induced by chitin nanofiber in cabbage and strawberry. *International Journal of Biological Macromolecules* 118, 2185–2192. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.089>
- Passion céréales, 2019. Des chiffres et des céréales. www.passioncereales.fr.
- Perello, A.E., Moreno, M.V., Monaco, C., Simon, M.R., Cordo, C., 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. *BioControl* 54, 113–112.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C., Bakker, P.A., 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52, 347–375.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5, 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Ponomarenko, A., Goodwin, S.B., Kema, G.H.J., 2011. *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat. *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat.
- Poovalah, B.W., Du, L., Wang, H., Yang, T., 2013. Recent Advances in Calcium/Calmodulin-Mediated Signaling with an Emphasis on Plant-Microbe Interactions. *Plant Physiology* 163, 531–542. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220780>

- Prasch, C.M., Sonnewald, U., 2015. Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environmental and Experimental Botany*, Plant signalling mechanisms in response to the environment 114, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.020>
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., Jones, J.D.G., 2001. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *The EMBO Journal* 20, 5556–5567. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.20.5556>
- Roux, F., Voisin D, Badet T, Balagué C, Barlet X, Huard-Chauveau C, Roby D, Raffaele S, 2014. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* 15, 427–432.
- Saijo, Y., Loo, E.P., 2020. Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist* 225, 87–104. <https://doi.org/10.1111/nph.15989>
- Saijo, Y., Loo, E.P., Yasuda, S., 2018. Pattern recognition receptors and signaling in plant–microbe interactions. *The Plant Journal* 93, 592–613. <https://doi.org/10.1111/tpj.13808>
- Saintenac, C., Lee, W.-S., Cambon, F., Rudd, J.J., King, R.C., Marande, W., Powers, S.J., Bergès, H., Phillips, A.L., Uauy, C., Hammond-Kosack, K.E., Langin, T., Kanyuka, K., 2018. Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* 50, 368. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0051-x>
- Salwan, R., Sharma, V., 2018. Chapter 11 - The Role of Actinobacteria in the Production of Industrial Enzymes, in: Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 165–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00011-4>
- Sánchez-Vallet, A., McDonald, M.C., Solomon, P.S., McDonald, B.A., 2015a. Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology*, *Septoria tritici* blotch disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen *Zymoseptoria tritici* 79, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.001>
- Sánchez-Vallet, A., Mesters, J.R., Thomma, B.P.H.J., 2015b. The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev* 39, 171–183. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu003>
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.J., Thomma, B.P., Author, J.R.M., 2013. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife*.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Schmid, M., Van Breusegem, F., Eberl, L., 2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment* 29, 909–918.
- Schulz, P., Herde, M., Romeis, T., 2013. Calcium-Dependent Protein Kinases: Hubs in Plant Stress Signaling and Development. *Plant Physiology* 163, 523–530. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222539>
- Sharma, R., De Vleeschauwer, D., Sharma, M.K., Ronald, P.C., 2013. Recent Advances in Dissecting Stress-Regulatory Crosstalk in Rice. *Molecular Plant* 6, 250–260. <https://doi.org/10.1093/mp/sss147>
- Shetty, N.P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G.H.J., Collinge, D.B., Jørgensen, H.J.L., 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist* 174, 637–647. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02026.x>
- Shibuya, N., Minami, E., 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59, 223–233. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0364>
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., Shibuya, N., 2010. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal* 64, 204–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04324.x>
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58, 221–227. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>

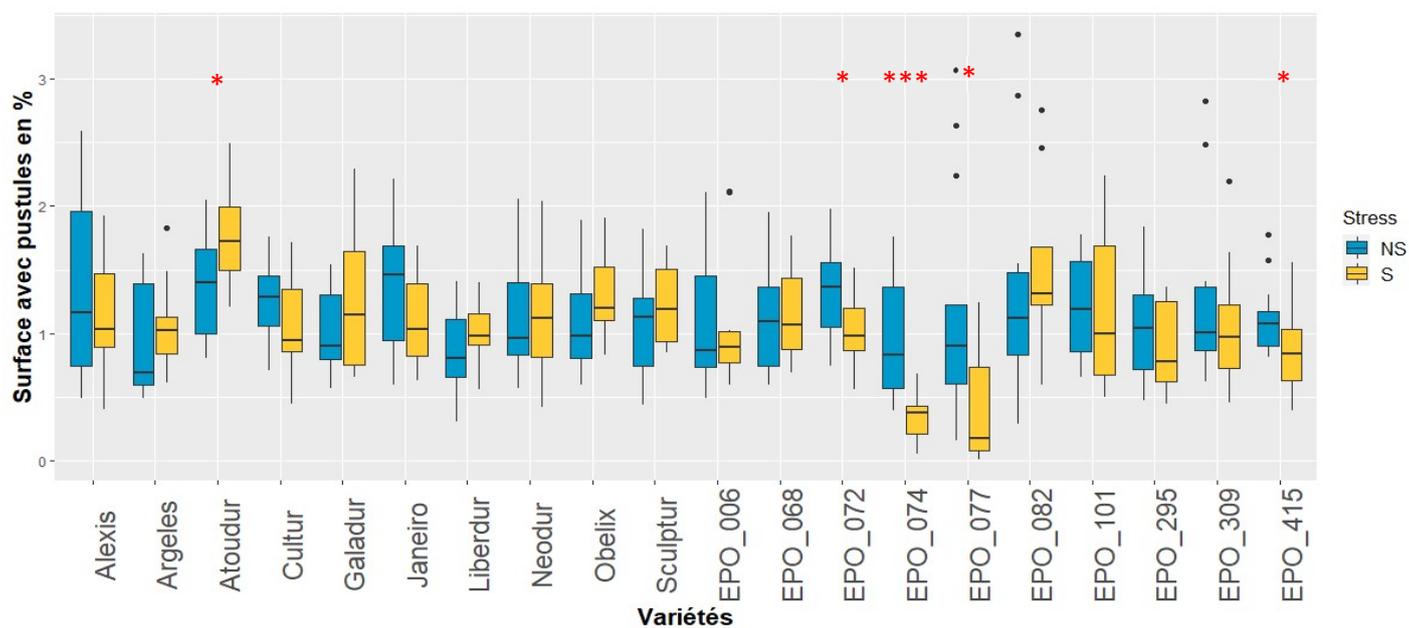
- Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H., Shibuya, N., 2012. Functional Characterization of CEBiP and CERK1 Homologs in Arabidopsis and Rice Reveals the Presence of Different Chitin Receptor Systems in Plants. *Plant Cell Physiol* 53, 1696–1706. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs113>
- Shinya, T., Nakagawa, T., Kaku, H., Shibuya, N., 2015. Chitin-mediated plant–fungal interactions: catching, hiding and handshaking. *Current Opinion in Plant Biology* 26, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.032>
- Siah, A., Deweer, C., Duyme, F., Sanssené, J., Durand, R., Halama, P., Reignault, P., 2010. Correlation of in planta endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathology* 59, 661–670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02303.x>
- Simonetti, M.C., Bellomo, M.P., Laghetti, P., Perrino, P., Simeone, R., Blanco, A., 1999. Quantitative trait loci influencing free-threshing habit in tetraploid wheats. *Genetic Resources and Crop Evolution* 267–271.
- Simons, K.J., Fellers, J.P., Trick, H.N., Zhang, Z., Tai, Y.-S., Gill, B.S., Faris, J.D., 2006. Molecular Characterization of the Major Wheat Domestication Gene Q. *Genetics* 172, 547–555. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.044727>
- Singh, H., 2014. Management of Plant Pathogens with Microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 443–454. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55120>
- Solomon, P.S., Lowe, R.G.T., Tan, K.-C., Waters, O.D.C., Oliver, R.P., 2006. *Stagonospora nodorum*: cause of stagonospora nodorum blotch of wheat. *Molecular Plant Pathology* 7, 147–156. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00326.x>
- Sousa, J.A., Olivares, F.L., 2016. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 3, 24. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0073-5>
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V.T., Govind, G., Seiler, C., Kohli, A., 2012. Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* 506, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.076>
- Stacey, G., Shibuya, N., 1997. Chitin recognition in rice and legumes. *Plant and Soil* 194, 161–169. <https://doi.org/10.1023/A:1004244104972>
- Stenberg, J., 2017. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management - ScienceDirect. *Trends in Plant Science* 22, 759–769.
- Stukenbrock, E.H., McDonald, B.A., 2008. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 46, 75–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.010708.154114>
- Tak, H., Mhatre, M., 2013. Cloning and molecular characterization of a putative bZIP transcription factor VvbZIP23 from *Vitis vinifera*. *Protoplasma* 250, 333–345. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0417-3>
- Tang, D., Wang, G., Zhou, J.-M., 2017. Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *The Plant Cell* 29, 618–637. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00891>
- Thuillet, A.-C., Bataillon, T., Poirier, S., Santoni, S., David, J.L., 2005a. Estimation of Long-Term Effective Population Sizes Through the History of Durum Wheat Using Microsatellite Data. *Genetics* 169, 1589–1599. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029553>
- Thuillet, A.-C., Bataillon, T., Poirier, S., Santoni, S., David, J.L., 2005b. Estimation of Long-Term Effective Population Sizes Through the History of Durum Wheat Using Microsatellite Data. *Genetics* 169, 1589–1599. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029553>
- Tian, H., MacKenzie, C.I., Rodriguez-Moreno, L., Berg, G.C.M. van den, Chen, H., Rudd, J.J., Mesters, J.R., Thomma, B.P.H.J., 2021. Three LysM effectors of *Zymoseptoria tritici* collectively disarm chitin-triggered plant immunity. *Molecular Plant Pathology* 22, 683–693. <https://doi.org/10.1111/mpm.13055>
- Torriani, S.F.F., Melichar, J.P.E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., Courbot, M., 2015. *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology*, *Septoria tritici*

- blotch disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen *Zymoseptoria tritici* 79, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.010>
- Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire, X., Adrian, M., 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00592>
- Tsuda, K., Katagiri, F., 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., Katagiri, F., 2009. Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLOS Genetics* 5, e1000772. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>
- Umemura, K., Ogawa, N., Shimura, M., Koga, J., Usami, H., Kono, T., 2003. Possible role of phytocassane, rice phytoalexin, in disease resistance of rice against the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 899–902. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.899>
- Valade, R., 2017. Septoriose : un contexte épidémiologique précisé. *Perspectives Agricoles*.
- Van Loon, L. c., Rep, M., Pieterse, C. m. j., 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Vergne, E., Grand, X., Ballini, E., Chalvon, V., Saindrenan, P., Tharreau, D., Nottéghem, J.-L., Morel, J.-B., 2010. Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology* 10, 206. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-206>
- Vilmorin, H., 1880. Les meilleurs blés, description et culture des principales variétés de froments d’hiver et de printemps., Vilmorin-Andrieux et cie. ed. Vilmorin-Andrieux et cie.
- Vurukonda, S.S.K.P., Giovanardi, D., Stefani, E., 2018. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 952. <https://doi.org/10.3390/ijms19040952>
- Wang, L., Tsuda, K., Sato, M., Cohen, J.D., Katagiri, F., Glazebrook, J., 2009. Arabidopsis CaM Binding Protein CBP60g Contributes to MAMP-Induced SA Accumulation and Is Involved in Disease Resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLOS Pathogens* 5, e1000301. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000301>
- Welch, T., Feechan, A., Kildea, S., 2018. Effect of host resistance on genetic structure of core and accessory chromosomes in Irish *Zymoseptoria tritici* populations. *Eur J Plant Pathol* 150, 139–148. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1259-9>
- Willcox, G., 2020. De la cueillette à l’agriculture : une histoire de la domestication des végétaux. *Pour la science* 274.
- Wittenberg, A.H.J., Lee, T.A.J. van der, M’Barek, S.B., Ware, S.B., Goodwin, S.B., Kilian, A., Visser, R.G.F., Kema, G.H.J., Schouten, H.J., 2009. Meiosis Drives Extraordinary Genome Plasticity in the Haploid Fungal Plant Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLOS ONE* 4, e5863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005863>
- www.Bayer-Agri.fr, 2019. Rouille brune : 10% à 40% de pertes possibles en blé : Bayer-Agri [WWW Document]. URL https://www.bayer-agri.fr/cultures/rouille-brune-10-a-40-de-pertes-possibles-en-ble_1277/ (accessed 8.30.21).
- Xuan, T.D., Minh, T.N., Anh, L.H., Khanh, T.D., 2016. Allelopathic momilactones A and B are implied in rice drought and salinity tolerance, not weed resistance. *Agron. Sustain. Dev.* 36, 52. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0383-9>
- Xue, A.G., Voldeng, H.D., Savard, M.E., Fedak, G., Tian, X., Hsiang, T., 2009. Biological control of fusarium head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM94. *Can. J. Plant Pathol* 31, 169–179.

- Yang, J., Wang, M., Li, W., He, X., Teng, W., Ma, W., Zhao, X., Hu, M., Li, H., Zhang, Y., Tong, Y., 2019. Reducing expression of a nitrate-responsive bZIP transcription factor increases grain yield and N use in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 17, 1823–1833. <https://doi.org/10.1111/pbi.13103>
- Yin, H., Du, Y., Dong, Z., 2016. Chitin Oligosaccharide and Chitosan Oligosaccharide: Two Similar but Different Plant Elicitors. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00522>
- Young ND, 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34, 479–501.
- Yu, X., Feng, B., He, P., Shan, L., 2017. From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annual Review of Phytopathology* 55, 109–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>
- Zeng, Z.B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136, 1457.
- Zhan, J., Linde, C.C., Jürgens, T., Merz, U., Steinebrunner, F., McDONALD, B.A., 2005. Variation for neutral markers is correlated with variation for quantitative traits in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* 14, 2683–2693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02638.x>
- Zhan, J., McDonald, B.A., 2004. The interaction among evolutionary forces in the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 41, 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.01.006>
- Zhang, J., Zhou, J.-M., 2010. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Molecular Plant* 3, 783–793. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq035>
- Zhang, Lina, Zhang, Lichao, Xia, C., Zhao, G., Liu, J., Jia, J., Kong, X., 2015. A novel wheat bZIP transcription factor, TabZIP60, confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* 153, 538–554. <https://doi.org/10.1111/ppl.12261>
- Zhang, Z., Belcram, H., Gornicki, P., Charles, M., Just, J., Huneau, C., Magdelenat, G., Couloux, A., Samain, S., Gill, B.S., Rasmussen, J.B., Barbe, V., Faris, J.D., Chalhoub, B., 2011. Duplication and partitioning in evolution and function of homoeologous Q loci governing domestication characters in polyploid wheat. *PNAS* 108, 18737–18742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110552108>
- Ziani, K., Ursúa, B., Maté, J.I., 2010. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection* 29, 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.03.002>
- Zipfel, C., 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology* 35, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>
- Zohary, D., Hopf, M., 2000. *Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley.*, Oxford University Press. ed.

Annexe 1

Effet du stress hydrique sur les symptômes de RB sur 20 variétés de blé dur.



NS = pas de stress, S = stress hydrique. L'étoile rouge correspond à une différence significative entre les symptômes NS et les symptômes S, obtenues par un test statistique de Wilcoxon : `compare_means(RB~Stress, data=D, group.by = "Variete", p.adjust.method = "bonferroni", method = "wilcox.test")` avec un seuil $\alpha < 0,05$.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Immunité du blé dur, modulation par la génétique et l'environnement.

Aurélie DUCASSE

25 / 11 / 2021

RÉSUMÉ

La France est le premier producteur de céréales en Europe. Mais cette production est menacée chaque année par des épidémies de champignons phytopathogènes qui créent d'importantes pertes de rendement et de qualité du grain. Le lancement du projet Ecophyto devait permettre le développement de la recherche d'alternative aux fongicides chimiques. Cependant, l'essentiel des recherches est conduit sur le blé tendre alors que les avancées sont peu transposables sur blé dur du fait d'une génétique très différente entre ces deux espèces et une spécificité des souches pathogènes. Le but de cette étude est d'acquies une vision d'ensemble des différents moyens de lutte du blé dur face aux principaux agents pathogènes : *Puccinia recondita f. sp. tritici* causant la rouille brune (RB), *Zymoseptoria tritici* et *Parastagonosporum nodorum* causant les forment STB et SNB de la septoriose.

Un des moyens serait d'améliorer la génétique des variétés en trouvant de nouveaux gènes de résistance aux maladies. Dans cette étude, 1 QTL de résistance à RB et 2 QTLs de résistance à STB ont été détecté et validé. Cette étude a montré qu'il existait un réservoir de gènes de résistance dans des variétés anciennes de blé dur afin d'améliorer génétiquement la résistance aux champignons phytopathogènes.

Un autre moyen serait de stimuler l'immunité basale de la plante via le biocontrôle au travers des substances naturelles ou des micro-organismes. Un traitement par un simulateur des défenses des plantes (chitine) 4h avant l'inoculation des champignons permet de réduire globalement de 18% les symptômes de STB mais augmentent de 48% ceux de SNB. Pour lutter contre la RB, les résultats sont moins tranchés car ce traitement permet de réduire les symptômes de certaines variétés et les augmente pour d'autres. Un traitement par des micro-organismes antagonistes a mis en évidence une activité de stimulation de défense des plantes mais qui ne s'est pas traduit par une résistance accrue. Cette étude a permis de mettre en évidence que pour stimuler l'immunité du blé dur par des produits de biocontrôle, il fallait prendre en compte les effets variétaux et avoir une approche multi-pathogène.

Cependant l'efficacité de ces moyens de lutte peut être conditionnée par le milieu de culture et notamment par des contraintes abiotiques, tel que la sécheresse qui peuvent impacter l'immunité du blé. L'effet de cette contrainte sur les trois maladies (STN, SNB et RB) a été testé sur 20 variétés de blé dur. Toutes variétés confondues, il ne semble pas y avoir d'effet sur les symptômes de RB, mais on observe que pour la septoriose (STB et SNB), la quantité de symptôme augmente de 62% et 16% respectivement lors d'une contrainte hydrique. Là encore, le facteur variétal est à prendre en compte car une analyse de variance indique que 44,2% de la variabilité des symptômes de STB sont expliqués par un modèle avec interaction Stress*Variété et 43,4% pour les symptômes de SNB. Afin de comprendre comment la contrainte hydrique pouvait impacter la résistance, le niveau d'expression de gènes de défenses a été mesuré sous stress hydrique. Deux catégories sont observées : les variétés dont les défenses sont réprimées par le stress hydrique mais qui ne présentent pas toutes une augmentation des symptômes, et les variétés tolérantes à la sécheresse dont le niveau des défenses est maintenu stable. L'impact de la sécheresse n'est donc probablement pas dû à un seul mécanisme.

MOTS-CLÉS : blé dur, septoriose, rouille brune, QTL de résistance, stress hydrique, biocontrôle.