

[WEAB] Sélection Assistée par les Effecteurs fongiques de Résistances aux champignons pathogènes chez le blé

Marc-Henri LEBRUN^{*1}, Elsa BALLINI², Guylaine BESNIER-HEBERT³, Ludovic BONHOMME⁴, Ruth BRYANT⁵, Florence CAMBON⁴, James COCKRAM⁶, Jean-Michel DELHAYE⁷, Aurélie DUCASSE², Rowena DOWNIE⁶, Laure DUCHALAIS⁸, Sylvie DUTRIEZ⁹, Benoit FOUCAULT¹⁰, Pascal GIRAUDEAU¹¹, Lilian GOUT¹, Bruno GREZEZS-BESSE³, Delphine HOURCADE¹², Gert KEMA¹³, Thomas KROJ², Stéphane LAFARGE³, Thierry LANGIN⁴, Valérie LAURENT¹⁴, Jean-Benoit MOREL², Richard OLIVER¹⁵, Jan PANEK¹⁶, Cyrille SAINTENAC⁴, Charles SNIJDERS¹⁷, Kar-Chun TAN¹⁵, Romain VALADE^{1 2}

1 - INRA AgroParis Tech BIOGER, Thiverval-Grignon, France

2 - INRA BGPI, Montpellier, France

3 - BIOGEMMA, Clermont-Ferrand, France

4 - INRA GDEC, Clermont-Ferrand, France

5 - RAGT UK, Ickleton, UK

6 - NIAB, Cambridge, UK

7 - Lemaire-Deffontaines, Auchy-les-Orchies, France

8 - RAGT, Louville la Chenard, France

9 - Caussade Semences, Caussade, France

10 - CETAC et KWS-Momont Recherche, Monts en Pelée, France

11 - SECOBRA, Maule, France

12 - Arvalis, Thiverval-Grignon, France

13 - WUR, Wageningen, The Netherlands

14 - Florimond Desprez, Cappelle en Pévèle, France

15 - CCDM, Curtin University, Perth, Australia

16 - RAGT Czech, Branišovice, Czech Republic

17 - ASUR Plant Breeding, Estrées-Saint-Denis, France

* **Coordinateur** : Marc-Henri LEBRUN, marc-henri.lebrun@inra.fr

1. Introduction

Les maladies fongiques du blé sont un problème sanitaire majeur qui affecte aussi bien les rendements que la qualité des grains. Parmi les agents pathogènes plus dommageables, *Fusarium graminearum* (*Fg*) et *Zymoseptoria triticii* (*Zt*) provoquent en France des épidémies récurrentes et importantes sur les épis et les feuilles du blé respectivement. Les pertes occasionnées par *Zt* peuvent atteindre de 15 qx/ha à 50 qx/ha (Arvalis), rendant nécessaire l'utilisation récurrente de traitements fongicides, avec un coût moyen de 40 €/ha chaque année. *Parastagonospora nodorum* (*Pn*) est un champignon pathogène des feuilles du blé qui était dominant en Europe entre 1950 et 1980 (Bearchell et al, 2005). Si l'incidence de cette maladie a fortement décliné en France à partir de 1980, elle provoque encore des dommages en Suisse, en Europe de l'Est et en Europe du Nord (Tommasini et al, 2007 ; Gilon et al. 2014). En France, cette maladie reste responsable d'épidémies récurrentes sur le blé dur, les triticales et l'orge (Arvalis). Les isolats de *Pn* collectés sur blé dur sont aussi pathogènes du blé tendre (CASDAR Septodur). Ainsi, les épidémies de *Pn* sur le blé dur représentent un réservoir potentiel de souches capables de déclencher des épidémies sur le blé tendre. *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*) est une maladie fongique du blé observée en France dans les situations de monocultures de blé.

En dehors des traitements fongicides, la principale méthode de lutte contre les champignons pathogènes du blé, est l'utilisation de cultivars génétiquement résistants. Cependant, ces résistances sont souvent quantitatives et contrôlées par des déterminismes génétiques complexes (Brown et al., 2015 ; Phan et al., 2018). Enfin, les gènes/QTLs actuellement disponibles ne sont pas toujours suffisants pour contrôler totalement ces maladies. Il apparaît donc nécessaire de rechercher de nouvelles sources de résistance pour lutter efficacement contre ces maladies fongiques. Une approche prometteuse est de développer des méthodes

d'identification et de criblage rapide de ces résistances en utilisant les connaissances acquises sur les mécanismes mis en place par ces agents pathogènes pour attaquer les plantes.

L'identification et l'étude d'effecteurs ayant des rôles clefs dans le pouvoir pathogène des champignons phytopathogènes est un domaine de recherche en plein essor (Lo Presti et al., 2015 ; De Wit et al., 2016). Les effecteurs fongiques sont en général de petites protéines sécrétées par le champignon dans les tissus végétaux lors de l'infection. Certains de ces effecteurs sont capables d'entrer dans les cellules végétales, où ils perturbent des fonctions importantes pour la plante (Toruño et al. 2016, Khan et al. 2018). Certains effecteurs sont capables d'induire une mort cellulaire spécifiquement chez certains cultivars sensibles, comme les effecteurs nécrotiques cultivar-spécifiques de *Pn* (Oliver et al, 2012 ; McDonald et al., 2018). D'autres effecteurs sont reconnus directement ou indirectement par les produits des gènes de résistance de la plante (effecteurs d'avirulence, Stergiopoulos et al, 2009). Les connaissances acquises sur les effecteurs fongiques ouvrent des possibilités d'applications innovantes pour la sélection de cultivars résistants aux maladies (Vleeshouwers et al. 2015). La sélection assistée par effecteurs offre de nombreux avantages par rapport à la sélection classique. En particulier, les effecteurs peuvent être utilisés rapidement à grande échelle, et accélérer la détection de nouvelles sources de résistance aux agents pathogènes. Ces méthodes ont permis d'identifier des mécanismes de résistance originaux, principalement chez la tomate et la pomme de terre (Zhu et al., 2012 ; Vleeshouwers et al. 2015), mais aussi chez le blé dans le cas des effecteurs nécrotiques de *Pn* (McDonald et al., 2018).

Le projet (WEAB) a pour objectif d'évaluer des méthodes de sélection de résistances aux champignons pathogènes chez le blé à l'aide d'effecteurs fongiques. Nous avons choisi d'utiliser des effecteurs produits par *Ptr* et *Pn*, capables d'induire des nécroses spécifiques chez des cultivars sensibles à ces champignons. Les effecteurs nécrotiques spécifiques de *Pn* (ToxA, Tox1 et Tox3)

peuvent être produits sous la forme de protéines recombinantes qui sont infiltrées dans des feuilles de blé. Ces méthodes permettent d'identifier les cultivars insensibles et résistants à ces effecteurs et elles sont en cours d'utilisation dans plusieurs programmes internationaux (Tan *et al.* 2015 ; Downie *et al.*, 2018 ; Phan *et al.*, 2018). Le projet WEAB comporte quatre axes, (1) la recherche d'effecteurs de *Zt* et *Fg* toxiques pour le blé (2) l'identification de cultivars de blé insensibles aux trois effecteurs nécrotiques de *Pn* connus (ToxA, Tox1 et Tox3) parmi les cultivars élites du panel Breedwheat, (3) l'évaluation en conditions contrôlées et au champ de ces mêmes cultivars pour leur résistance à *Pn* et *Ptr*, et (4) la cartographie des insensibilités aux effecteurs nécrotiques de *Pn* et de la résistance à *Pn* et *Ptr*, par des méthodes de génétique d'association. Ce projet a ainsi pour objectif d'évaluer l'efficacité des méthodes de criblage rapide à l'aide d'effecteurs fongiques chez le blé.

2. Matériel et méthode

Les effecteurs de *Zt*, *Fg* et *Pn* sélectionnés ont été produits sous la forme de protéines recombinées, soit dans *Pichia pastoris* (plateforme 3PE, UMR BFF, Marseille, France), soit dans *Escherichia coli* (CBS, Montpellier, France). Les protéines recombinantes ont été conservées à 4°C à une concentration d'environ 1-0,1 mg/mL. Tox1, Tox3 et ToxA ont été produits par l'Université de Curtin (Perth, Australie). Ces effecteurs ont été infiltrés dans les feuilles de blé à l'aide d'une seringue sans aiguille simplement pressée contre la feuille (Figure 1). Cette méthode permet d'infiltrer dans le mésophile des feuilles de blé environ 100 microlitres de la solution de protéine testée. Les symptômes de nécroses apparaissent sur les feuilles de cultivars sensibles en 4 à 5 jours. Ces méthodes sont celles déjà utilisées avec succès pour la détection de cultivars sensibles aux effecteurs nécrotiques de *Pn* (Tox1, Tox2, ToxA ; Tan *et al.* 2015 ; Downie *et al.* 2018 ; Phan *et al.*, 2018).



Figure 1 : Infiltration d'effecteurs fongiques dans les feuilles de blé.

Un panel de 219 cultivars élites issu du programme ANR Breedwheat, a été utilisé pour évaluer la sensibilité/insensibilité de ces cultivars aux effecteurs nécrotiques Tox A, Tox 1 et Tox3 de *Pn* en chambre de culture. Les feuilles de ces cultivars ont été infiltrées dans le cadre d'essais multi-locaux réalisés par les différents partenaires du projet. Les symptômes provoqués par ces effecteurs nécrotiques de *Pn* ont été notés sur une échelle de 0 (pas de nécrose) à 4 (large nécrose, voir Figure 2). Ce panel a été aussi utilisé pour évaluer la résistance des cultivars de blé à *Pn* ou à *Ptr* dans des essais aux champs. Les essais pour *Pn* ont été réalisés en République Tchèque (station RAGT), et en Norvège (NMBU) avec des sur-inoculation d'isolats locaux de *Pn*. Les essais pour

Ptr ont été réalisés en France avec un inoculum naturel dans une région où cette maladie est récurrente (station SECOBRA, 2015-2016). Les données phénotypiques obtenues par le programme WEAB ont permis de réaliser des analyses d'association en utilisant les données de génotypage produites par le PIA Breedwheat (197K SNPs). Ces analyses d'associations ont été réalisées avec le package GenABEL de la version 3.2 du logiciel statistique R (Aulchenko Y.S. *et al.*, 2007). Un modèle mixte linéaire (MLM) a été utilisé comme présenté par Yu J. *et al.* (2006). L'effet polygénique a été pris en compte en utilisant une matrice d'apparentement (Kinship). Cette matrice est estimée par la fonction IBS (identity-by-state) en utilisant un sous-ensemble de 8078 SNPs distribués tout le long du génome. Pour réduire le taux de faux-positifs, les associations marqueur-phénotype sont considérées comme significatives lorsque le LOD score est supérieur à 3.

3. Résultats

3.1 - Identification, production et caractérisation d'effecteurs des champignons *Zt*, *Fg* et *Pn*

La recherche d'effecteurs candidats dans les génomes de *Fg* et *Zt* a été réalisée à l'aide de logiciels d'analyse spécialisés, tels qu'EffectorP (Sperschneider *et al.*, 2003). Les données obtenues sont comparables à celles déjà publiées (*Zt* : Morais do Amaral *et al.* 2012 ; *Fg* : Brown *et al.* 2012). Les profils d'expression de ces effecteurs candidats ont été analysés à l'aide des données publiées (*Zt* : Palma-Guerrero *et al.* 2017 ; *Fg* : Brown *et al.* 2017). Seuls les effecteurs candidats de *Zt* et *Fg* exprimés au cours de l'infection du blé ont été retenus pour le projet WEAB.

Dans le cadre du projet CASDAR Septodur (2012-2015), des souches de *Pn* ont été isolées en France à partir de cultivars de blé dur et de triticale infectés. Une seule souche de *Pn* a été isolée d'un cultivar de blé tendre (Arvalis). Deux autres isolats de *Pn* provenant de blé tendre sont issus de collections mycologiques françaises. L'isolat récent de blé tendre est pathogène pour le blé tendre, et pour la majorité des six cultivars de blé dur testés. Les isolats provenant de blé dur sont tous pathogènes pour le blé tendre. Un échantillon de 12 isolats de *Pn* français provenant de blé tendre, blé dur et triticale a été étudié pour la diversité des gènes encodant les effecteurs nécrotiques Tox1, Tox3 et ToxA. La plupart des isolats de *Pn* français ne possèdent pas ToxA, mais ils possèdent Tox1 et Tox3. Certains allèles de Tox1 et Tox3 sont différents de ceux connus chez *Pn* (Phan *et al.*, soumis).

Huit des dix effecteurs de *Zt* sélectionnés ont pu être produits sous la forme de protéines recombinantes. La protéine Zt-MAX1 est similaire aux protéines de la famille MAX qui comporte des protéines toxiques pour le blé, comme ToxB (de Guillen *et al.* 2015). Les protéines Zt-NEP1 et Zt-NEP2 ont déjà été décrites comme toxiques pour le blé (Ben M'Barek *et al.* 2015). Deux protéines de *Zt*, apparentées aux cérato-platanines / expansines (Zt-Cer1, Zt-Expn1, Zt-Expn2, Zt-Expn3) toxiques pour les plantes (Pazzagli *et al.*, 2014), ont été aussi produites. Aucune de ces protéines n'a induit de nécroses après infiltration de feuilles d'un cultivar de blé très sensible à *Zt* (Taichung 29), ou de cultivars de blé utilisés dans l'étude de Ben M'Barek *et al.* (2015), et ce, même à de fortes concentrations (10 µg/mL). Ces expériences ont toutefois permis de produire les protéines Zt-MAX1, et Zt-NEP1 en quantités suffisantes pour étudier leurs structures tridimensionnelles (de Gillem et Padilla, CBS, Montpellier, France).

Six des dix effecteurs de *Fg* sélectionnés ont pu être produits en quantités suffisantes sous la forme de protéines recombinantes. La protéine Fg-XYL1 a déjà été décrite comme toxique pour le blé

(Sella *et al.*, 2013). Une protéine de *Fg* apparentée aux céroplatanines / expansines (Fg-CER1) connues pour être toxiques pour les plantes, et importantes pour l'infection du blé par *Fg* (Quarantin *et al.*, 2016) a également été produite. Les 4 autres effecteurs candidats de *Fg* correspondent à des protéines possédant soit des domaines associés à une activité toxique (HR inducing), soit des profils d'expression précoces au cours de l'infection du blé. Pour évaluer leur toxicité, ces effecteurs ont été pulvérisés sur l'épi de blé et déposés directement dans les fleurs. Aucune de ces protéines n'a induit de nécroses des fleurs de blé, même à de très fortes concentrations (100 µg/mL).

3.2 - Identification de cultivars de blé sensibles ou insensibles aux effecteurs nécrotiques de Pn

Les feuilles de blé ont été infiltrées par les effecteurs nécrotiques de *Pn*, Tox1, Tox3 et ToxA. Les symptômes provoqués par ces effecteurs ont été notés sur une échelle de 0 (pas de nécrose) à 4 (nécrose, Figure 2). Les notes intermédiaires correspondent à des chloroses (1, 2) ou un mélange de chlorose et de nécrose (3, Figure 2).



Figure 2 : Échelle de notation des symptômes provoqués sur les feuilles de blé par les effecteurs nécrotiques de *Pn*.

Les effecteurs Tox1, Tox3 et ToxA ont été infiltrés dans des feuilles de blé de différents cultivars connus pour leurs réactions vis-à-vis de ces effecteurs. Les cultivars Cadenza (témoin de sensibilité, Downie *et al.* 2018) et Soissons sont extrêmement sensibles à ToxA (Figure 3), mais aussi à Tox 1 et Tox 3. Ils font partie des rares cultivars de blé d'hiver sensibles aux trois effecteurs nécrotiques de *Pn*. Ces deux cultivars ont été utilisés comme témoins de réussites des infiltrations des effecteurs nécrotiques de *Pn* dans les différentes expérimentations du projet. Le cultivar Euclide est insensible à ToxA.

Ces effecteurs ont été aussi infiltrés dans les feuilles des 219 cultivars de blé du panel Breedwheat. Ces expériences ont montré que la plupart des cultivars (46%) sont insensibles aux trois effecteurs nécrotiques Tox1, Tox3 et ToxA (Tableau 1). Seuls les quatre cultivars, XI19, Soissons, Isengrain et Icarda-4 sont sensibles à ces trois effecteurs (2 %). La plupart des autres cultivars sont sensibles à un seul effecteur, majoritairement à Tox3 (39 %).

Ces résultats étaient inattendus, car la totalité des blés australiens sont sensibles à au moins un des trois effecteurs Tox1, Tox3 et ToxA, et il n'existe pas de cultivars insensibles à ces trois effecteurs (Tan *et al.*, 2015 ; Phan *et al.*, 2018). Les cultivars australiens sont des blés de printemps, tandis que ceux du panel Breedwheat sont des blés d'hiver (212/219). Nous avons donc analysé la sensibilité des cultivars de blé de printemps européens aux effecteurs Tox1, Tox3 et ToxA (Tableau 2). La fréquence de cultivars sensibles aux trois effecteurs Tox1,

Tox3 et ToxA parmi les blés de printemps est six fois supérieure (0,13) à celle observée parmi les blés d'hiver européens (0,02). Ce résultat a été aussi observé par Downie *et al.* (2018) lors de la comparaison entre d'autres cultivars de blé d'hiver et de printemps européens.

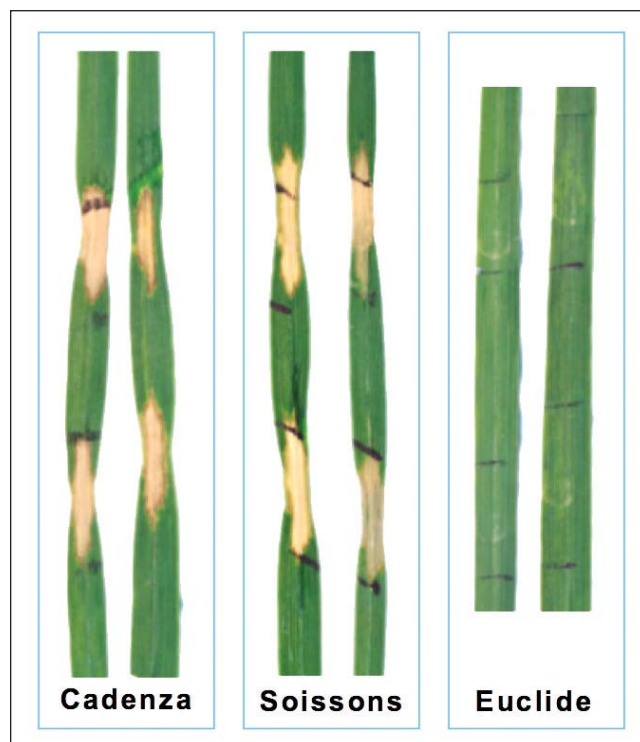


Figure 3 : Symptômes provoqués par l'effecteur nécrotique ToxA sur les feuilles de blé des cultivars Cadenza (note 4 : sensible), Soissons (note 4 : sensible) et Euclide (note 0 : insensible).

Pays	S ToxA	S Tox3	S Tox1	N	R 3 tox	S 3 tox
AUT	0,00	0,75	0,25	4	0,00	0,00
BEL	0,00	0,33	0,00	3	0,67	0,00
DEU	0,00	0,43	0,14	7	0,43	0,00
DNK	0,00	0,00	0,00	3	1,00	0,00
FRA	0,14	0,37	0,08	153	0,50	0,01
ITA	0,27	0,55	0,09	11	0,36	0,00
MOR	0,50	0,50	0,00	2	0,00	0,00
SPA	0,00	0,25	0,00	4	0,75	0,00
SYR	0,40	0,67	0,40	5	0,00	0,20
UK	0,04	0,48	0,22	23	0,30	0,04
Autre	0,00	0,25	0,25	4	0,50	0,00
Total	0,13	0,39	0,11	219	0,46	0,02

Tableau 1 : Fréquence des cultivars de blé sensibles aux effecteurs nécrotiques Tox1, Tox3 et ToxA de *Pn* (Panel Breedwheat)

S : sensible à l'effecteur X ; N : nombre de cultivars testés ; AUT : Autriche, BEL : Belgique ; DEU : Allemagne ; DNK : Danemark ; FRA : France ; ITA : Italie ; MOR : Maroc ; SPA : Espagne ; SYR : Syrie ; UK : Grande-Bretagne. Vert : fréquence 4% <, Violet : fréquence > 40%.

	S ToxA	S Tox3	S Tox1	N	R 3 tox	S 3 tox
Breedwheat Hiver	0,12	0,38	0,10	212	0,47	0,02
Europe Printemps	0,65	0,57	0,26	33	0,13	0,13

Tableau 2 : Fréquence des cultivars de blé sensibles aux effecteurs nécrotiques Tox1, Tox3 et ToxA de *Pn*

S : sensible à l'effecteur X ; Breedwheat Hiver : Panel de blés d'hiver du programme Breedwheat ; Europe printemps : panel de blés de printemps européens. Vert : fréquence 4% <, Violet : fréquence > 40%.

3.3 - Evaluation de la sensibilité au champ des cultivars de blé du Panel Breedwheat à Pn et à Ptr

Les niveaux de sensibilité des cultivars de blé du panel Breedwheat à *Pn* et *Ptr* ont été évalués dans le cadre d'expérimentations au champ, réalisées dans différents pays européens où cette maladie provoque des épidémies sur blé tendre. Ces expérimentations ont permis d'obtenir des informations sur les niveaux de sensibilité des 219 cultivars du panel Breedwheat aussi bien à *Pn* qu'à *Ptr*. Les cultivars présentent des niveaux de sensibilité foliaires à *Pn* très différents (Figure 4), allant d'une sensibilité très forte (Courtot, Laser, Mercato, XI19), à une résistance importante (Azzerti, Bergamo, Musik, Player, Sankara). La plupart des cultivars ont des niveaux intermédiaires de sensibilité. La sensibilité du cultivar XI19 et la résistance des cultivars Bergamo et Player ont été confirmées par des inoculations contrôlées de jeunes plants de blé par une souche française de *Pn* isolée de blé tendre (voir 2.1).

3.4 - Identification des loci impliqués dans la sensibilité aux effecteurs nécrotiques de Pn et à la résistance à Pn/Ptr

L'ensemble des données phénotypiques obtenues par le projet WEAB (voir 2.2, 2.3) a été utilisé pour réaliser des études

d'association sur l'ensemble du génome du blé. En effet, le lien statistique entre ces données phénotypiques et les données de génotypage de ces 219 cultivars obtenus dans le cadre du PIA Breedwheat (197K SNPs), permet de mettre en évidence les régions du génome impliquées dans l'insensibilité aux effecteurs nécrotiques de *Pn*, et dans la résistance au champ à *Pn* et *Ptr*. Avec les données sur les insensibilités à Tox1, nous avons pu identifier le gène SNN1 localisé à une extrémité du chromosome 1B (2354630-2357674) qui est impliqué dans la sensibilité à Tox1 (Figure 5). Ce résultat attendu montre que les données phénotypiques et génotypiques utilisées par WEAB permettent de détecter un locus associé à la sensibilité à Tox1. Les gènes TSN1 (chromosome 5B: 546825379-546833139) et SNN3-B1 (chromosome 5B: 6654131-6654201) impliqués respectivement dans la sensibilité du blé à ToxA et Tox3, ont été aussi détectés dans ces analyses. De nombreux loci impliqués dans la réponse des blés à ces trois effecteurs nécrotiques différents de TSN1, SNN1 et SNN3-B1 ont aussi été détectés, en particulier pour ToxA.

Les analyses de génétique d'association réalisées avec les données phénotypiques provenant des des essais aux champs (*Pn*, *Ptr*) ont permis de détecter des 96 loci associés à la résistance à *Ptr*, 82 loci pour *Pn*. Dans le cas de la résistance à *Pn*, ces loci sont différents de ceux détectés avec les effecteurs nécrotiques Tox1, Tox3 et ToxA.

Figure 4 : Niveaux de sensibilité foliaire à Pn des cultivars du panel Breedwheat. Essais au champ, inoculation Pn, NMBU, Norvège, 2017.

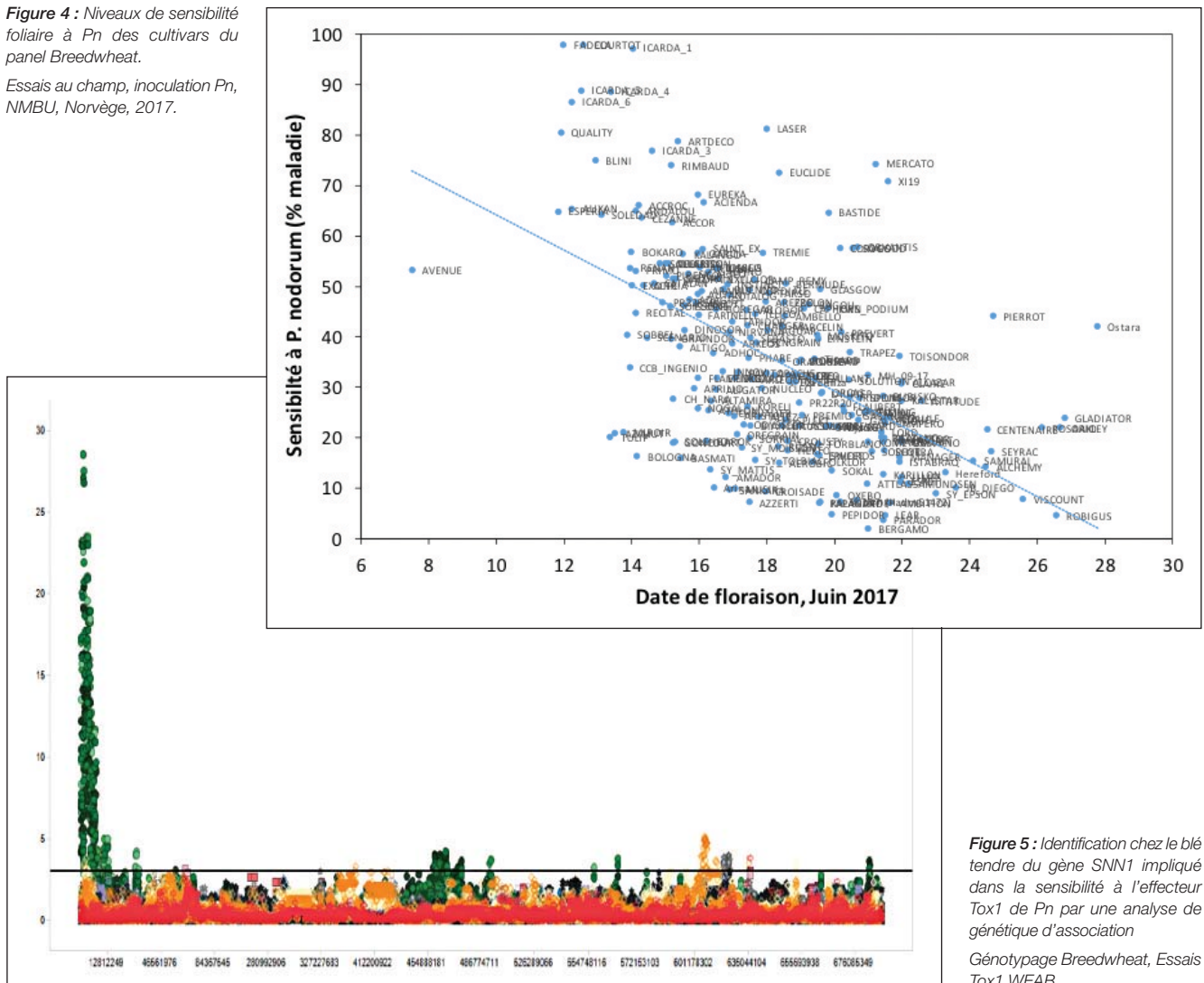


Figure 5 : Identification chez le blé tendre du gène SNN1 impliqué dans la sensibilité à l'effecteur Tox1 de Pn par une analyse de génétique d'association. Génotypage Breedwheat, Essais Tox1 WEAB.

4. Discussion

L'utilisation d'effecteurs fongiques pour la sélection de cultivars résistants aux agents pathogènes est une stratégie qui paraît très prometteuse. Cependant, elle nécessite des connaissances approfondies sur les interactions entre les champignons et leurs plantes hôtes. Dans le cas de *Zt* et *Fg*, pour lesquels il n'est pas encore bien établi quels sont leurs effecteurs toxiques pour le blé, cette stratégie en est sans doute encore à son début. En effet, le criblage de 14 candidats n'a pas permis d'identifier d'effecteur toxique pour le blé. Cette approche n'a pas non plus abouti dans le cas des expériences réalisées par Kettles *et al.* (2017a). Ces auteurs n'ont trouvé que des effecteurs toxiques pour *Arabidopsis* ou le tabac (14/63 testés), à l'exception d'un effecteur toxique pour le blé, encodant une ribonucléase. Cet effecteur qui est aussi toxique pour les bactéries et les champignons, sauf *Zt* (Kettles *et al.*, 2017b), n'est produit qu'au début et à la fin de l'infection. Il pourrait permettre à *Zt* d'éliminer les microorganismes présents à la surface de la feuille. Ces premières études fonctionnelles sur les effecteurs de *Zt* montrent la nécessité d'étudier soit un plus grand nombre d'effecteurs (71 effecteurs testés sur au moins 300 candidats), soit d'utiliser d'autres méthodes de criblage pour espérer identifier des effecteurs fongiques toxiques pour le blé.

Dans le cas des effecteurs de *Pn*, les connaissances sur les effecteurs sont bien plus avancées que chez *Zt* et *Fg*. En particulier, il est bien établi que *Pn* produit un certain nombre (> 9) d'effecteurs nécrotiques dont trois ont été caractérisés (Tox1, Tox3, ToxA; Mac Donald *et al.* 2018). L'analyse de la sensibilité des cultivars de blé d'hiver du panel Breedwheat à Tox1, Tox3 et ToxA, a permis d'identifier un grand nombre de cultivars européens insensibles à ces trois effecteurs (n : 100, Tableau 1). Ce résultat est inattendu, car les travaux réalisés jusqu'à présent avaient montré l'absence de ce type de cultivars dans les collections de blé australiens (Tan *et al.*, 2015 ; Phan *et al.*, 2018). En parallèle de notre projet, d'autres études ont montré que de tels cultivars étaient présents dans les collections de blé d'hiver.

Cependant, la fréquence de ces cultivars semble inférieure (17% du panel russe : Phan *et al.*, 2018; 10 % du panel européen analysé par Downie *et al.*, 2018) à celle observée dans le panel Breedwheat (39 %). Ce génotype pourrait conférer une certaine résistance à *Pn* qui aurait été sélectionnée au cours des années 1960-1980 en Europe, lorsque cette maladie était importante. Cette hypothèse a également été suggérée pour expliquer l'existence de tels cultivars dans le panel russe, y compris dans des cultivars russes anciens (Phan *et al.*, 2018). Cette information est importante, car elle indique qu'il faut éviter de perdre ces gènes d'insensibilité dans les programmes de sélection du blé actuels, depuis que la résistance à *Pn* n'est plus prise en compte. Ainsi, la généalogie des cultivars issus de Cadenza en Grande Bretagne montre que ce cultivar a conduit au maintien de gènes de sensibilité à *Pn*, car il a fréquemment été utilisé comme géniteur (Downie *et al.* 2018). C'est le cas du cultivar XI19 qui est issu de Cadenza et qui est à la fois sensible à ToxA, Tox1 et Tox3, et extrêmement sensible à *Pn* dans tous les essais que nous avons réalisés.

Les approches de génétique d'association ont une nouvelle fois démontré leur efficacité pour identifier les loci impliqués dans la sensibilité aux effecteurs toxiques de *Pn*, en particulier à l'aide d'un panel de cultivars élites tel que celui développé dans le PIA Breedwheat. En effet, nous avons pu facilement détecter les loci TSN1, SNN1 et SNN3, impliqués dans la sensibilité à ToxA, Tox1 et Tox3, respectivement. Des QTLs mineurs impliqués dans la réponse à ces effecteurs ont également été détectés. L'analyse de la sensibilité de ces cultivars à *Pn* et *Ptr*, réalisée à l'aide de ces méthodes, a aussi permis d'identifier des loci associés à une résistance quantitative à *Ptr* et *Pn* dans ce panel, indépendante des loci TSN1, SNN1 et SNN3. Ce résultat suggère qu'il existe d'autres loci de sensibilité du blé sans doute en interaction avec de nouveaux effecteurs de *Pn*, dont les allèles d'insensibilité confèrent une résistance aux populations de *Pn* responsables d'épidémies en Europe, comme cela a été suggéré pour d'autres populations de *Pn* (Tan *et al.* 2018 ; Phan *et al.* 2018).

Références bibliographiques

- Bearchell SJ, Fraaije BA, Shaw MW, Fitt BD** (2005) Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(15):5438-42.
- Ben M'Barek S, Cordewener JH, Tabib Ghaffary SM, van der Lee TA, Liu Z, Mirzadi Gohari A, Mehrabi R, America AH, Robert O, Friesen TL, Hamza S, Stergiopoulos I, de Wit PJ, Kema GH**. (2015) FPLC and liquid-chromatography mass spectrometry identify candidate necrosis-inducing proteins from culture filtrates of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet Biol*. 79:54-62.
- Brown NA, Antoniw J, Hammond-Kosack KE**. (2012) The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis. *PLoS One*. 7(4):e33731.
- Brown JK, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C**. (2015) Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet Biol*. 79:33-41.
- Brown NA, Evans J, Mead A, Hammond-Kosack KE**. (2017) A spatial temporal analysis of the *Fusarium graminearum* transcriptome during symptomless and symptomatic wheat infection. *Mol Plant Pathol*. 18(9):1295-1312.
- De Guillen K, Ortiz-Vallejo D, Gracy J, Fournier E, Kroj T, Padilla A**. (2015) Structure Analysis Uncovers a Highly Diverse but Structurally Conserved Effector Family in Phytopathogenic Fungi. *PLoS Pathog*. 11(10):e1005228.
- De Wit PJ, Testa AC, Oliver RP**. (2016) Fungal Plant Pathogenesis Mediated by Effectors. *Microbiol Spectr*. 4(6).
- Downie RC, Bouvet L, Furuki E, Gosman N, Gardner KA, Mackay IJ, Campos Mantello C, Mellers G, Phan HTT, Rose GA, Tan KC, Oliver RP, Cockram J**. (2018) Assessing European Wheat Sensitivities to *Parastagonospora nodorum* Necrotrophic Effectors and Fine-Mapping the Snn3-B1 Locus Conferring Sensitivity to the Effector SnTox3. *Front Plant Sci*. 9:881.
- Kettles GJ, Bayon C, Canning G, Rudd JJ, Kanyuka K**. (2017a) Apoplastic recognition of multiple candidate effectors from the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in the nonhost *Nicotiana benthamiana*. *New Phytol*. 213(1):338-350.
- Kettles GJ, Bayon C, Sparks CA, Canning G, Kanyuka K, Rudd JJ**. (2017b) Characterization of an antimicrobial and phytotoxic ribonuclease secreted by the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *New Phytol*. 217(1):320-331.
- Khan M, Seto D, Subramaniam R, Desveaux D**. (2018) Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *Plant J*. 93(4):651-663.
- Gilon M, Arseniuk E**. (2014) Natural field infections of wheat and triticale by fungi from the complex of fungi *Stagonospora nodorum* / *Septoria tritici* under climatic conditions of Poland. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 79(4):216-27.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R**. (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol*. 66:513-45.
- McDonald MC, Solomon PS**. (2018) Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors. *Curr Opin Microbiol*. 46:14-18.
- Morais do Amaral A, Antoniw J, Rudd JJ, Hammond-Kosack KE**. (2012) Defining the predicted protein secretome of the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One*. 7(12):e49904.
- Oliver RP, Friesen TL, Faris JD, Solomon PS**. (2012) *Stagonospora nodorum*: from pathology to genomics and host resistance. *Annu Rev Phytopathol*. 50:23-43.
- Palma-Guerrero J, Ma X, Torriani SF, Zala M, Francisco CS, Hartmann FE, Croll D, McDonald BA**. (2017) Comparative Transcriptome Analyses in *Zymoseptoria tritici* Reveal Significant Differences in Gene Expression Among Strains During Plant Infection. *Mol Plant Microbe Interact*. 30(3):231-244.
- Pazzagli L, Seidl-Seiboth V, Barsottini M, Vargas WA, Scala A, Mukherjee PK**. (2014) Cerato-platanins: elicitors and effectors. *Plant Sci*. 228:79-87.
- Phan HTT, Rybak K, Bertazzoni S, Furuki E, Dinglasan E, Hickey LT, Oliver RP, Tan KC**. (2018) Novel sources of resistance to *Septoria nodorum* blotch in the Vavilov wheat collection identified by genome-wide association studies. *Theor Appl Genet*. 131(6):1223-1238.
- Phan HTT, Jones D, Rybak K, Dodhia K, Lopez-Ruiz FJ, Valade R, Gout R, Lebrun M-H, Oliver RP, Tan KC**. (Submitted) Periodic Pyrrhic victories define the *Septoria nodorum* blotch interaction.
- blotch interaction**
- Quarantin A, Glasenapp A, Schäfer W, Favaron F, Sella L**. (2016) Involvement of the *Fusarium graminearum* cerato-platanin proteins in fungal growth and plant infection. *Plant Physiol Biochem*. 109:220-229.
- Sella L, Gazzetti K, Faoro F, Odorizzi S, D'Ovidio R, Schäfer W, Favaron F, A** (2013) *Fusarium graminearum* xylanase expressed during wheat infection is a necrotizing factor not essential for virulence. *Plant Physiol Biochem*. 64:1-10.
- Sperschneider J, Gardiner DM, Taylor JM, Hane JK, Singh KB, Manners JM**. (2013) A comparative hidden Markov model analysis pipeline identifies proteins characteristic of cereal-infecting fungi. *BMC Genomics*. 20;14:807.
- Tan KC, Phan HT, Rybak K, John E, Chooi YH, Solomon PS, Oliver RP**. (2015) Functional redundancy of necrotrophic effectors - consequences for exploitation for breeding. *Front Plant Sci*. 6:501.
- Tommasini L, Schnurbusch T, Fossati D, Mascher F, Keller B**. (2007) Association mapping of *Stagonospora nodorum* blotch resistance in modern European winter wheat varieties. *Theor Appl Genet*. 115(5):697-708.
- Toruño TY, Stergiopoulos I, Coaker G**. (2016) Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annu Rev Phytopathol*. 4;54:419-41.
- Vleeshouwers VG, Oliver RP**. (2015) Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*. (1):40-50.
- Zhu S, Li Y, Vossen JH, Visser RG, Jacobsen E**. (2012) Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Res*. 21(1):89-99.