

Olivier ROBERT<sup>1\*</sup>, Amir M. GOHARI<sup>4</sup>, Valérie LAURENT<sup>1</sup>, Laure DUCHALAIS<sup>2</sup>, Delphine HOURCADE<sup>3</sup>, Denis BEGHIN<sup>1</sup>, Ellen GOUEMAND<sup>1</sup>, Sarrah Ben M'BAREK<sup>4</sup>, Gert H. J. KEMA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bioplante-Florimond Desprez, BP41, 59242 Cappelle en Pévèle

<sup>2</sup> Bioplante-R2n, Route d'Epincy, 28150 Louville la Chenard

<sup>3</sup> ARVALIS-Institut du végétal, 3 rue Joseph & Marie Hackin, 75116 Paris

<sup>4</sup> Plant Research International, Biointeractions and Plant Health, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

\* Coordinateur : Olivier ROBERT, olivier.robert@florimond-desprez.fr

## 1. Introduction

La septoriose est une maladie du blé qui peut être provoquée par deux champignons : *Zymoseptoria tritici* et *Stagonospora nodorum*. *Z. tritici* est désormais devenue majoritaire en Europe et provoque souvent de fortes diminutions du rendement. Cette maladie du blé est donc classée parmi les plus dévastatrices en Europe de l'Ouest et chaque année environ 300 millions d'euros sont dépensés pour lutter contre ce parasite.

Malgré la disponibilité de 18 gènes de résistance et leur application potentielle en sélection (Goodwin, 2007), la lutte contre la maladie est actuellement réalisée principalement par des fongicides. Toutefois, seuls les azoles et les strobilurines sont disponibles et leur efficacité sur les populations naturelles présentes au champ se réduit un peu plus chaque année. Ce phénomène a été récemment confirmé par le développement de résistances aux strobilurines chez *Z. tritici* et de sa propagation rapide dans toute l'Europe (Sierotzki et al. 2005). De même, cette diminution de l'efficacité des strobilurines est associée à celle de certains azoles (Fraaije et al. 2007). La chute de l'efficacité de ces matières actives représente une menace pour l'agriculteur qui veut maintenir durablement un bon rendement en blé. Ainsi, il est probable que l'amélioration génétique de la résistance sera la principale réponse durable à l'évolution de cette maladie.

*Z. tritici* a un style de vie dimorphique. Le champignon prolifère en conidiogénèses blastiques dans des conditions riches alors que la croissance est filamenteuse dans des conditions pauvres en éléments nutritifs et sur les tissus foliaires. L'infection commence par la formation des hyphes qui entrent par les stomates des feuilles de blé, sans différencier les structures infectieuses (Kema et al. 1996; Mehrabi et al. 2006; Keon et al. 2007). Le développement

ultérieur est biotrophe, intercellulaire et asymptomatique pendant environ 8 jours. Puis, le processus de développement est rapide et nécrotrophe, impliquant une abondante dégradation de la paroi cellulaire. Ce phénomène a été une source de spéculation sur un rôle actif potentiel pour les composés toxiques au cours de la pathogenèse (Kema et al. 1996 ; Perrone et al. 2000 ; Keon et al. 2007) notamment parce qu'elle aboutit à la dégradation massive des tissus du mésophylle. Cette dégradation de la partie interne de la feuille permet l'augmentation rapide de la biomasse fongique et la formation de pycnides, les organes de fructification asexuée caractéristiques de taches nécrotiques macroscopique (Kema et al. 1996 ; Duncan et Howard, 2000; Sierotzki et al. 2005).

De récentes découvertes sur les pathogènes nécrotrophes du blé *Pyrenophora tritici-repentis* (Ptr) et *Stagonospora nodorum*, ont montré que les toxines protéiques sont des déterminants importants de la pathogénicité (Friesen et al. 2007, 2008). Ces toxines ont des cibles sur les chloroplastes ce qui expliquerait leur inductibilité à la lumière (Manning et al. 2009). Ces constatations ont conduit à la détermination d'un modèle inverse du modèle gène pour gène avec des toxines sélectives de l'hôte (HSTs) et des gènes de sensibilité aux toxines de la plante hôte.

Ainsi, l'équipe de Gert Kema a identifié la première toxine (MgTox1) issue du substrat de culture de l'isolat IPO323 de Septoriose (*Z. tritici*). Cette toxine, lorsqu'elle est infiltrée sur des feuilles, provoque des nécroses foliaires qui sont similaires aux symptômes foliaires habituellement observés avec des tests de résistance. Par contre, les résultats sont observables 4 jours après infiltration alors que 3-4 semaines sont nécessaires pour interpréter le test de résistance classique. Outre la rapidité d'obtention des symptômes nécrotiques, cette méthode semble présenter d'autres avantages comme une fiabilité accrue de

l'évaluation de la résistance (ou plus exactement de l'absence de sensibilité) des plantes. Un autre avantage en faveur de l'utilisation des toxines est qu'elles pourraient ne pas être spécifiques de chaque isolat : L'utilisation des toxines serait alors un nouvel outil pertinent pour estimer facilement et précocement la résistance des futures variétés.

Ainsi, dans ce projet, nous nous proposons pour développer et valider ce nouvel outil :

- 1) D'identifier les protéines SSP (small secreted proteins) constituant la toxine MgTox1 et d'identifier celle(s) qui jouent un rôle dans la pathogénicité (nécroses foliaires) de la septoriose.
- 2) De valider au champ les protéines SSP sur un panel de génotypes résistants et sensibles.

## 2. Matériels et méthodes

### ***Identification des protéines SSP de la toxine de l'isolat IPO323***

#### Analyse Bioinformatique de l'ADNc de *Z. tritici*

Un des critères appliqué à la sélection des protéines candidates concerne leur taille qui doit être inférieure à 300 acides aminés. Un travail de recherche de gènes candidats ainsi que l'utilisation de l'algorithme de PexFinder pour de l'analyse d'EST ont été utilisés pour identifier des protéines SSP candidates. Les protéines sans motif GPI ni domaine trans-membranaire et qui sont riches en cystéine ont été retenues. Un tri des protéines candidates a été complété par une comparaison de séquences avec celles de la base de données EST accessibles *via* l'interface JGI genome (<http://genome.jgi-psf.org/Mycgr3.home.html>).

#### Analyse Protéomique

Le substrat de culture de IPO323 a été obtenu après culture de l'isolat IPO323 en boîte de Petri sur un milieu V8/PDA pendant 5 jours. Le pathogène est ensuite agité en milieu liquide à 27°C (100rpm) pendant 3 jours. Le substrat de culture est ensuite filtré par du papier Wathmann, puis avec un filtre 0,45µm et dialysé en utilisant des tubes 7KDa.

La séparation et l'identification des protéines SSP du substrat de culture ont été obtenues grâce à une analyse par chromatographie liquide à

échange d'ion de type Fast Performance liquid Chromatography (FPLC).

#### Analyse QTL

L'analyse QTL a été effectuée sur une population de 163 isolats de *Z. tritici* issus du croisement IPO323 x IPO95052. Ces isolats ont été phénotypés sur les variétés de blé dur Volcani447, Zenati, Bouteille, Bidi17 et sur les variétés de blé tendre blé tendre Shafir, Gerek, Taichung29, Obelisk. L'isolat IPO323 est avirulent sur les lignées de blé dur mais développe des symptômes sur le blé tendre tandis que c'est l'inverse pour IPO95052.

### ***Test de résistance au champ***

#### Matériel Végétal

Treize variétés ont été testées (Tableau I) durant les 3 années du programme sur 3 sites avec 2 répétitions : Boigneville (Arvalis), Bersée (F. Desprez) et Louville la Chenard (R2n).

#### Toxine

Le substrat de culture de IPO323 contenant un ensemble de protéines SSP a été produit et testé la première année du programme. La protéine SSP127 a été testée les deux années suivantes selon plusieurs protocoles d'inoculation. Un témoin négatif avec de l'eau a été inoculé pour vérifier que la méthode d'inoculation n'était pas responsable des nécroses foliaires.

#### Méthode d'inoculation

Les méthodes d'inoculation appliquées ont été :

- l'infiltration : La toxine est injectée sous pression dans la feuille à l'aide d'une seringue.
- L'abrasion : La toxine est appliquée au doigt (ganté) avec de la célite (1g/10ml). Une pression modérée et un mouvement de va et vient sont appliqués afin d'abimer la cuticule de la feuille.
- Le badigeonnage : Les feuilles sont recouvertes de la toxine par un badigeonnage au pinceau. Avec cette méthode la feuille était soit laissée intacte, soit pliée dans le sens transversal.

Pour les 3 méthodes, les limites de diffusion de la toxine dans la feuille sont marquées au feutre indélébile.

Dix feuilles par génotype, par répétition, par méthode d'inoculation et par lieu ont ainsi été inoculées. Les feuilles ont été prélevées 4 jours après inoculation et ont été numérisées pour noter

le pourcentage de surface nécrosée par rapport à la surface inoculée avec le logiciel SCANAREA.

### 3. Résultats et discussions

#### Identification des protéines SSP

##### Analyse Bioinformatique

266 protéines SSP avec une taille inférieure à 300 acides aminés et plusieurs résidus cystéine ont été identifiées. Vingt quatre de ces protéines prédites possèdent un domaine transmembranaire en dehors de la séquence du peptide signal et ont été exclues de la liste. Après avoir confronté nos données de séquence avec celles de la base de donnée EST JGI, la liste de protéines candidates a été réduite à 68. Cependant, dix protéines SSP supplémentaires ont été ajoutées pour leurs caractéristiques particulières comme leur richesse élevée en cystéine. Au final, ce sont 78 protéines SSP qui ont été retenues comme effecteurs candidats de la pathogénicité de la septoriose.

##### Analyse Protéomique

Sur les 78 gènes codant pour les protéines SSP, 93% sont issues de données EST obtenues soit sous conditions *in vitro* soit sous condition *in planta*. Nous avons analysé leur activité par RT-qPCR pour déterminer leur profil d'expression durant la phase de pathogénicité. Tous les gènes ont été transcrits *in planta* et leur profil correspond clairement aux différentes phases d'infection (biotrophe (2-4 dpi<sup>1</sup>), nécrotrophe (>8 dpi) ou de transition entre les deux phases (8 dpi)). Ainsi, les gènes sont surexprimés durant la phase biotrophe pour un groupe de protéines SSP (incluant SSP142) (entre 2 et 4 dpi) (figure 1a). Dans le groupe de la SSP15, les gènes ne sont surexprimés que durant la phase de transition entre la phase biotrophe et la phase nécrotrophe (à 8 dpi) (figure 1b). Les gènes surexprimés durant la phase nécrotrophe du champignon (comme SSP44) le sont à partir de 8 dpi avec un pic à 8 ou 12 dpi puis ce phénomène est suivi une décroissance de l'activité des gènes jusqu'à 20 dpi (figures 2a et 2b).

Au final 42% des protéines SSP analysées sont spécifiquement produits durant la phase

nécrotrophe, tandis que 21% sont synthétisés durant les deux phases (biotrophe et nécrotrophe). 18% sont faiblement transcrits durant tout le processus d'infection.

##### Validations des protéines SSP15 et SSP18

Comme ces deux protéines ont été détectées en grandes quantité à 8 dpi (SSP15 : 120x et SSP18 : 13x), il nous semblait intéressant de valider leur action comme effecteur de pathogénicité en inhibant les gènes codant pour ces protéines. Ainsi, trois mutants « knock-out » indépendants ont été générés par recombinaison homéologue, pour chacun des deux gènes. Les mutants et le type sauvage de IPO323 montrent des symptômes foliaires similaires en serre (figure 3) à 21 dpi sur 12 variétés de blé : ce résultat prouve que ces deux protéines ne sont pas des effecteurs de pathogénicité.

##### Analyse QTL

Sept QTL ont été identifiés sur les chromosomes 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 13 de *Z. tritici* (tableau II). Un QTL majeur ressort sur le chromosome 5 en expliquant jusqu'à 48.5% de la variance phénotypique. 84 gènes prédits colocalisent au niveau de ce QTL.

#### Tests au champ

##### Comparaison entre notation visuelle / notation numérisée des symptômes

La numérisation des feuilles inoculées nous semblait importante pour traiter un grand nombre d'échantillons. Si le gain de temps offert par la numérisation des feuilles est toute relative, cette numérisation présente l'avantage de pouvoir revenir sur les observations à *posteriori*. La corrélation observée ( $R^2=0.76$ ) entre les deux types de notation permet d'envisager l'utilisation de l'outil numérique pour la quantification des symptômes.

##### Pertinence du protocole d'inoculation

En 2013, le protocole d'abrasion est celui qui provoque, en moyenne, les symptômes les plus importants. Celui-ci est suivi de l'infiltration par seringue (Figure 4). Le badigeonnage au pinceau (avec ou sans pliure de la feuille) ne permet pas d'obtenir des symptômes aussi importants qu'avec les deux autres méthodes. Toutefois, selon l'année et le lieu, le protocole d'inoculation des protéines sur les feuilles varie en efficacité, prouvant ainsi qu'aucune des techniques

<sup>1</sup> dpi : jour après inoculation

d'inoculation utilisées n'est pas réellement applicable au champ.

#### Effet de la Toxine et relation avec la résistance variétale

L'observation des symptômes obtenus par infiltration ou abrasion révèle un polymorphisme entre les variétés. Ce polymorphisme n'est absolument pas corrélé avec le niveau de résistance des variétés à la septoriose qui a été observé au champ. Ainsi la variété Nogal qui est très résistante présente des symptômes importants avec la toxine chez R2n (abrasion) alors que la lignée FD3 qui normalement est très sensible à la septoriose au champ présente peu de symptômes avec la toxine chez Arvalis (abrasion). Pour compléter cette absence de relation entre le niveau de résistance variétale à la septoriose et les symptômes obtenus avec la toxine, nous avons observé, dans plusieurs cas, des nécroses foliaires supérieures avec de l'eau comparé à la toxine. Il est clair que le protocole d'inoculation de la toxine et l'application par l'expérimentateur de ces protocoles jouent un rôle significatif dans l'apparition des symptômes puisque l'application du témoin neutre (eau) peut provoquer des symptômes supérieurs à ceux observés avec la toxine. Au final, malgré deux années de test, nous n'avons pas réussi à mettre au point un protocole fiable qui soit indépendant de l'effet expérimentateur et qui donne des résultats cohérents avec le niveau de résistance des variétés à la septoriose (et plus particulièrement à IPO323).

## 4. Conclusion

---

La synthèse entre l'analyse bioinformatique, l'analyse protéomique et l'analyse de QTL a permis d'identifier 18 protéines SSP qui sont des candidates comme effecteurs de la pathogénicité de *Z. tritici*. Ces protéines sont secrétées soit durant la phase biotrophe, soit durant la phase nécrotrophe (ou durant les deux phases) de développement du champignon. Ces résultats représentent une avancée importante dans la connaissance des mécanismes de pathogénicité de ce champignon.

Concernant le test de résistance au champ, nous avons rencontré deux problèmes majeurs :

- Nous n'avons réussi à produire qu'une seule protéine en quantité suffisante pour nos tests au champ durant la durée du programme.
- La méthode d'inoculation de la protéine ou du substrat de culture reste perfectible car elle est trop sujette aux variations dues à l'expérimentateur ou à la méthode d'inoculation.

Ainsi, si la production de nombreuses protéines SSP semble pouvoir être solutionnée rapidement, la mise au point d'un protocole d'inoculation fiable reste un problème majeur qui devra être résolu par des mises au point supplémentaires si nous voulons pouvoir utiliser ces effecteurs pour des tests prédictifs de la résistance variétale à la septoriose.

Tableau I : Liste des 13 variétés ou lignées utilisées pour les tests au champ

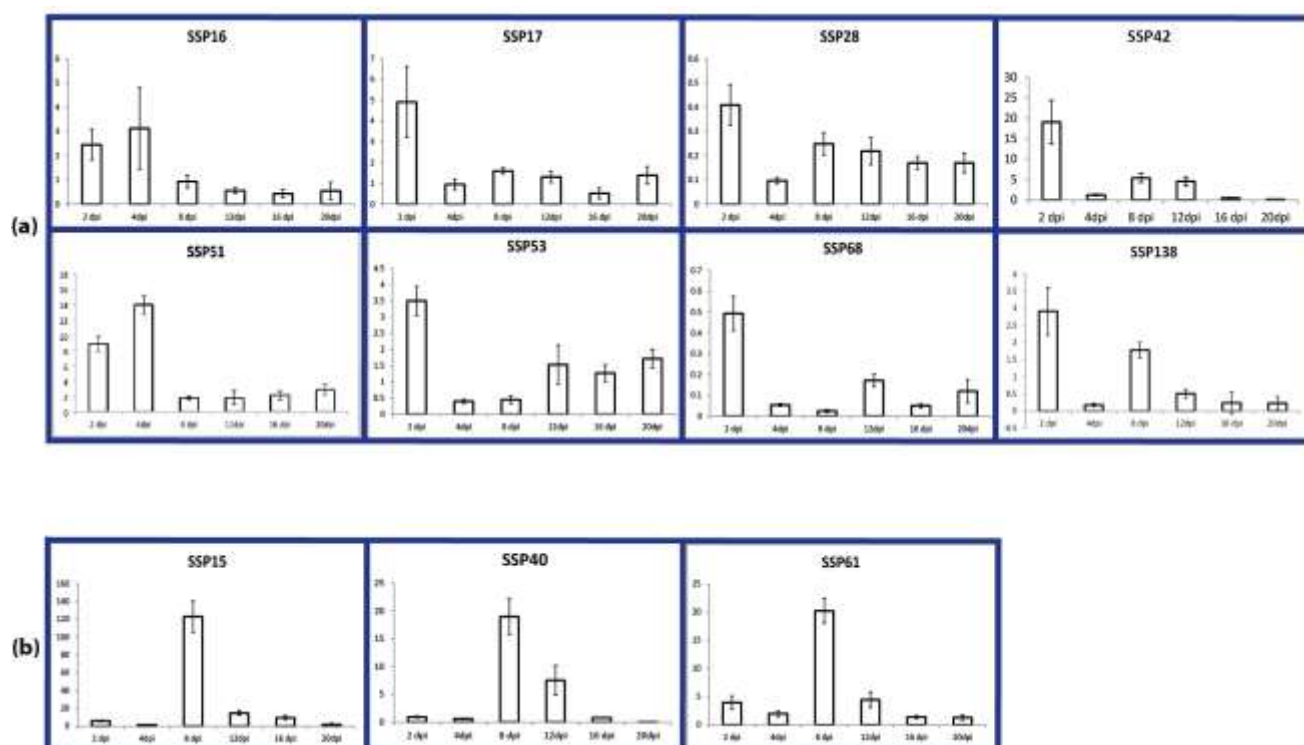
Variétés
Apache
Baguette11
Balance
Bermude
Cordiale
FD12
FD3
Nogal
Nuage
Robigus
SE11
Soissons
Timber

Tableau II : Tableau récapitulatif des QTL identifiés dans la population d'isolats issue du croisement IPO323/IPO95052

Chromosomes	QTL	Source (LOD score)	Variance (%)	Nombre de gènes prédits
<b>Chromosome 2</b>	QTL-P1	BT Taichung 29 (LOD $\geq$ 5.70)	15.1	586
<b>Chromosome 3</b>	QTL-P2	BT Shafir (LOD $\geq$ 3.22)	8.6	69
<b>Chromosome 4</b>	QTL-P3	BD Volcani 447 (LOD $\geq$ 7.64)	12.4	581
<b>Chromosome 5</b>	QTL-P4.1	BT Shafir (LOD $\geq$ 7.20)	23.5	84
	QTL-P4.2	BD Zenati Bouteille (LOD $\geq$ 14.83)	45.2	84
	QTL-P4.3	BD Volcani (LOD $\geq$ 16.60) 447	47.9	84
	QTL-P4.4	BD Bidi 17 (LOD $\geq$ 17.12)	48.5	84
	QTL-P5	BT Obelisk (LOD $\geq$ 4.80)	16.7	...
<b>Chromosome 6</b>	QTL-P6	BD Bidi 17 (LOD $\geq$ 3.33)	6.2	158
<b>Chromosome 7</b>	QTL-P7	BT Obelisk (LOD $\geq$ 3.76)	10.9	24
	QTL-P8.1	BD Bidi 17 (LOD $\geq$ 2.91)	5.4	...
	QTL-P8.2	BD Zenati Bouteille (LOD $\geq$ 3.89)	7.7	...
<b>Chromosome 13</b>	QTL-P9.1	BT Gerek (LOD $\geq$ 3.06)	14.1	106
	QTL-P9.2	BT Taichung 29 (LOD $\geq$ 7.61)	28.3	106

BT : Blé Tendre, BD : Blé Dur

Figure 1 : Niveau d'expression des gènes codant pour les protéines SSP : Cas des gènes exprimés durant la phase biotrophe (a) et durant la transition biotrophe / nécrotrophe (b)



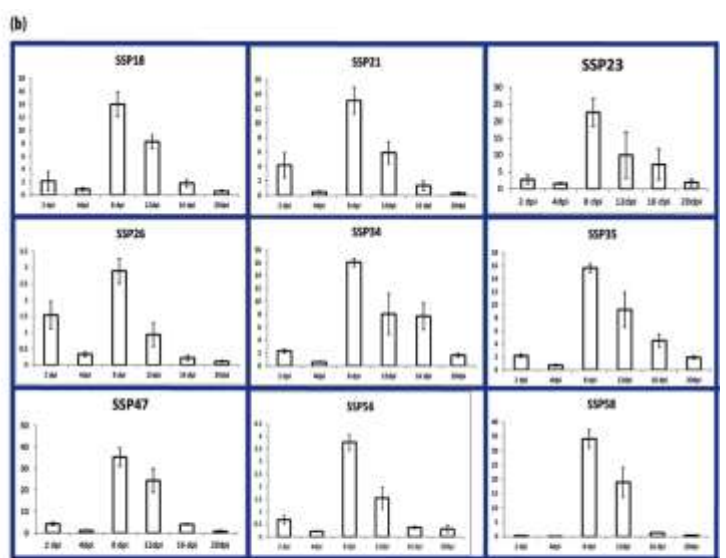
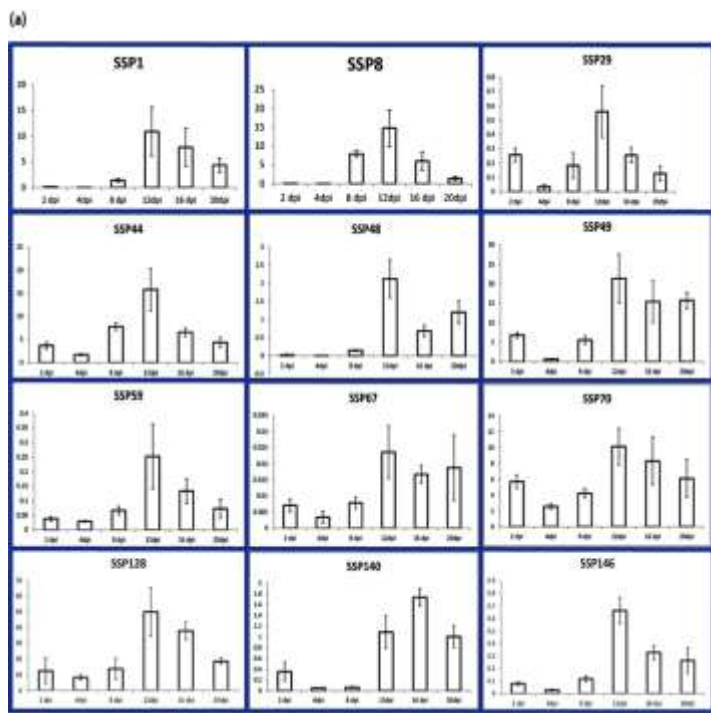


Figure 2 : Niveau d'expression des gènes codant pour les protéines SSP : Cas des gènes exprimés durant la phase nécrotrophe avec un pic à 12 dpi (a) ou à 8 dpi (b)

Figure 3 : Développement des symptômes en serre 21 jours après inoculation avec les isolats de *Z. tritici* IPO323 et les mutants IPO323 $\Delta$ SSP15 and IPO323 $\Delta$ SSP18 sur 12 lignées de blé.

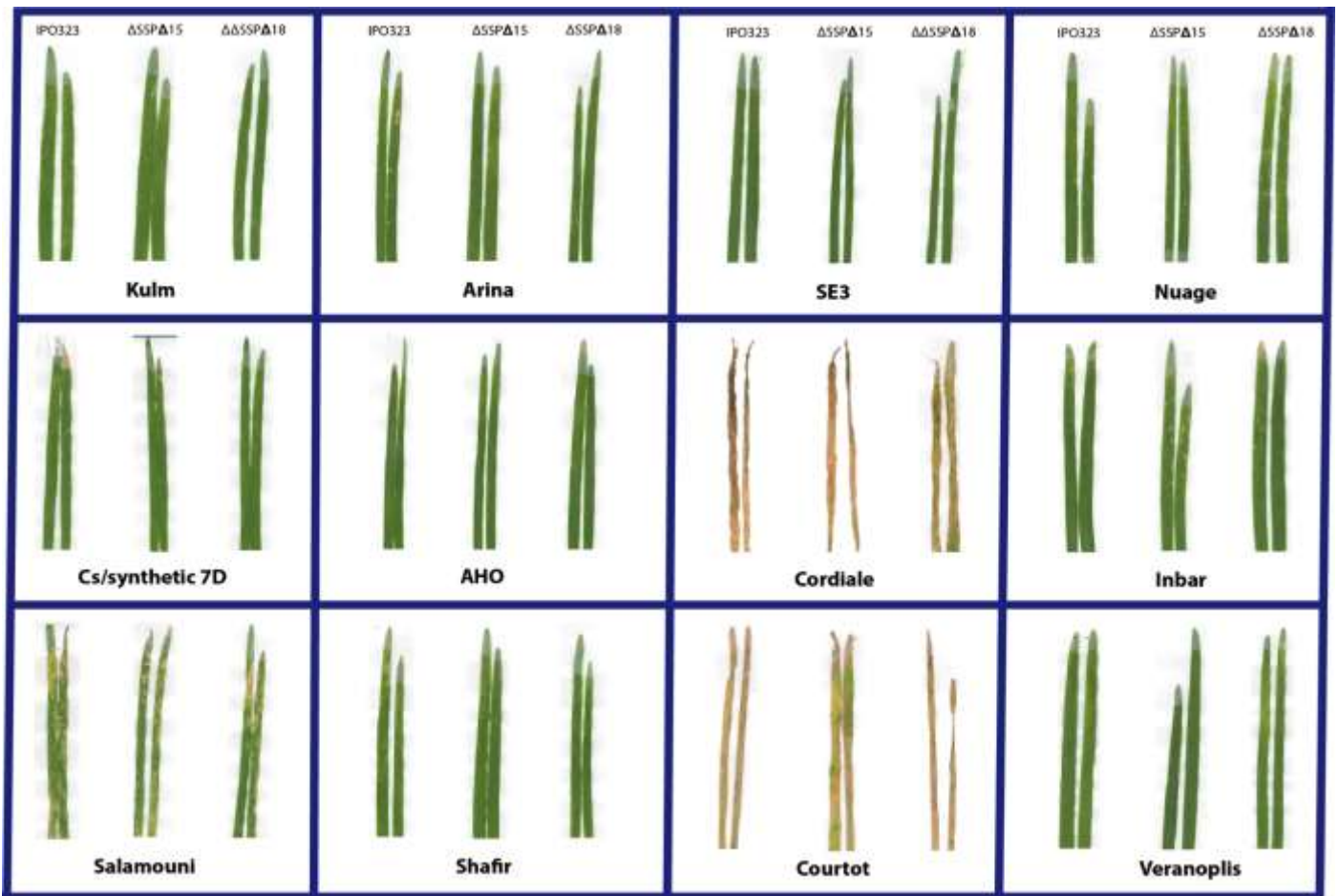
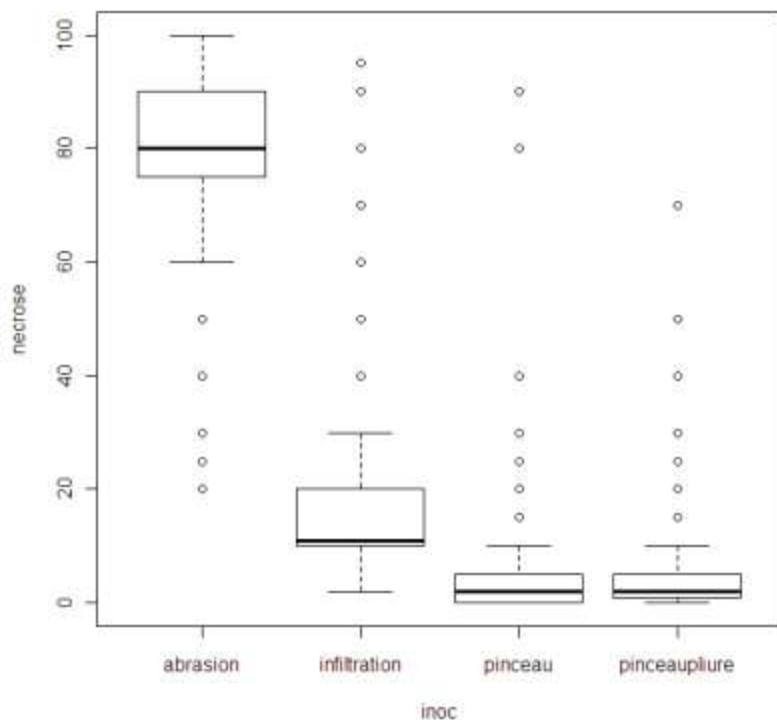


Figure 4 : Comparaison des symptômes de nécrose obtenus aux champs par abrasion, infiltration, badigeonnage au pinceau avec ou sans pliure transversale (R2n, 2012).



## Références bibliographiques

- Duncan, K. E., and Howard, R. J.** (2000). Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen, *Mycosphaerella graminicola*. *Mycol. Res.* 104:1074-1082.
- Fraaije, B.A., Cools, H.J., Kim, S.-H., Motteram, J., Clark, W.S. and Lucas, J.A.** (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molec. Pl. Pathol.* 8: 245-254
- Friesen, T.L., Meinhardt, S.W., Faris, J.D.** (2007). The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for-gene manner. *Plant Journal.* 51:681-692.
- Goodwin, S.B.** (2007). Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Australas. Plant Pathol.* 36: 532-538.
- Kema, G. H. J., Yu, D. Z., Rijkenberg, F. H. J., Shaw, M. W., and Baayen, R. P.,** (1996). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86: 777-786.
- Keon, J., Antoniw, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J.L., Baker, J.M., Beale, M.H., Hammond-Kosack, K., and Rudd, J.J.** (2007). Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 20: 178-193.
- Manning, V.A., Chu, A.L., Steevens, J.E., Wolpert, T.J. and Ciuffetti, L.M.,** (2009). A Host-Selective Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, *Ptr ToxA*, Induces Photosystem Changes and Reactive Oxygen Species Accumulation in Sensitive Wheat. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 22: 665-676.
- Mehrabi, R., Zwiers, L.H., De Waard, M., and Kema, G.H.J.** (2006). *MgHog1* regulates dimorphism and pathogenicity in the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1262-1269.
- Perrone, G., Logrieco, A., Kema, G.H.J., Ritieni, A. and Bottalico, A.,** (2000). Phytotoxic activity of *Mycosphaerella graminicola* culture filtrates. In: Phytosfere'99 - Highlights in European Plant Biotechnology Research and Technology Transfer (Eds. G.E. de Vries and K. Metzlauff). *Proceedings of the Second European Conference on Plant Biotechnology*, held in Rome Italy, from 7 to 9 June 1999. Pp. 39-45.
- Shetty, N.P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G.H.J., Collinge, D.B., and 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.



**Sierotzki, H., Pavic, L., Hugelshofer, U., Stanger, C., Cleere, S., Windass, J., and Gisi, U.** (2005). Dynamics of *Mycosphaerella graminicola* populations in response to selection by different fungicides. In: Modern fungicides and antifungal compounds II, eds Lyr H., Russell PE, Dehne HW, Gisi U, and Kuck KH, *14th International Reinhardsbrunn Symposium, AgroConcept*, Bonn, Verlag Th. Mann Gelsenkirchen, pp 89-101.