



Efficacités et modes d'action de nouveaux simulateurs de défenses des plantes sur le pathosystème blé-*Zymoseptoria tritici*

Samara Mejri

► To cite this version:

Samara Mejri. Efficacités et modes d'action de nouveaux simulateurs de défenses des plantes sur le pathosystème blé-*Zymoseptoria tritici*. Sciences agricoles. Université du Littoral Côte d'Opale, 2018. Français. NNT : 2018DUNK0481 . tel-02001770

HAL Id: tel-02001770

<https://theses.hal.science/tel-02001770>

Submitted on 31 Jan 2019

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.

Ecole doctorale « Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement »

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Samara MEJRI

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

Discipline : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Efficacités et modes d'action de nouveaux stimulateurs de défenses des plantes sur le pathosystème blé - *Zymoseptoria tritici*

Soutenue le 12 Juillet 2018 devant le jury composé de :

Adrian M. , Université de Bourgogne, Dijon	Rapporteur
Bardin M. , Institut National de la Recherche Agronomique, Avignon	Rapporteur
Dellagi A. , AgroParisTech, Paris	Examineur
Ghinet A. , HEI -Yncrea Hauts-de-France, Lille	Examineur
Jacques Ph. , Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Liège	Examineur
Reignault Ph. , Université du Littoral Côte d'Opale, Calais	Co-directeur de thèse
Halama P. , ISA-Yncrea Hauts-de-France, Lille	Co-directeur de thèse
Siah A. , ISA-Yncrea Hauts-de-France, Lille	Co-encadrant

Ecole doctorale « Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement »

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Samara MEJRI

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

Discipline : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Efficacités et modes d'action de nouveaux stimulateurs de défenses des plantes sur le pathosystème blé - *Zymoseptoria tritici*

Soutenue le 12 Juillet 2018 devant le jury composé de :

Adrian M. , Université de Bourgogne, Dijon	Rapporteur
Bardin M. , Institut National de la Recherche Agronomique, Avignon	Rapporteur
Dellagi A. , AgroParisTech, Paris	Examineur
Ghinet A. , HEI-Yncrea Hauts-de-France, Lille	Examineur
Jacques Ph. , Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Liège	Examineur
Reignault Ph. , Université du Littoral Côte d'Opale, Calais	Co-directeur de thèse
Halama P. , ISA-Yncrea Hauts-de-France, Lille	Co-directeur de thèse
Siah A. , ISA-Yncrea Hauts-de-France, Lille	Co-encadrant

À mon cher époux et à mon adorable fille, sans qui, cette thèse aurait sans doute pris fin plus tôt, mais, sans qui, la vie aurait été beaucoup moins amusante.

À ma famille et à mes cher(e)s ami(e)s qui n'ont cessé de me soutenir.

“Twenty years from now, you will be more disappointed by the things you didn't do than by the ones you did do. So throw off the bowlines. Sail away from the safe harbor. Catch the trade winds in your sails. Explore. Dream. Discover.”

Mark Twain

Remerciements

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mes deux directeurs de thèse M. Patrice Halama et M. Philippe Reignault dont les conseils pratiques et les encouragements m'ont permis de mener cette thèse à bien.

Patrice, je te remercie de m'avoir accueilli à l'ISA, du temps que tu m'as accordé, du soutien que tu m'as apporté et j'insiste sur le fait que travailler avec toi était un grand plaisir pour moi.

Philippe, bien que nos échanges étaient moins fréquents, je précise que ta présence comme co-directeur de thèse était plus qu'utile et que ton investissement dans ce travail et tes encouragements aux moments durs m'ont permis d'arriver jusque-là.

Je m'adresse à mon encadrant M. Ali Siah qui a beaucoup donné de son temps pour le bon déroulement de la thèse. Les travaux réalisés n'auraient pas pu être mis en valeur sans tes précieux conseils et le temps que tu as accordé aux corrections du manuscrit et des articles, je t'exprime encore une fois ma profonde gratitude pour ton investissement dans ce travail.

Je remercie Mme. Maryline Magnin-Robert ainsi que Mme. Béatrice Randoux pour leur contribution à l'encadrement de cette thèse. Je vous en suis reconnaissante pour votre appui, vos idées et vos réflexions très utiles. Je vous remercie également pour votre gentillesse, votre disponibilité, vos réponses rapides et détaillées et votre aide pour certaines expériences.

Un grand merci s'adresse également à M. Benoit Tisserant qui m'a beaucoup aidé dans la partie technique du travail. Tu m'as initié à la biologie moléculaire et j'en suis reconnaissante ! Restes comme tu es !

Je remercie chaleureusement Mme. Alina Ghinet, qui a participé à la quasi-totalité des réunions et des comités de suivi de la thèse et donc indirectement à l'encadrement de celle-ci. Alina, tu m'as accordé du temps, tu m'as donné des idées et conseils utiles et tu m'as appris des notions de chimie, je t'en remercie.

Je remercie également Mme. Marielle Adrian et M. Marc Bardin pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de l'évaluer et d'en être les rapporteurs.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme. Alia Dellagi et M. Philippe Jacques pour leur participation au jury de la soutenance en tant qu'examinateurs. Je suis honorée par l'intérêt que vous porterez à mon travail et par votre participation au jury de la soutenance.

Je remercie Monsieur Walid Hamada, l'un de mes meilleurs enseignants à l'INAT qui m'a recommandé à l'équipe et qui m'a indirectement permis de faire cette thèse et de vivre cette expérience. Je n'oublierai jamais cette faveur.

Je dois à Myriam Bomble, ma collègue de bureau et ma meilleure amie sur Lille beaucoup de remerciements que les mots ne pourront pas exprimer. Ensemble nous avons eu des hauts et des bas et nous nous sommes soutenues mutuellement. Je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi (les courses à pieds, les chansons, les bons chocolats...). On a refait le monde tant de fois autour d'un café et je pense qu'on le refait à chaque fois qu'on aura l'occasion. Je te souhaite beaucoup de courage pour la suite et je serais là pour te soutenir !

Je m'adresse également à Caroline Choma, Caroline Deweer Jérôme Follet et Jérôme Muchembled pour les remercier de leur bonne humeur, de leur gentillesse, des discussions et bons moments partagés à BioGap.

Je remercie Martha, la première amie que j'ai faite sur Lille, la première doctorante que j'ai connue à l'ISA, la princesse qui a sali ses mains en m'aidant à laver des pots, celle avec qui j'ai

partagé des moments difficiles et d'autres plus joyeux, merci d'avoir été avec moi jusqu'au bout, j'espère qu'on restera copines pour toujours.

Je remercie Maxime, le super stagiaire de Myriam de m'avoir donné un coup de main à plusieurs reprises. Je te souhaite de réussir ta carrière, tu es quelqu'un de méritant, la preuve tu es revenu en tant qu'ingénieur!

Je remercie Hélène, Pénélope, Laetitia, Claire d'avoir été là pendant un moment, je ne garde que de très bons souvenirs et de belles amitiés que j'espère pour la vie...

Je remercie également Ourida Hammouma, le personnel de l'ISA ainsi que tous les stagiaires et doctorants que j'ai connu ou croisé durant la période passée à l'ISA ; Merci Rémi, Marlon, Justine, Claire, Nandana, Clément...

Je remercie vivement toute l'équipe de l'UCEIV à Calais de m'avoir accueilli durant mes déplacements et avec qui j'ai pu partager une bonne semaine, Alice, Abderrakib, Nour, Mélodie, Corinne, Frédéric, Morgane, Joël, Natacha, Anissa merci à vous tous. Gardez la bonne ambiance au labo!

Enfin, je tiens à saluer toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse et m'ayant permis directement ou indirectement d'enrichir mon expérience professionnelle et personnelle.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Liste des abréviations	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures.....	v
Avant-Propos	vi
 Introduction générale.....	 1
 I. Synthèse bibliographique générale	 5
 Chapitre I : Le pathosystème blé Septoriose	 6
1 Le blé : plante modèle étudiée.....	7
2 La septoriose du blé.....	9
2.1 Présentation de la maladie.....	9
2.2 Symptômes de la maladie	10
2.3 Cycle épidémique et processus infectieux	11
2.4 Caractéristiques du génome de <i>Z. Tritici</i>	14
3 Interaction blé- <i>Zymoseptoria tritici</i>	15
3.1 Pouvoir pathogène de <i>Z. Tritici</i>	15
3.2 Résistance du blé à la septoriose.....	17
3.2.1 La résistance qualitative	17
3.2.2 La résistance quantitative	18
3.3 Les voies de défenses du blé contre <i>Z. Tritici</i>	19
3.3.1 Les réponses cellulaires précoces.....	19
3.3.1.1 La cascade de phosphorylation : activation des mapks	19
3.3.1.2 Vague oxydative et formes activées de l'oxygène (FAO).....	19
3.3.1.3 La transmission du signal	21
3.3.2 Les évènements tardifs de défense	23
3.3.2.1 Les phénylpropanoïdes	23
3.3.2.2 Les protéines PR (Patogenesis Related Proteins)	24
 Chapitre II : Méthodes de lutte contre <i>Zymoseptoria tritici</i>	 25
1 La lutte chimique contre <i>Z. Tritici</i>	26
2 Le biocontrôle	27
2.1 Les stimulateurs des défenses des plantes : généralités	27
2.1.1 Mécanismes de résistance lors de l'interaction plante - agent pathogène.....	29
2.1.2 Les éliciteurs sur blé.....	30
2.2 Les biofongicides	32
2.2.1 Exemple d'agent de biocontrôle : <i>Bacillus subtilis</i>	33
2.2.1.1 Les surfactines	34
2.2.1.2 Les iturines.....	34

2.2.1.3 Les fengycines	35
2.3 Produits à double activité	36
2.4 Les biomasses : sources de produits de biocontrôle	37
2.4.1 Exemple de biomasse valorisable: coproduits de la betterave sucrière.....	39
2.4.2 La chimie verte	40
Références bibliographiques.....	42
II. Problématique et objectifs de la thèse	55
III. Résultats	58
Article 1 : La saccharine induit les réactions de défense chez le blé vis-à-vis de <i>Zymoseptoria tritici</i>	59
Saccharin elicits defense pathways and protects wheat against the hemibiotrophic pathogen <i>Zymoseptoria tritici</i>	61
Article 2 : De nouveaux éliciteurs biosourcés issus de coproduits de la betterave sucrière protègent le blé contre <i>Zymoseptoria tritici</i> en induisant les mécanismes de défense de l'hôte.....	77
New elicitors bio-sourced from sugar beet by-products induce resistance in wheat against <i>Zymoseptoria tritici</i>	79
Article 3 : Des dérivés conjugués de l'acide salicylique et de l'acide pyroglutamique protègent le blé contre <i>Zymoseptoria tritici</i>	105
Salicylic acid and pyroglutamic acid conjugated derivatives confer protection to bread wheat against <i>Zymoseptoria tritici</i>	107
Article 4 : Les lipopeptides cycliques produits par <i>Bacillus subtilis</i> protègent le blé contre <i>Zymoseptoria tritici</i>	122
Biocontrol of the wheat pathogen <i>Zymoseptoria tritici</i> using cyclic lipopeptides from <i>Bacillus subtilis</i>	124
IV. Conclusions et perspectives	146
V. Annexes.....	155

Résumé

L'utilisation de biofongicides et de molécules stimulatrices des défenses des plantes (SDP) constituent des stratégies de lutte alternative permettant la réduction de l'utilisation des fongicides conventionnels. Toutefois, il n'existe que peu de produits homologués et appliqués sur blé et encore moins contre la septoriose. Dans le cadre de cette étude, nous avons testés et mis en évidence l'efficacité de protection du blé contre *Zymoseptoria tritici* de plusieurs molécules. En effet, 29 molécules biosourcées dérivées de la fonctionnalisation de l'acide pyroglutamique (PGA), contenu dans les mélasses de la betterave sucrière, ont été évaluées en plus de l'acide γ -aminobutyrique GABA, pour la première fois contre *Z. tritici*. Le GABA et 16 molécules fonctionnalisées ont réduit significativement les pourcentages de la maladie. L'absence d'effets directs sur *Z. tritici* vérifiée *in vitro* confirme que ces protections sont dues exclusivement à un effet SDP. Pour ces molécules, l'étude de la relation structure activité a mis en évidence l'importance des différents groupements chimiques impliqués dans les protections observées. D'autre part, la conjugaison du PGA avec l'acide salicylique (SA) a permis l'obtention de 5 nouvelles molécules parmi lesquelles 4 étaient plus efficaces que les molécules mères et cette efficacité semble être également due à un effet SDP. Enfin, la saccharine ainsi que trois lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* (mycosubtiline, surfactine et fengycine seuls ou en mélange) ont été évalués pour la première fois sur le pathosystème blé - *Z. tritici* et ont conféré des protections significatives dues à des propriétés SDP, à des activités antifongiques directes ou à des effets combinés. Cette étude a donc permis d'identifier de nouvelles molécules possédant différents modes d'action et qui pourraient être envisageables en lutte alternative contre la septoriose du blé, toutefois, des analyses complémentaires sont requises.

Mots clés : blé, *Zymoseptoria tritici*, Stimulateurs de défense des plantes, Biofongicides, lipopeptides cycliques.

Abstract

The use of biofungicides and elicitors of plant defenses are alternative control strategies that can reduce the use of conventional fungicides. However, there are few products registered and applied on wheat and even less against *Septoria tritici* blotch. As part of this study, we tested and demonstrated the protective efficacy of several molecules on wheat against *Zymoseptoria tritici*. In fact, 29 biosourced molecules derived from the functionalization of pyroglutamic acid (PGA) contained in the molasses of sugar beet were evaluated with γ -aminobutyric acid GABA, for the first time against *Z. tritici*. GABA and 16 functionalized molecules significantly reduced the percentages of the disease. The absence of direct effects on the fungus tested in vitro confirms that these protections are due exclusively to an elicitation of plant defense mechanisms. For these molecules, the study of the structure activity relationship has highlighted the importance of the different chemical groups involved in the observed protections. On the other hand, the conjugation of PGA with salicylic acid (SA) allowed the obtention of 5 new molecules among which 4 were more effective than the parent molecules and this efficiency seems to be also due to an eliciting effect. Finally, saccharin and three cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* (mycosubtilin, surfactin and fengycin alone or as mixtures) were evaluated for the first time on the pathosystem wheat - *Z. tritici* and conferred significant protection due to eliciting properties, direct antifungal activities or combined effects. This study has thus made it possible to identify new molecules with different modes of action and which could be considered in alternative control against wheat leaf blotch, however, additional analyzes are required.

Key words: Wheat, *Zymoseptoria tritici*, elicitors of plant defense responses, Biofungicides, cyclic lipopeptides.

Liste des abréviations

ABC	ATP-Binding Cassette
Act	Actin
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AOS	Allène Oxide Synthase
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BABA	B -aminobutyric acid
BTH	Acibenzolar-S-methyl-benzothiadiazole
CEBiP	Chitin Elicitor Binding Protein
CERK1	Chitin Elicitor Receptor Kinase
CWDE	Cell Wall Degrading Enzyme
DAMP	Damage Associated Motif Pattern
ETI	Effector-Triggered Immunity
ETS	Effector-Triggered Susceptibility
F	Fengycin
GABA	γ -aminobutyric acid
HR	Réaction d'hypersensibilité
HSA	Heptanoic Salicylic Acid
IC₅₀	Half maximal inhibitory concentration
JA	Jasmonic Acid
LOX	Lipoxygenase
M	Mycosubtilin
MAMP	Microbe Associated Motif Pattern
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
OXO	Oxalate oxydase
PAL	Phenylalanine Ammonia Lyase
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBZ	Probenazol (3-allyloxy-1,2-benzisothiazole-1,1-oxide)
PCD	Programmed Cell Death
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PGA	Pyroglutamic Acid

POX	Peroxidase
PR	Pathogenesis Related
PTI	PAMPTriggered Immunity
QTL	quantitative trait loci
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transcription
S	Surfactin
SA	Salicylic Acid
SAR	Systemic Acquired Resistance
SDN	Stimulateur de Défenses Naturelles
SDP	Stimulateur de Défense des Plantes
STB	Septoria Tritici Blotch
TUB	Tubulin
<i>Z. tritici</i>	<i>Zymoseptoria tritici</i>

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux gènes de virulence de <i>Z. tritici</i> (Mirzadi Gohari, 2015, adapté de Rudd, 2015)	15
Tableau 2. Principaux gènes de résistance du blé tendre (<i>Triticum aestivum</i> L.) à <i>Z. tritici</i> , leur localisation chromosomique, les cultivars sur lesquels ils ont été identifiés et les marqueurs qui leur sont associés (Simón et al., 2012 ; Brown et al., 2015).	18

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'évolution historique des espèces de blé (Chantret et al., 2005).	8
Figure 2. Symptômes de <i>Zymoseptoria tritici</i> sur feuille de blé caractérisés par des tâches nécrotiques portant les pycnides (Source : personnelle).	11
Figure 3. Dynamique annuelle d'une épidémie de septoriose, illustrant les deux phases de reproduction : asexuée et sexuée (Ponomarenko et al., 2011).	12
Figure 4. Représentation schématique des différents stades de l'infection des feuilles de blé par <i>Z. tritici</i> (Steinberg, 2015).	14
Figure 5. Schématisation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) et ses métabolites (Vlot et al., 2009). Abréviations: Phenylalanine ammonia lyase (PAL); Isochorismate synthase (ICS); Isochorismate pyruvate lyase (IPL); Acide benzoïque-2-hydroxylase (BA2H); SA glucosyltransferase (SAGT); acide aminé (aa); SA méthyltransferase (SAMT); SA-binding protein 2 (SABP2); méthyl esterase (MES); ester de glucose de salicyloyl (SGE); SA O-β-glucoside (SAG); méthyl salicylate (MeSA); méthyl salicylate O-β-glucoside (MeSAG).	22
Figure 6. Modèle en « zigzag » proposé par Jones et Dangl, (2006) illustrant l'interaction plante-pathogène.	30
Figure 7. Structures et propriétés des trois principales familles des lipopeptides cycliques d'origine microbienne (Ongena et Jacques, 2008).	36
Figure 8. Processus de transformation de la betterave sucrière et différents sous-produits obtenus (Morrison, 2009).	40
Figure 9. Estimation de l'évolution de la part des produits de biocontrôle (bio-pesticides) et celle des produits conventionnels dans le marché de protection des plantes (Olson, 2015).	56

Avant-Propos

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente thèse et présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de trois laboratoires :

1. Institut Charles Viollette (ICV, EA 7394), Institut Supérieur d'Agriculture, Yncréa Hauts-de-France, Lille
2. Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA 4492), Université du Littoral Côte d'Opale, Calais
3. Laboratoire de Chimie Durable et Santé, Lille Inflammation Research International Center (LIRIC, Inserm U995), Hautes Etudes d'Ingénieur, Yncréa Hauts-de-France, Lille

Les activités ont été menées dans le cadre de deux projets de recherche, dans lesquels je suis impliquée :

- **Optistim** 2014-2017 « Optimisation de l'efficacité de stimulateurs de défense des plantes bio-sourcés pour une lutte alternative en protection des cultures ». Partenaires : ISA, ULCO, HEI. Financement : Fonds de soutien UCL.
- **Newbiopest** 2014-2017 « Étude des potentialités de nouvelles biomolécules pour la protection des plantes en agriculture biologique ». Partenaires : ISA, Université de Lille, ULCO, FREDON, Pôle Légumes Région Nord. Financement : Région Hauts-de-France.

Introduction générale

Les fongicides conventionnels ont prouvé leur efficacité à protéger les cultures contre les stress biotiques et à améliorer les rendements et la qualité des productions agricoles. Néanmoins, plusieurs études ont montré que l'application de ces produits n'était pas dépourvue d'inconvénients. En effet, plusieurs effets secondaires sur la santé humaine et sur l'équilibre environnemental ont été reportés et ont fait de ces produits un sujet controversé. De plus, l'application massive des pesticides exerce une forte pression de sélection au sein des populations d'agents pathogènes et entraîne l'apparition de souches de plus en plus virulentes capables de contourner les résistances de la plante et de développer des résistances aux matières actives utilisées. De telles pratiques sont responsables d'importantes pertes économiques et de dégâts environnementaux.

Les pays de l'Union Européenne, conscients des contrariétés liées à l'emploi des intrants chimiques, visent la réduction de leur utilisation et soutiennent le développement de moyens alternatifs de lutte. Les objectifs étant une production qualitative, quantitative mais aussi répondant aux exigences d'un développement durable.

Diverses procédures législatives ont permis la mise en œuvre de ces nouvelles stratégies, comme la directive (128/2009/EC) du parlement Européen qui exige des différents pays membre de l'UE de prendre les mesures nécessaires afin de diminuer l'utilisation des pesticides et les remplacer quand c'est possible par des produits alternatifs, dans le cadre d'une lutte intégrée.

Depuis 2008, la France a pris plusieurs mesures afin de réduire les risques liés à l'utilisation des pesticides. En effet, plus de 30 produits jugés comme les plus toxiques ont été interdits d'utilisation et une taxe sur les produits phytosanitaires a été instaurée. La valeur de cette taxe est de plus en plus élevée en fonction du niveau de la toxicité du produit (Butault et *al.*, 2012). De plus, et dans le cadre d'une démarche de conversion vers une agriculture plus saine et plus durable, des crédits d'impôt en faveur de projet agricoles biologiques ont été accordés. Parmi les stratégies adoptées dans le pays, nous trouvons également le plan national Ecophyto, qui a été acté lors du Grenelle de l'environnement et dont l'objectif était d'assurer la réduction de l'utilisation des pesticides de synthèse de 50% en 2018 (Ecophyto 1). L'objectif fixé n'a pu être atteint pour plusieurs raisons dont des freins économiques. La date a donc été reportée à 2025 (Ecophyto 2) (Guériaux et Tessier, 2018).

Les principaux produits alternatifs aux fongicides conventionnels sont les biopesticides et les stimulateurs de défenses des plantes. Peu d'éliciteurs et de biofongicides sont homologués sur blé, qui représente l'une des principales cultures en France et dans le monde. *Zymoseptoria*

tritici, qui cause la septoriose, est l'agent pathogène le plus important sur le blé, responsable de pertes majeures sur le rendement. L'utilisation abusive des fongicides conventionnels pour contrôler la maladie est, non seulement très onéreuse, mais aussi responsable de l'apparition de résistances aux fongicides. Il s'avère donc très important de trouver des alternatives durables afin de contrôler ce parasite.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont pour objectifs (i) l'identification de nouveaux produits de biocontrôle (éliciteurs ou bio-fongicides) bio-sourcés, (ii) l'évaluation de leur efficacité à protéger le blé tendre contre la septoriose et (iii) l'analyse du mode d'action de certains d'entre eux.

Durant ces travaux, nous avons testés plusieurs types de molécules et ce, dans le cadre des deux projets cités en avant-propos (**Optistim** et **Newbiopest**).

- **Le projet Optistim** a pour objectif de tester le potentiel SDP de molécules dérivées de coproduits de la betterave sucrière sur le pathosystème blé-*Z. tritici*.
- **Le projet Newbiopest** vise à étudier des lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis*. Elles ont été testées sur divers pathosystèmes (poireau-*Pyrenochaeta terrestris*, pomme de terre-*Phytophthora infestans* et blé-*Zymoseptoria tritici*). Seuls les travaux réalisés sur le pathosystème blé-*Z. tritici* font partie de mon projet de thèse et seront donc présentés dans ce document.

Ce manuscrit de thèse est composé d'une **première partie** qui aborde une synthèse bibliographique générale et qui est scindée en deux chapitres :

- Le chapitre 1 présente les principales caractéristiques du pathosystème blé-*Z. tritici* et les bases des interactions hôte-pathogène, dont celle de blé-*Z. tritici*.
- Le chapitre 2 expose les moyens de lutte les plus utilisés contre la *Z. tritici*. Il décrit également les SDP et les bio-fongicides ainsi que l'intérêt de l'utilisation des coproduits de biomasses pour la production de biomolécules d'intérêt. Il comprend aussi une brève présentation du concept de la chimie verte utilisée par l'équipe HEI pour la production de certaines molécules utilisées dans ce travail.

La **deuxième partie** est consacrée à la présentation des résultats les plus pertinents sous forme d'articles scientifiques (en cours de soumission, soumis ou accepté). Ces articles au nombre de 4 ont à la fois des points communs et des différences qui expliquent leur originalité.

Article 1, en cours de correction avant soumission : Dans cet article, nous nous sommes intéressés à la saccharine. Cet édulcorant artificiel dispose déjà de propriétés élicitrices de défense des plantes sur certaines cultures. A cet effet, nous l'avons testé pour la première fois sur le pathosystème blé-*Z. tritici*. Nous avons évalué les activités directes (antifongiques) et indirectes (stimulation des défenses naturelles) et avons dégagés certaines informations concernant les voies impliquées dans la défense observée.

Article 2, en cours de correction avant soumission : Cet article aborde une partie importante des résultats obtenus dans le cadre du projet Optistim. Par des processus de chimie verte, nous avons créés des molécules issues de coproduits de transformation de la betterave sucrière (les mélasses), dépourvues d'effets directs sur le développement du champignon. Ces molécules possédant ou non des propriétés élicitrices des défenses ont fait l'objet d'une étude de relation structure-activité. Nous avons ensuite effectué une investigation des voies de défense impliquées pour deux molécules retenues (ainsi que le GABA) parmi un set de 29 molécules néo-synthétisées.

Article 3, soumis au *Journal of the Science of Food and Agriculture* (IF : 2.46): Dans ce papier, nous nous sommes intéressés à l'acide salicylique. Ce dernier est connu pour son rôle comme éliciteur des défenses des plantes et surtout comme signal endogène produit en présence d'une réponse systémique acquise. Nous l'avons conjugué avec l'acide pyroglutamique (issue des mélasses de la betterave sucrière). Le but était de savoir si la conjugaison de ces deux molécules allait produire des molécules plus ou moins intéressantes que les molécules mères. Bien que les résultats soient encore préliminaires, ils sont pertinents puisque la combinaison des deux molécules a donné naissance à des produits moins biocides et plus protecteurs du blé contre *Z. tritici*.

Article 4, publié dans *Environmental Science and Pollution Research* (IF : 2.74): Nous avons réalisé les travaux présentés dans cette publication dans le cadre du projet NewBioPest. Nous avons évalué des lipopeptides cycliques issus de *B. subtilis* pour déterminer leur efficacité à protéger le blé tendre contre *Z. tritici*. A cette fin, nous avons mis en évidence différents modes d'action de ces lipopeptides. Les niveaux de protection les plus marquants ont été obtenus avec la mycosubtiline, un bio-fongicide très efficace contre *Z. tritici*.

Enfin, dans la **dernière partie**, nous récapitulons les principaux résultats obtenus et présentons les différentes conclusions que nous pouvons en tirer. Nous terminons avec les différentes perspectives et travaux futurs qui restent à entamer dans ce sujet de recherche.

I. Synthèse Bibliographique Générale

Chapitre I

Le pathosystème blé Septoriose

1 Le blé : plante modèle étudiée

Le blé, avec le maïs et le riz, représentent les trois principales céréales cultivées dans le monde (Shewry, 2009). Le blé est une monocotylédone ; cette céréale fait partie du règne des *plantae*, du sous règne des *Tracheobionta*, de la classe des *Liliopsida*, de la famille des *Poacea*, de la tribu des *Triticeae* et du genre des *Triticum* qui contient à peu près 300 espèces (Matsuoka, 2011). Les deux espèces majeures cultivées du genre *Triticum* sont le blé dur (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) avec un génome tétraploïde ($2n = 28$, AABB) et le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) avec un génome hexaploïde ($2n = 42$, AABBDD).

Les formes primitives cultivées du blé sont ‘einkorn’ ou engrain qui est un diploïde connu sous le nom *Triticum monococcum* spp. *monococcum* (génome AA) et ‘emmer’ ou amidonnier tétraploïde qui est *Triticum turgidum* spp. *dicoccom* (génome AABB). Les recherches ont montré que ces deux espèces ancestrales ont été sélectionnées à partir des populations sauvages en se basant sur plusieurs critères dont le rendement (Bonjean, 2001). Au 20^{ème} siècle, les recherches ont montré que le blé hexaploïde *T. aestivum* n’a pas d’ancêtre sauvage et qu’il est le résultat d’un croisement spontané entre le blé tétraploïde cultivé *T. turgidum* et une graminée sauvage diploïde du genre *Aegilops tauschii* ($2n = 14$, DD) (Doussinault et al., 2001) (Figure 1). Le blé tendre (*T. aestivum* L.) est l’une des premières espèces domestiquées par l’homme il y a environ 10000 ans dans la région du croissant fertile du proche orient (Lev-Yadun et al., 2000). En effet, au Néolithique l’homme chasseur nomade était obligé d’adapter son style de vie aux conditions climatiques de plus en plus extrêmes et d’adopter un nouveau style de vie en devenant agriculteur sédentaire (Bonjean, 2001). Depuis, la culture de blé n’a cessé d’évoluer et d’occuper un rôle important dans l’alimentation humaine et animale (Shewry, 2009; Abis, 2015). À partir de son centre d’origine, le blé s’est propagé dans le monde entier et a atteint l’ouest de l’Europe environ 5 000 ans avant JC (Doussinault et al., 2001).

De nos jours, le blé est la céréale la plus cultivée en termes de surfaces emblavées et constitue l’aliment de base pour plus d’un tiers de la population mondiale. Selon le conseil international des céréales, la production mondiale du blé est estimée à 758 millions de tonnes en 2017/2018.

Le blé dur représente environ 4 % de la production du blé et les surfaces cultivées se situent majoritairement au niveau du bassin méditerranéen et du continent nord-américain. Le blé tendre est de loin le plus cultivé en Europe et dans le monde. Les grains panifiables se caractérisent par un albumen plus ou moins dur avec une texture farineuse ; il possède une forte teneur en amidon nécessaire à fabrication des farines.

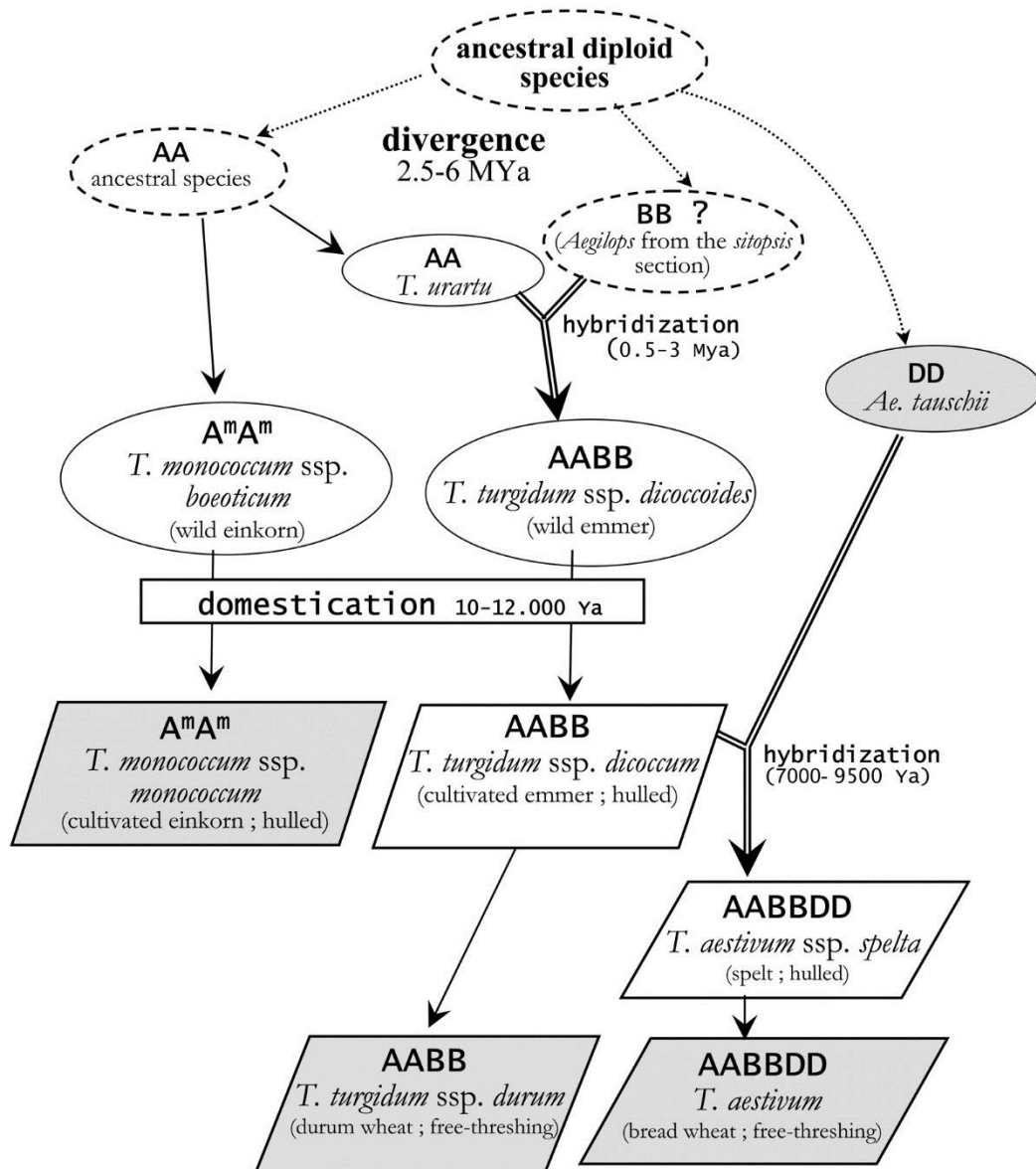


Figure 1. Représentation schématique de l'évolution historique des espèces de blé (Chantret et *al.*, 2005).

L'Union Européenne est le premier producteur mondial de blé suivie par la Chine, l'Inde, la Russie et les Etats Unis (Statista, 2018). En France, le blé tendre représente la première céréale cultivée avec 54% du total des surfaces agricoles, dépassant l'orge et le maïs (Agreste, 2015). Depuis les années 1970, la France présente le 5^{ème} producteur mondial de blé ; elle est aussi le 1^{er} producteur et exportateur de blé tendre de l'Union Européenne, devant l'Allemagne.

La diversité génétique du blé a permis le développement de plus de 25 000 variétés différentes adaptées à divers environnements (Shewry, 2009). Les stades de développement de la culture

ont été décrits et détaillés par Zadoks et *al.*, (1974) d'où le nom de l'échelle de Zadoks' qui est l'une des références utilisées pour suivre le développement de la culture.

Le développement de la culture de blé passe par trois phases principales ; (i) la phase végétative, correspondant au développement herbacé de la plante avec la croissance des racines, des feuilles et des talles, (ii) la phase de floraison ou de reproduction, correspondant au développement des fleurs et des épis, et (iii) la phase de remplissage et de maturation des grains.

Tout au long de son cycle de développement, la culture du blé est sujette à plusieurs maladies fongiques qui peuvent attaquer les différents organes (racines, feuilles, épis...). Certaines de ces maladies sont causées par des champignons biotrophes qui se développent aux dépens des tissus vivants, alors que d'autres sont dues à des champignons nécrotrophes qui se développent en induisant des nécroses pour puiser les nutriments contenus dans les tissus de la plante.

Parmi les maladies causées par des biotrophes, sont notées la rouille (rouille jaune et brune causées par *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* et *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, respectivement) et l'oïdium causé par *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. La fusariose de l'épi causée par un complexe d'espèces appartenant aux genres *Fusarium* et *Microdochium*, ainsi que l'helminthosporiose qui est une maladie foliaire causée par *Helminthosporium tritici repens*, font partie des maladies causées par des champignons nécrotrophes.

La septoriose du blé fait partie des maladies les plus nuisibles sur la culture. Elle est causée par un champignon hémibiotrophe combinant deux phases (biotrophe et nécrotrophe).

2 La septoriose du blé

2.1 Présentation de la maladie

La septoriose est l'une des maladies les plus rencontrées sur la culture du blé dans toutes les zones de production. L'appellation générique « septoriose du blé » regroupe deux maladies fongiques foliaires responsables d'importantes pertes de rendement : *Septoria tritici* blotch (STB) causée par le champignon ascomycète *Mycosphaerella graminicola*/*Septoria tritici*, récemment dénommé *Zymoseptoria tritici* (Quaedvlieg et *al.*, 2011), qui attaque uniquement les feuilles, et *Septoria glume blotch* (SGB), causée par *Phaeosphaeria nodorum* /*Septoria nodorum*, dénommé *Parastagonospora nodorum*, qui attaque les feuilles mais aussi les épis et les grains du blé (Eyal, 1999). *P. nodorum* était le champignon le plus dominant sur blé jusqu'aux années 1980, date, à laquelle *Z. tritici* est devenu le plus fréquent (Shaw et *al.*, 2008).

Bearchell et *al.* (2005) ont déduit que l'évolution des fréquences respectives des deux maladies au Royaume-Uni, semble être liée à la pollution atmosphérique, principalement aux émissions de dioxyde de soufre.

Actuellement, *Z. tritici* présente le champignon responsable de la maladie la plus dévastatrice de la culture du blé dans le monde et en Europe (Jørgensen et *al.*, 2014). La nuisibilité moyenne à l'échelle du territoire français est de 17 q/ha (Oste. et *al.*, 2000; Arvalis, 2013) ; cette valeur varie fortement selon l'année et les régions. Sous certaines conditions telles que la forte pression fongique et l'absence de traitement, le rendement peut être diminué de 50 qx/ha (Shaw et *al.*, 2008). L'impact sur le rendement dépend à la fois de l'intensité de l'épidémie et du stade de la croissance du blé lors de la contamination. Le degré d'infection des feuilles supérieures, en particulier la feuille drapeau, est déterminant vu que le remplissage des graines dépend principalement de la photosynthèse assurée par ces feuilles (Shaw et Royle, 1989).

Les pertes sont liées principalement à l'utilisation des variétés sensibles et aux pratiques culturales favorables au développement du pathogène, telles que l'utilisation massive de la fertilisation azotée et la monoculture de blé ou de céréales à paille qui peuvent présenter des foyers de contamination (Eyal, 1999). Chaque année, environ 70% des fongicides utilisés par l'Union Européenne sont destinés à la protection du blé contre STB (Fones et Gurr, 2015). La France, l'Allemagne et le Royaume-Uni dépensent à eux seuls plus d'un milliard d'euros pour lutter contre ce pathogène (Torriani et *al.*, 2015).

2.2 Symptômes de la maladie

Les symptômes de la maladie débutent par l'apparition de taches chlorotiques au niveau du limbe foliaire. Ces taches de formes ovales ou rondes évoluent à partir du 10^{ème} jour après l'installation du champignon et se manifestent sous forme de lésions nécrosées qui contiennent des fructifications brunes ou noires visibles à l'œil nu : les pycnides (Figure 2). Ces structures sont issues de la multiplication asexuée et sont formées aussi bien sur la face supérieure que sur la face inférieure des feuilles (Kema et *al.*, 1996). Les lésions matures s'allongent tout au long des nervures de la feuille et finissent par se rejoindre jusqu'à la recouvrir en totalité (Eyal, 1999). La taille et la fréquence des pycnides au niveau des lésions varient selon la sensibilité de la variété attaquée, la pathogénicité du champignon et les conditions environnementales. Il a été rapporté que les symptômes de la maladie ainsi que les pycnides peuvent être observés sur différents organes de la plante, tels que les gaines foliaires et les enveloppes du caryopse de blé

au niveau des épis (Brokenshire, 1975; Eyal, 1999). Toutefois, ils sont aujourd'hui observés uniquement sur les limbes foliaires.



Figure 2. Symptômes de *Zymoseptoria tritici* sur feuille de blé caractérisés par des tâches nécrotiques portant les pycnides (Source : personnelle).

2.3 Cycle épidémique et processus infectieux

Z. tritici est un loculoascomycète hétérotallique (Ware, 2006). Hunter et *al.*, 1999, ont montré que la formation de pseudothèces issus de la reproduction sexuée s'effectue uniquement en conditions naturelles et dépend donc des conditions environnementales peu connues. Halama et Lacoste (1992) ont montré, chez *P. nodorum*, que la lumière et la température sont deux facteurs influençant la reproduction sexuée du champignon. De manière générale, la reproduction sexuée des champignons dépend de loci dénommés *mating types*. Chez les ascomycètes, les *mating types* se présentent sous deux formes distinctes, mat1-1 et mat1-2 (Nelson, 1996) ; alors que chez les basidiomycètes, on observe quatre formes différentes : mat1-1, mat1-2, mat2-1 et mat2-2 (Coppin et *al.*, 1997). Chez les ascomycètes hétérothalliques bipolaires (comme *Z. tritici*), les deux loci se situent sur la même région chromosomique, ce qui fait qu'un individu ne peut présenter qu'un seul *mating-type*. La reproduction sexuée entre deux individus n'est possible que si les deux individus sont de *mating-types* opposés (Kema et *al.*, 1996). La reproduction sexuée entre individus aboutit à la formation d'un pseudothèce renfermant des asques pourvus chacun de huit ascospores. Sur les huit ascospores produites, quatre sont de type MAT1-1 tandis que les autres sont de type MAT1-2. La population française de *Z. tritici* présente un potentiel de reproduction sexuée élevé (Siah et *al.*, 2010a ; 2018a), cette reproduction est à l'origine de l'adaptation du champignon à son environnement et de la plasticité de son génome ; elle lui permet de contourner les résistances variétales, de s'adapter aux contraintes biotiques et abiotiques et de développer des résistances aux fongicides (Fraaije et *al.*, 2005).

Une épidémie de *Z. tritici* débute principalement en automne, dès la levée du blé. Les contaminations primaires des jeunes plantules s'effectuent à la fois par les pycniospores issues des pycnides et dispersées par les gouttelettes de pluies sur de courtes distances, et par les ascospores produites dans les pseudothèces et disséminées par le vent sur de plus longues distances (Shaw et Royle, 1989; Eyal, 1999; Eriksen et Munk, 2003). Le cycle de reproduction et de dissémination du champignon est ainsi caractérisé par la présence de deux phases : asexuée et sexuée (Figure 3).

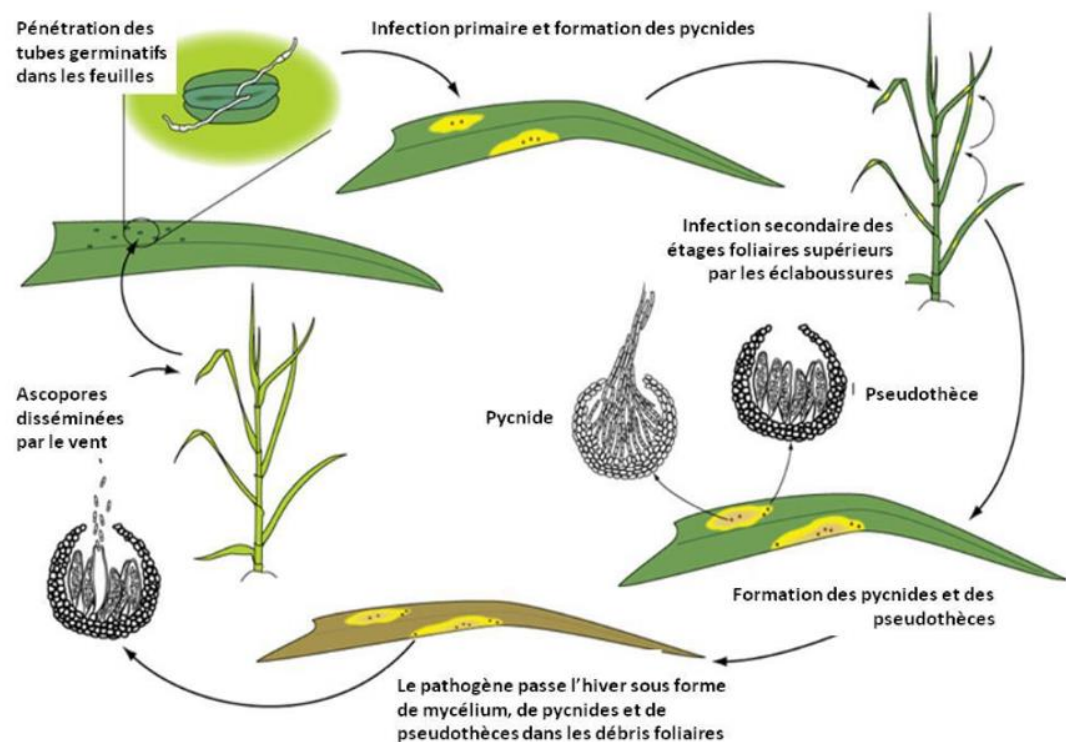


Figure 3. Dynamique annuelle d'une épidémie de septoriose, illustrant les deux phases de reproduction : asexuée et sexuée (Ponomarenko et *al.*, 2011).

Z. tritici est un pathogène fongique filamenteux ayant la particularité d'être hémibiotrophe. Durant la phase latente (biotrophe), il assimile les nutriments tels que les carbohydrates solubles disponibles dans l'apoplaste mais ne secrète ni toxines ni composés capables de tuer son hôte. Le passage de la phase biotrophe à la phase nécrotrophe est probablement déclenché par des quantités importantes de biomasses fongiques et/ou par la modification de la physiologie de l'hôte. Ce passage s'effectue brusquement entre 10 et 15 jours suite à l'initiation du processus infectieux (Rudd, 2015). Ce délai peut varier en fonction de la sensibilité des cultivars, de la virulence des souches ainsi que des conditions environnementales (McDonald et *al.*, 2015). L'hémibiotrophie du champignon a été discutée par Orton et *al.* (2011), les auteurs soulignent

l'absence de preuves d'approvisionnement du champignon et de structures spécialisées généralement présentes chez d'autres champignons biotrophes tels que haustoria ou arbuscules. De leur côté, Sánchez-Vallet et *al.* (2015), ont suggéré que *Z. tritici* devrait plutôt être considéré comme nécrotrophe ; ils se sont basés dans leur étude sur une comparaison avec d'autres pathogènes nécrotrophes, comme *Ramularia collo-cygni*, *Leptosphaeria maculans* et *Rhynchosporium commune*, qui passent eux aussi par une phase de latence durant laquelle aucun symptôme de la maladie n'est visible sur la plante. Les études des auteurs viennent en effet consolider ceux effectués précédemment par Hammond-Kosack et Rudd, (2008) qui pensent aussi que le pathogène a un style de vie plus nécrotrophe qu'hémibiotrophe. En attendant que d'autres études soient menées sur la classification du champignon qui n'a pas encore été modifiée, nous considérons dans ce manuscrit que *Z. tritici* est hémibiotrophe.

Le processus infectieux débute par le dépôt d'une spore issue de la reproduction sexuée ou asexuée sur la surface d'une feuille de blé. Une température de l'ordre de 20°C et une humidité élevée permettent à cette spore de germer (Kema et *al.*, 1996) donnant naissance à un hyphes. Les hyphes pénètrent les tissus foliaires principalement à travers les stomates (Cohen et Eyal, 1993; Kema et *al.*, 1996; Cunfer, 1999; Duncan et Howard, 2000, Rohel et *al.*, 2001; Palmer et Skinner, 2002) mais aussi de façon directe à travers la cuticule de la feuille et au niveau des parois périclinales ou anticlinales des cellules épidermiques (El Chartouni et *al.*, 2012 ; Selim et *al.*, 2014 ; Shetty et *al.*, 2003 ; Siah et *al.*, 2010b). La capacité germinative des spores de *Z. tritici* est très élevée. Cohen et Eyal (1993) ont rapporté qu'en conditions humides et à 22°C, 85 à 90 % des spores présentes sur des feuilles de blé germent en seulement 24-26 heures après l'inoculation. Plusieurs hyphes mycéliens peuvent pénétrer la feuille à travers le même stomate (Kema et *al.*, 1996). Les spores initient leur développement uniquement dans un environnement qui répond à certaines conditions nécessaires au bon déroulement du cycle de vie du champignon (Lucas, 2004). L'humidité et la température constituent les variables majeures qui conditionnent cette initiation. Une fois que l'hyphes pénètre la feuille, il entame un processus de colonisation des chambres sous-stomatiques et du mésophylle, qui aboutit à l'apparition des pycnides au bout de deux semaines approximativement (Palmer et Skinner, 2002). La figure 4 schématise les stades de l'infection ayant lieu au niveau des tissus foliaires. Suite à l'apparition des pycnides, le champignon libère une gelée sporifère appelée « cirrhe ». Cette gelée renferme des pycnidiospores en suspension qui seront disséminées vers les étages supérieurs de la même plante et vers les feuilles des plantes de blé voisines, via les éclaboussures de pluie, appelé phénomène de « *splashing* » (Sanderson et Hampton, 1978).

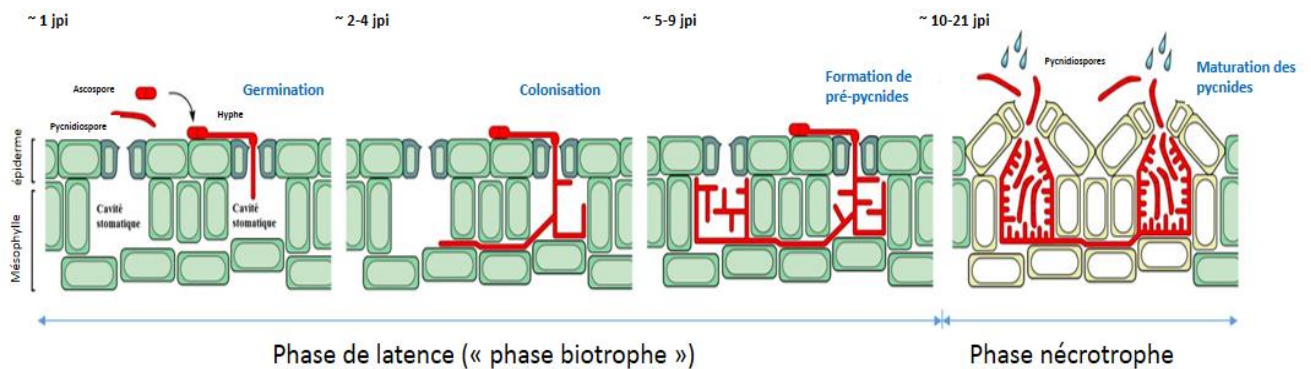


Figure 4. Représentation schématique des différents stades de l'infection des feuilles de blé par *Z. tritici* (Steinberg, 2015).

2.4 Caractéristiques du génome de *Z. tritici*

Le génome de *Z. tritici* a été séquencé par le département de l'*Energy's Joint Genome Institute* avec un isolat issu du champ, IPO323, désigné comme référence. IPO323 a un génome de taille totale de 39,7 Mb avec 21 chromosomes qui ont des tailles variant entre 0,3 et 6 Mb (Orton et al., 2011). Treize chromosomes sont considérés comme des chromosomes de base, qui sont à priori essentiels alors que les huit chromosomes restant sont dispensables malgré qu'ils renferment à peu près 12% du génome (Mehrabi et al., 2007; Wittenberg et al., 2009). Mis à part ces 8 chromosomes que le champignon peut perdre ou posséder en partie, il y a d'autres caractéristiques de la plasticité génomique de *Z. tritici*. Parmi les particularités détectées entre parents et progéniture, on trouve la présence de deux copies du même chromosome, la translocation de sections chromosomiques, le polymorphisme de longueur et le polymorphisme de nombres de copies du chromosome comprenant des disomies (Goodwin et al., 2011).

Le champignon peut servir comme modèle pour l'étude de la dynamique et de l'évolution des populations pathogènes, de la génétique et de la génomique des interactions hôte-pathogène (Dean et al., 2012). Il est également l'objet de nombreuses études épidémiologiques (Heath, 2001). Avant la publication du génome de la souche de référence IPO323, plusieurs gènes de pathogénicité et de virulence, codant pour la plupart pour des protéines de signalisation, ont été caractérisés grâce à des stratégies de *gene silencing* (Cousin et al., 2006, Mehrabi et Kema, 2006, Mehrabi et al., 2006b).

3 Interaction blé-*Zymoseptoria tritici*

3.1 Pouvoir pathogène de *Z. tritici*

A ce jour, 20 gènes de pathogénicité ou de virulence ont été identifiés chez *Z. tritici*. Ces gènes jouent un rôle dans les voies de signalisation cellulaire et/ou agissent en tant que régulateurs métaboliques globaux (Tableau 1).

Tableau 1. Principaux gènes de virulence de *Z. tritici* (Mirzadi Gohari, 2015, adapté de Rudd, 2015)

Gène	Catégorie	Référence
MgAtr4	ABC Transporter	(Stergiopoulos et <i>al.</i> , 2003)
MgFus3	Mitogen-activated protein kinase (MAPK)	(Cousin et <i>al.</i> , 2006)
MgSlt2	MAPK	(Mehrabi et <i>al.</i> , 2006a)
MgHog1	MAPK	(Mehrabi et <i>al.</i> , 2006b)
MgSTE11	MAPK kinase kinase	(Kramer et <i>al.</i> , 2009)
MgSTE50	Scaffold protein for MAPK signaling	(Kramer et <i>al.</i> , 2009)
MgSTE12	Transcription factor target of MAPK signaling	(Kramer et <i>al.</i> , 2009)
MgSTE7	MAPK kinase	(Kramer et <i>al.</i> , 2009)
MgAlg2	Protein N-Glycosylation	(Motteram et <i>al.</i> , 2011)
MgGpa1	G-protein alpha subunit	(Mehrabi et <i>al.</i> , 2009)
MgGpa3	G-protein alpha subunit	(Mehrabi et <i>al.</i> , 2009)
MgGpb1	G-protein alpha subunit	(Mehrabi et <i>al.</i> , 2009)
MgTpk2	Protein kinase A catalytic subunit	(Mehrabi et Kema, 2006)
MgBcy1	Protein kinase A regulatory subunit	(Mehrabi et Kema, 2006)
Mg3LysM	Chitin binding effector protein	(Marshall et <i>al.</i> , 2011)
MCC1	c-type cyclin	(Choi et Goodwin, 2011)
ZtWor1	Transcription factor	(Mirzadi Gohari et <i>al.</i> , 2014)
Zt80707	Unknown/Secreted	(Poppe et <i>al.</i> , 2015)
Zt89160	Unknown	(Poppe et <i>al.</i> , 2015)
Zt103264	Unknown	(Poppe et <i>al.</i> , 2015)

Bien que beaucoup d'études ont été menées ces dernières années afin d'expliquer et mieux comprendre les interactions blé-*Z. tritici* (Kilaru et Steinberg, 2015; Sidhu et *al.*, 2015), les mécanismes moléculaires impliqués ne sont toujours pas complètement élucidés. Toutefois, le développement récent de nouveaux outils génétiques permettra l'accélération des analyses

fonctionnelles des gènes de *Z. tritici* (Kilaru et Steinberg, 2015, Sidhu et *al.*, 2015) et donc l'acquisition de nouvelles données informatives.

On sait que le champignon doit surmonter dans un premier temps les défenses passives de la plante ainsi que les réponses précoces qu'elle envoie et ce, en les contournant ou en les neutralisant. *Z. tritici* sécrète une protéine effectrice appelée Mg3LysM dans les premiers stades de colonisation. Cette protéine piège les fragments de chitine libérés par les parois fongiques (Marshall et *al.*, 2011) et empêche ainsi la plante de reconnaître le champignon. En effet, l'inactivation des récepteurs CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase*) ou CEBiP (*chitin elicitor binding protein*) impliqués dans la perception de la chitine au niveau de la membrane plasmique du blé, a permis de rétablir la pathogénicité des souches Δ Mg3LysM (Lee et *al.*, 2014). Le premier facteur de virulence ou d'agressivité identifié chez *Z. tritici* était MgAtr4, qui est un transporteur membranaire appartenant à la famille des ABC (*ATP-Binding Cassette*). Il a été suggéré que ce transporteur a le rôle de protéger le champignon contre les phytoalexines produites par la plante au niveau des cavités sous-stomatiques (Stergiopoulos et *al.*, 2003 ; Kema et *al.*, 2008). D'autres gènes impliqués dans la virulence ont aussi été identifiés ; le gène *MgSlt2* encode pour une MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), importante dans la colonisation du mésophylle ; alors que *MgHog1* encode pour une autre MAPK qui joue un rôle crucial dans la transition entre la germination des spores et la croissance mycélienne (Mehrabi et *al.*, 2006). Enfin, le gène *ZtWor1* régulé par la voie de l'AMPc (*Adénosine monophosphate cyclique*) est impliqué dans la colonisation et la fructification de *Z. tritici* (Mirzadi Gohari et *al.*, 2014).

Lors de l'infection de la plante, *Z. tritici* produit des enzymes de dégradation des parois cellulaires appelées CWDEs (*Cell Walls Degrading Enzymes*) (Douaiher et *al.*, 2007 ; Siah et *al.*, 2010b ; Somai et *al.* 2017 ; Ors et *al.*, 2018). Ces enzymes ont le rôle de dégrader des composants majeurs des parois cellulaires des plantes qui ne sont autres que les protéines et les polysaccharides. En fonction de leurs fonctions, deux principales classes de CWDEs peuvent être identifiées : les protéases impliquées dans la dégradation des protéines et les CAZymes ou enzymes impliquées dans la dégradation des carbohydrates (Goodwin et *al.*, 2011 ; Brunner et *al.*, 2013). Les CWDEs sont produites essentiellement pendant la phase nécrotrophe afin de dégrader les parois cellulaires, libérer les nutriments et différencier les nécroses foliaires (Douaiher et *al.*, 2007 ; Siah et *al.*, 2010b ; Somai et *al.* 2017 ; Ors et *al.*, 2018).

Bien que l'acquisition des nutriments par les spores de *Z. tritici* lorsqu'elles sont en phase de latence n'est toujours par claire, les données sur l'ARN-séq indiquent que les gènes impliqués

dans l'oxydation bêta des acides gras et des lipides sont régulés spécifiquement un jour après l'inoculation, suggérant que les enzymes attaquant ces molécules organiques pourraient être la principale source de nutriments à ce stade précoce de l'infection (Rudd et *al.*, 2015). Ceci peut expliquer l'augmentation limitée de la biomasse durant la phase biotrophe. Le nombre important de protéases produites par *Z. tritici* pendant la phase de croissance biotrophique soutient cette hypothèse et suggère que *Z. tritici* obtient les nutriments nécessaires par dégradation des protéines de son hôte qui se retrouvent dans l'apoplaste ou au niveau de la paroi cellulaire (Goodwin et *al.*, 2011). Certaines de ces protéases produites pourraient également cibler les enzymes de défense de l'hôte, y compris les chitinases, et contribuer éventuellement à la virulence de *Z. tritici* d'une manière similaire à celle montrée pour *Fusarium oxysporum* sur tomate (Jashni et *al.*, 2015).

3.2 Résistance du blé à la septoriose

La résistance peut être définie comme la capacité d'une plante à prévenir ou à empêcher l'infection ou la croissance de son agresseur (agent pathogène) dans ses tissus. Comme pour la majorité des interactions plantes-pathogènes, deux types de résistance qualitative et quantitative sont mis en place lors de l'interaction blé-*Z. tritici*. Ces interactions diffèrent par plusieurs caractéristiques.

3.2.1 La résistance qualitative

Il s'agit d'une résistance spécifique et forte, contrôlée par un ou quelques gènes majeurs avec des effets importants. Elle est souvent limitée dans le temps à cause du contournement des résistances de la plante par le pathogène. Les gènes impliqués dans cette résistance sont présents sur les génomes A, B et D et répondent au modèle gène pour gène de Flor. Cependant, cela n'a été démontré que pour *Stb6* (Kema et *al.*, 2000 ; Brading et *al.*, 2002). Jusqu'à présent, 21 gènes *Stb* ont été cartographiés à l'aide de marqueurs moléculaires de type microsatellites (SSR), AFLP (amplified fragment-length polymorphism) et RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Tableau 2). La plupart de ces gènes sont efficaces uniquement contre les génotypes avirulents de *Z. tritici* (Goodwin et Thompson 2011; Simón et *al.*, 2012 ; Brown et *al.*, 2015). Parmi les 21 gènes, *Stb6* est fréquent dans les différentes variétés de blé et confère une résistance contre une partie de la population du champignon, bien que cette résistance soit très souvent contournée (Brown et *al.*, 2015 ; Saintenac et *al.*, 2018). *Stb6* est le seul gène cloné à ce jour (Saintenac et *al.*, 2018).

Tableau 2. Principaux gènes de résistance du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) à *Z. tritici*, leur localisation chromosomique, les cultivars sur lesquels ils ont été identifiés et les marqueurs qui leur sont associés (Simón et al., 2012 ; Brown et al., 2015).

Gène	Chromosome	Cultivar	marqueur
Stb1	5BL	Bulgaria88	Xgwm335
Stb2	3BS	Veranopolis	Xgwm389
Stb3	7AS	Israel 493	(non publié)
Stb4	7DS	Tadinia	Xgwm111
Stb5	7DS	Synthetic 6X	Xgwm44
Stb6	3AS	Flame	Xgwm369
Stb7	4AL	ST6	Xwmc219, Xwmc313
Stb8	7BL	W7984 synthetic	Xgwm146, Xgwm577
Stb9	2BL	Courtot	XksuF1, Xfbb226
Stb10	1D	Kavkaz-K45000 L6A4	Xgwm848, Xgwm603
Stb11	1BS	TE911	Xbarc008
Stb12	4AL	Kavkaz-K45000 L6A4	Xwmc219, Xwmc313
Stb13	4AL	Salamouni	Xwmc396
Stb14	3BS	Salamouni	Xwmc500
Stb15	6AS	Arina	Xpsr904
StbSm3	3AS	Salamouni	barc321
Stb16	3DL	Synthetic haploid M3	Xgwm494
Stb17	5AL	Synthetic haploid M3	Xhbg247
Stb18	6DS	Balance	Xpw5176, Xgpw3087
StbWW	1BS	WW1842, WW2449, WW2451	Xbarc119b
TmStb1	7AS	MDR043 (T. monococcum)	Xbarc174

3.2.2 La résistance quantitative

Cette résistance est régulée par plusieurs gènes et est donc polygénique. Elle est souvent efficace contre tous les génotypes de *Z. tritici* puisqu'elle est non race spécifique et donc moins facilement contournable par le champignon. Eriksen et al., (2003) ainsi que Chartrain et al., (2004) ont montré que la résistance quantitative est contrôlée par des *QTLs* (*quantitative trait loci*) qui ont été associés à des marqueurs moléculaires (Simón et al., 2012). A ce jour, 89 régions du génome portant des QTL ou des méta-QTL ont été identifiées à différents stades de développement de la plante. Certains QTL ont été cartographiés sur ou à proximité des locus des gènes Stb, en particulier autours de *Stb6* (Brown et al., 2015).

3.3 Les voies de défenses du blé contre *Z. tritici*

Plusieurs études ont été menées ces dernières années afin d'expliquer les interactions blé-*Z. tritici* (Kilaru et Steinberg, 2015; Sidhu et al., 2015 ; Somai et al., 2017; Ors et al., 2018). Les différentes voies moléculaires et biochimiques impliquées constituent une approche complémentaire dans la compréhension des mécanismes de résistance du blé contre *Z. tritici* (Goodwin et al., 2007 ; Adhikari et al., 2007). Deux types de réponses (précoces et tardives) sont mis en place par la plante suite à la détection de l'agent pathogène.

3.3.1 Les réponses cellulaires précoces

3.3.1.1 La cascade de phosphorylation : activation des MAPKs

L'apparition d'une réaction immunitaire chez la plante nécessite un transfert rapide du signal d'alarme qui correspond à l'identification de l'agent pathogène. Ce signal circule à partir du site d'agression vers les différents tissus jusqu'aux facteurs de transcription des gènes de défenses. La transduction de ce signal est assurée par l'activation rapide des cascades de signalisation faisant intervenir des protéines kinases comme les MAPKs. Les MAPKs sont impliquées dans des réponses à des stress abiotiques et biotiques et la majorité des PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) activent les MAPKs (Zhang et Klessig, 2001). Rudd et al. (2008) étaient les premiers à montrer l'implication des MAPKs dans l'interaction blé-*Z. tritici* suite à la reconnaissance des PAMPs. Les auteurs ont identifié *TaMPK3* qui est l'un des gènes codant pour une MAPK et ont montré son rôle dans le déclenchement de la PTI (*Plant Triggered Immunity*) et lors de l'entrée du champignon en phase nécrotrophe.

L'importance de la phosphorylation des protéines dans la résistance du blé à *Z. tritici* a été aussi mise en évidence par Yang et al., (2013).

3.3.1.2 Vague oxydative et formes activées de l'oxygène (FAO)

La reconnaissance du pathogène par la plante déclenche un flux ionique transmembranaire qui aboutit à une accumulation cytosolique des ions calcium (Ca^{2+}) responsables de différentes réactions dans des processus variés. Parmi les conséquences, une vague oxydative qui génère une accumulation rapide des FAO est déclenchée. Il s'agit donc, du premier évènement suivant la reconnaissance de l'agent pathogène. Parmi les FAO on peut citer le superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxide nitrique (NO) et le radical hydroxyle ($\text{HO}_2^{\bullet-}$). Ces composés sont impliqués dans la signalisation aboutissant à l'expression des gènes de défense,

à la réaction hypersensible (HR), à la production de phytoalexines, au renforcement barrières physiques, et à la réponse systémique acquise (SAR). (Parent *et al.*, 2008).

3.3.1.2.1 Le Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

L'accumulation de H₂O₂ renforce les parois cellulaires et empêche le développement du champignon. A des concentrations importantes, le H₂O₂ provoque la mort cellulaire et limite la dispersion du champignon à l'intérieur du tissu si celui-ci est biotrophe. Dans le cas de champignons hémibiotrophes, l'accumulation de cette molécule a lieu au cours de la phase biotrophe principalement chez les cultivars résistants, ce qui permet de limiter la pénétration foliaire et la croissance du champignon. Le rôle du H₂O₂ dans l'interaction blé-*Z. tritici* a été étudié en l'infiltrant dans des feuilles de blé avant de les contaminer avec *Z. tritici* (Shetty *et al.*, 2007). Ce traitement a permis de réduire la colonisation et la production de biomasse fongique et a aussi prolongé la période de latence séparant la phase biotrophe et la phase nécrotrophe. Plusieurs travaux ont démontré que H₂O₂ est nocif pour *Z. tritici* tout au long de son cycle de vie et que son accumulation au niveau des tissus de la plante peut varier en fonction du degré de sensibilité de cette dernière. En effet, chez les plantes résistantes, l'accumulation du H₂O₂ se fait de façon précoce durant la phase biotrophe du champignon, tandis que chez les plantes sensibles, l'accumulation est liée à l'augmentation de la biomasse fongique et atteint donc son maximum lors de l'apparition des nécroses. Il a été démontré que le champignon peut développer des tolérances au H₂O₂ à différents stades de la pathogenèse et particulièrement lors de la transition de la biotrophie à la nécrotrophie, qui est un événement crucial pour sa continuité (Shetty *et al.*, 2003, Shetty *et al.*, 2007).

3.3.1.2.2 Les peroxydases (POX)

Les POX végétales dites aussi de classe III utilisent le H₂O₂ pour oxyder une large variété de donneurs d'hydrogène (amines, acides ascorbiques, indoles, substances phénoliques, etc.). Ces enzymes sont impliquées dans de multiples processus physiologiques dont la lignification, l'oxydation des phénols et la subérisation. Ces processus sont notamment associés aux mécanismes de défense contre l'attaque par des agents pathogènes lors d'interactions compatibles.

L'activité POX a été étudiée chez des cultivars de blé résistants et sensibles à *Z. tritici*. Chez les cultivars résistants, il y a une accumulation des transcrits et une activité POX plus importante que chez les cultivars sensibles après inoculation avec *Z. tritici* (Shetty *et al.* (2003). L'augmentation de l'activité POX apparaît rapidement chez les cultivars résistants suivant

l'infection par *Z. tritici*, contrairement aux variétés sensibles qui ne présentent pas de variations significatives de l'activité POX tout au long du processus infectieux.

3.3.1.2.3 La catalase (CAT)

La catalase est située principalement dans les peroxysomes, son activité est liée étroitement à la disparition de H_2O_2 . Chen et *al.*, (1993, 1995) suggèrent que l'acide salicylique inhibe l'activité de la catalase, entraînant ainsi l'augmentation des niveaux de H_2O_2 dans la plante. Chez les cultivars sensibles de blé tendre, l'activité enzymatique des catalases augmente suite à l'infection par *Z. tritici*. Par contre, cette activité est réduite chez les cultivars résistants.

3.3.1.2.4 L'oxalate oxydase (OXO)

L'oxalate oxydase est une enzyme qui oxyde l'acide oxalique pour former du H_2O_2 et du CO_2 . L'implication des OXO dans les réactions de défense a été étudiée chez le blé et l'orge infectés par l'oïdium. (Bolwell et Wojtaszek, 1997). Ils constituent la famille des protéines PR (*Pathogenesis related*) et sont donc considérés comme des marqueurs de l'infection durant les interactions céréales-oïdium (Van Loon et *al.*, 2006).

3.3.1.3 La transmission du signal

Chez la plante, les phytohormones agissent sur divers processus physiologiques et constituent également des messagers responsables de la transduction de signaux de stress. C'est grâce aux phytohormones qu'une infection localisée peut induire un état de résistance général dans les organes non infectés de la plante. Les voies de signalisation liées aux réactions de défense chez les plantes sont régulées par 4 principales phytohormones : l'acide salicylique (AS), l'acide jasmonique (AJ), l'éthylène (ET) et l'acide abscissique (ABA). Dans le cadre de l'interaction blé -*Z. tritici*, seules les voies du SA et JA ont été explorées.

3.3.1.3.1 L'acide salicylique (AS)

L'AS (2-hydroxy benzoic acid) est un composé phénolique possédant un rôle crucial dans la régulation des processus physiologiques et biochimiques de germination des graines, de floraison et de sénescence (Rivas-San Vicente et Plasencia, 2011). L'acide salicylique est connu pour son implication dans les événements biochimiques et moléculaires associés à l'induction des résistances à certaines maladies qui suivent la PTI (*PAMP Triggered Immunity*) ou l'ETI (*Effector Triggered Immunity*). L'accumulation de l'AS est souvent observée au niveau du site d'infection ainsi que dans les tissus distants. L'accumulation locale de l'AS est souvent associée

à l'apparition d'une HR en présence d'interactions incompatibles entre les plantes et les agents pathogènes.

L'AS est synthétisé à partir de l'acide benzoïque dans les minutes qui suivent la reconnaissance du parasite, par l'intermédiaire de l'enzyme BA2H (Benzoïc Acide 2 Hydroxylase). La biosynthèse de l'AS peut avoir lieu selon deux voies : la voie de l'isochorismate et la voie des phénylpropanoïdes (Vidhyasekaran, 2015) et toutes les deux ont pour origine la chorismate (Figure 4).

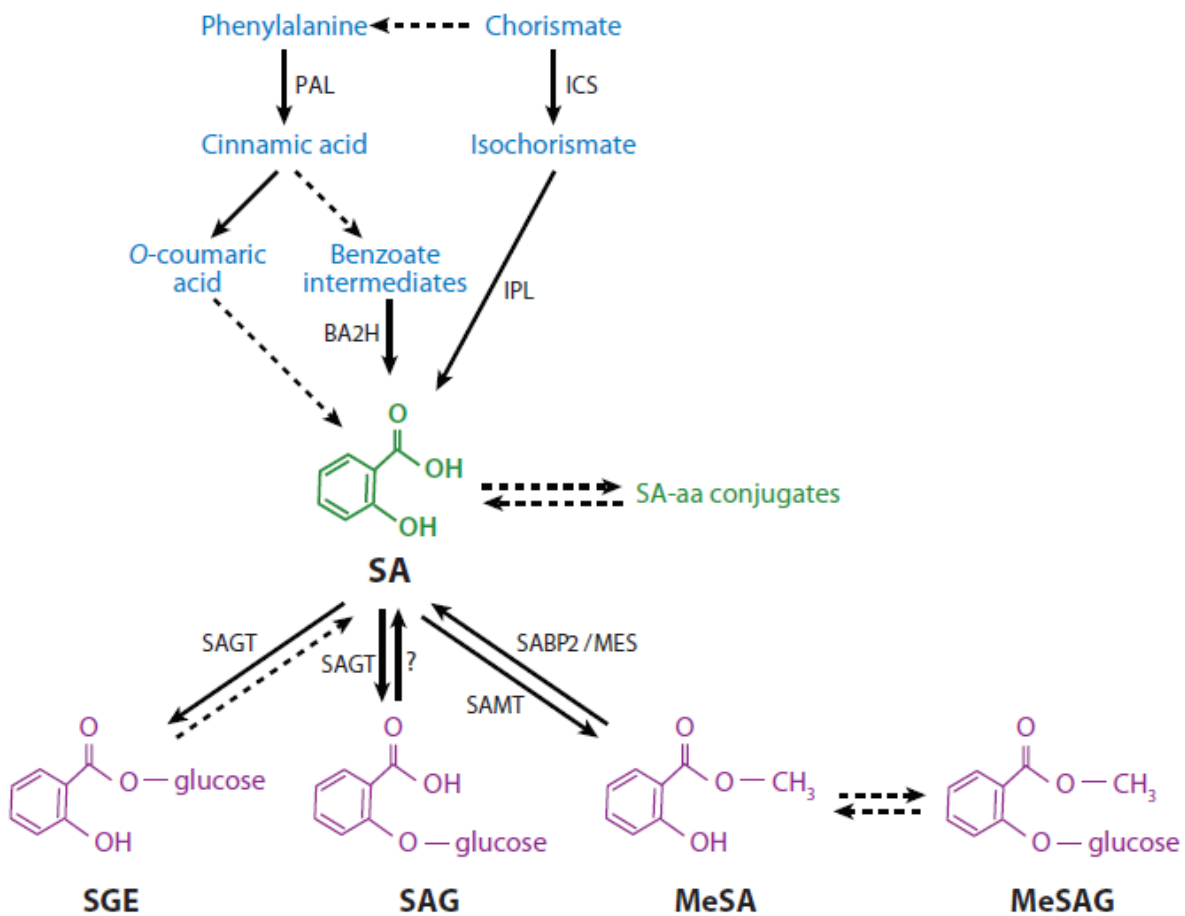


Figure 5. Schématisation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique (SA) et ses métabolites (Vlot et *al.*, 2009). Abréviations: Phénylalanine ammonia lyase (PAL); Isochorismate synthase (ICS); Isochorismate pyruvate lyase (IPL); Acide benzoïque-2-hydroxylase (BA2H); SA glucosyltransferase (SAGT); acide aminé (aa); SA méthyltransferase (SAMT); SA-binding protein 2 (SABP2); méthyl esterase (MES); ester de glucose de salicyloyl (SGE); SA O-β-glucoside (SAG); méthyl salicylate (MeSA); méthyl salicylate O-β-glucoside (MeSAG).

Dans la voie des phénylpropanoïdes, la biosynthèse de l'AS débute par la conversion de la phénylalanine en acide trans-cinnamique via l'activité de la PAL (Phénylalanine Ammonia Lyase) (Vlot et *al.*, 2009). L'AS joue le rôle d'un signal endogène qui bloque l'activité CAT,

entraînant l'augmentation des niveaux de H_2O_2 qui active l'expression des gènes de défenses comme *PR1*. Ainsi, l'AS permet la mise en place d'une réponse de défense locale et systémique contre les agents pathogènes et active également la résistance systémique acquise (Vlot et *al.*, 2009). La voie de signalisation de l'AS interagit avec d'autres voies hormonales telles que celle de l'acide jasmonique et celle de l'éthylène lors des réactions de défense de la plante aux pathogènes.

3.3.1.3.2 L'Acide Jasmonique (AJ)

L'AJ ainsi que ses dérivés sont impliqués dans la transduction du signal au niveau inter et intra cellulaire et peuvent être véhiculés par le phloème (Creelman et Mullet, 1997 ; Pieterse et Van Loon, 1999). La biosynthèse de l'AJ à partir de l'acide linoléique dépend de la voie des octadécanoïdes. La synthèse de l'AJ commence par l'insertion d'un atome d'oxygène sur l'acide α -linoléique par une lipoxygénase (LOX). La lipoxygénase (LOX) présente l'enzyme clé de la voie des octadécanoïdes ; elle est impliquée dans l'interaction plante-agent pathogène.

Pour le pathosystème blé-*Z.tritici*, Ray et *al.*, (2003) ont montré que la transcription du gène LOX est induite chez les cultivars sensibles et résistants avec des niveaux de transcription plus importants chez les cultivars sensibles. Selon cette étude, la LOX peut faciliter la colonisation et l'installation du champignon. Par ailleurs, les auteurs ont suggéré que l'inhibition rapide de l'activité LOX chez les cultivars résistants pourrait jouer un rôle dans le retard de la colonisation et constitue donc une caractéristique des cultivars résistant à *Z. tritici*.

L'allène oxyde synthase (AOS) est une autre enzyme clé dans la voie de biosynthèse de l'AJ. Elle synthétise une allène oxydée à partir du 13-hydroperoxylinolenate synthétisée à la base par le 13-LOX (Creelman et Mullet, 1997). La mutation du gène codant pour l'AOS chez *Arabidopsis thaliana* inhibe complètement la synthèse de l'AJ en réponse aux blessures (Park et *al.*, 2002).

3.3.2 Les événements tardifs de défense

L'activation des voies de défenses entraîne l'accumulation de métabolites secondaires, de protéines PR ainsi que de composés antimicrobiens et antifongiques.

3.3.2.1 Les phénylpropanoïdes

Les composés phénoliques ou les phénylpropanoïdes issus du métabolisme secondaire tels que les phytoalexines, les flavonoïdes et l'AS, régulent les réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques. La voie de biosynthèse de ces composés est initiée par la PAL. La PAL

présente l'une des enzymes clés de la biosynthèse des composés phénoliques. Elle catalyse la réaction de désamination de la L-phénylalanine en acide trans-cinnamique, un précurseur de la majorité des composés phénoliques produits par les plantes en libérant un NH₃. Cette première étape constitue une voie commune de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Les recherches effectuées par Adhikari et *al.*, (2007) sur le pathosystème blé tendre-*Z. tritici* ont montré que le gène codant pour la PAL a été transcrit entre 3 et 6 h après infection uniquement chez les variétés de blé résistantes, alors que les travaux de Shetty et *al.*, (2009) ont montré qu'aucune induction du gène codant pour la PAL n'a été détectée chez les cultivars sensibles et résistants.

3.3.2.2 *Les protéines PR (Pathogenesis Related Proteins)*

Ces protéines sont induites chez la plante lors d'une interaction avec l'agent pathogène ou suite à une blessure mécanique. L'induction de l'expression des gènes *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5* et *PR9* lors de l'interaction blé-*Z. tritici* diffère entre les interactions compatibles et incompatibles (Ray et *al.*, 2003; Adhikari et *al.*, 2007; Shetty et *al.*, 2009). Les glucanases (*PR2*) et les chitinases (*PR3*) sont des enzymes utilisées par la plante pour dégrader les parois fongiques, libérant ainsi les monomères de chitine et de glucane pouvant à leur tour agir comme des PAMP et déclencher de nouvelles réactions de défense (PTI).

Il a été démontré que lors de l'interaction blé-*Z. tritici*, les gènes de défense codant pour les protéines *PR1*, *PR2* et *PR5* sont fortement transcrits 12 heures après inoculation de façon plus intense chez le cultivar résistant que chez le cultivar sensible (Ray et *al.*, 2003). Selon Adhikari et *al.*, (2007), le niveau d'expression du gène *PR1* pourrait distinguer les cultivars résistants selon son expression 12 heures après inoculation. Goodwin et *al.*, (2007) ont montré quant à eux qu'aucune différence des niveaux d'expression de ce gène apparaît tardivement, à 6 jours post inoculation.

Chapitre II.

Méthodes de lutte contre *Zymoseptoria tritici*

La lutte contre *Z. tritici* repose essentiellement sur l'utilisation massive des fongicides (Torriani et *al.*, 2015) mais aussi des cultivars de blé résistants, ou plutôt tolérants puisqu'il n'existe pas de variété de blé complètement résistante à ce pathogène. La forte adaptabilité du champignon assurée entre autres par son double mode de reproduction et les brassages génétiques qui ont lieu lors de la reproduction sexuée remettent en cause la durabilité de la résistance spécifique conférée par les gènes *Stb* cités dans le Tableau 2. La résistance non spécifique contrôlée par plusieurs gènes (multigénique) semble être plus durable puisqu'elle est moins facilement contournée par *Z. tritici*.

1 La lutte chimique contre *Z. tritici*

Depuis la fin des années 1960 et jusqu'au début des années 2000, des fongicides tels que les inhibiteurs des quinones extérieures (*QoI*), les antimétabolites, les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (*IBS*) et les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (*SDHI*), ont vu le jour. Ces fongicides qui présentent la particularité d'être systémiques et dotés d'une faible écotoxicité étaient appliqués de façon préventive et curative à des faibles doses sans risque d'être lessivés. Toutefois, leurs efficacités au champ sont régulièrement atténuées puisque *Z. tritici* dispose d'un fort potentiel adaptatif. Des résistances aux fongicides *QoI* chez des populations de *Z. tritici* ont été rapportées au Royaume Uni et en Irlande en 2002, environ 5 ans après leur introduction comme moyen de lutte (McCartney et *al.*, 2007). La résistance à ces fongicides est associée à une mutation ponctuelle (G143A) au niveau du gène codant pour le cytochrome b. Le changement d'une base nucléotidique entraîne une substitution de la glycine en position 143. Aujourd'hui, les populations françaises de *Z. tritici*, en particulier celles de la partie nord de la France, sont totalement résistantes à ces fongicides (Cheval et *al.* 2017).

On retrouve également les inhibiteurs multi-sites de contact qui semblent être les plus adaptés puisqu'aucune résistance du champignon n'a été détectée vis-à-vis de ces fongicides (Leroux et *al.*, 2007). Néanmoins, les doses élevées utilisées rendent l'application de ces fongicides onéreuse en plus du fait qu'ils soient lessivables par les pluies et qu'ils peuvent donc s'infiltrer dans les nappes d'eau et présenter un problème environnemental (Leroux et *al.*, 2006).

A l'heure actuelle et en raison des résistances au sein des populations de *Z. tritici*, le contrôle de cet agent pathogène repose sur les fongicides inhibiteurs de la déméthylation (*DMI*) de la classe des *IBS*, ainsi que des *SDHI*. Selon Drummond et *al.* (2015) et Torriani et *al.* (2015), les mélanges de fongicides *SDHI* et *DMI* sont considérés comme les plus efficaces contre *Z. tritici*.

Les préoccupations croissantes concernant les effets potentiels des pesticides sur la santé humaine et l'environnement ont amené plusieurs pays à revoir leurs politiques quant à l'utilisation de ces produits. L'Union Européenne exige aux états membres une réduction drastique de l'utilisation des pesticides dans un proche avenir (Walters et *al.*, 2013) afin de limiter leurs risques potentiels. Les politiques actuelles encouragent donc vers une lutte intégrée combinant divers facteurs alternatifs aux produits conventionnels (Hillocks, 2012). L'interdiction ou l'indisponibilité de certains pesticides programmée dans le futur a créé une forte demande pour d'autres moyens de lutte alternatifs comme le biocontrôle, qui constitue aujourd'hui un moteur pour la recherche et l'innovation (Bruce, 2012; Stenberg et *al.*, 2015).

2 Le biocontrôle

Le biocontrôle peut être défini comme toute méthode, produit ou organisme utilisant des mécanismes naturels dans le contexte de la protection intégrée des cultures contre les bio-agresseurs (Herth, 2011). Plusieurs laboratoires ciblent leurs recherches vers l'identification et le développement d'agents de lutte biologique qui stimulent les défenses naturelles des plantes contre un large spectre de maladies ou qui peuvent agir comme des fongicides biologiques ou biofongicides efficaces contre les agresseurs des différentes cultures.

2.1 Les stimulateurs des défenses des plantes : généralités

Un stimulateur de défense des plantes (SDP) désigné aussi par les termes éliciteur, activateur, inducteur ou encore stimulateur de défense naturelles (SDN) est par définition toute molécule pouvant mimer l'attaque d'un pathogène et induire chez la plante des métabolites capables d'assurer sa défense face à une agression biotique causée par un agent pathogène (champignon phytopathogène, insecte phytophage, bactérie ou virus) ou face à un stress abiotique (Benhamou et Rey, 2012).

Depuis que le terme éliciteur a été inventé par Keen et *al.*, en 1972, plusieurs recherches ont montré que différentes substances dotées de structures chimiques distinctes ont la capacité d'activer les réponses de défense de la plante. Dans le modèle général, les SDP se divisent en deux catégories selon leur origine, à savoir des signaux endogènes et des signaux exogènes (Ebel et Cosio, 1994).

Les éliciteurs endogènes ou DAMPs (*damage associated molecular pattern*) sont libérés par la plante elle-même indépendamment de la présence d'un éliciteur exogène ou d'une façon synergique. La plupart de ces éliciteurs semble être apoplastique (secrétés à l'extérieur de la

cellule) et leur fonction pourrait être celle de moduler l'étendue de la réponse dans les tissus environnants. Les DAMPs connus diffèrent par leur mobilité dans les tissus de la plante et dépendent du type de ces tissus. Ils peuvent donc produire des réponses systémiques ou localisées. Parmi les DAMPs les plus caractérisés, on peut citer les oligogalacturonides, qui sont des dérivés des composés pectiques des parois cellulaires. Ils sont libérés dès la lésion cellulaire due à un traumatisme, à une réponse d'hypersensibilité ou à l'action des pectinases provenant des pathogènes (Henry et *al.*, 2012).

Les éliciteurs exogènes constituent les signaux primaires dans les interactions plante-agresseur. On retrouve les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) émis par les organismes pathogènes ou parasites et les MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) libérés généralement par des micro-organismes non pathogènes comme les levures et les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (Henry et *al.*, 2012). Ces éliciteurs stimulent les défenses de la plante qui répond en limitant la mobilité du pathogène, du virus ou de la bactérie dans ses tissus ; ils évoquent également une réponse dans les cellules avoisinant le site de l'infection.

Les MAMPs/PAMP et les DAMP sont appelés éliciteurs généraux. Ils sont reconnus par les récepteurs transmembranaires PRR (*pathogenesis related receptors*) comme des marqueurs d'attaque potentiels, induisant ainsi des réactions immunitaires de type PTI (*PAMP-triggered immunity*).

L'immunité des plantes peut se produire à deux niveaux différents. On retrouve (i) la résistance locale acquise (LAR) qui s'exprime au niveau des cellules, tissus, ou organes ayant été attaqués par un agent pathogène ou traités par un éliciteur et (ii) la résistance systémique acquise (SAR) qui s'exprime souvent dans toute la plante et donc pas uniquement au niveau des organes traités. La SAR a été caractérisée comme plus large et plus durable que la LAR (Görlach et *al.*, 1996).

La SAR dépend de la perception de l'acide salicylique et elle induit l'expression des gènes codant pour les PR protéines (Walters et Fountaine, 2009). En plus de la SAR, l'expression de résistance induite peut également se manifester par le déclenchement de la résistance systémique induite (ISR) déclenchée au niveau racinaire par des microorganismes bénéfiques présents dans la rhizosphère. La résistance systémique induite entraîne aussi une résistance générale et durable, contrairement à la SAR. L'ISR dépend de l'acide jasmonique au lieu de l'acide salicylique et ne se traduit souvent pas par la synthèse des protéines PR (Pieterse et *al.*, 1998).

Comme les éliciteurs peuvent mimer l'attaque d'un agent pathogène, il est important de rappeler d'abord les mécanismes impliqués dans toute interaction plante-agent pathogène (le modèle général).

2.1.1 Mécanismes de résistance lors de l'interaction plante - agent pathogène

Lors des interactions hôte-agent pathogène, plusieurs barrières physico-chimiques sont mises en place et constituent la première contrainte que l'agresseur doit surmonter. Ces barrières sont représentées par des structures externes telle que les cires, cuticules, trichomes et parois pecto-cellulosiques de l'épiderme. Bien que ces structures ont le rôle d'empêcher l'adhésion et le développement des agents pathogènes, elles sont souvent contournées par l'agresseur et dans certains cas leur présence peut même favoriser son développement (Łażniewska et *al.*, 2012). A titre d'exemple, *Z. tritici* parvient souvent à contourner ces barrières physiques grâce au mucilage qui entoure ses spores. Le champignon réussit donc à pénétrer la plante non seulement par les stomates mais aussi de façon directe *via* les parois cellulaires de l'épiderme (Shetty et *al.*, 2003 ; Siah et *al.*, 2010b ; Ors et *al.*, 2018).

La réponse de la plante est souvent rapide, bien que cela peut varier en fonction des variétés et de leurs degrés de résistance. Cette réponse entraîne l'apparition d'un flux transmembranaire d'ions, une production de formes actives d'oxygène et une cascade de phosphorylation de protéines. Plus tard, le taux de l'éthylène (ET) biosynthétisé par la plante augmente et les gènes impliqués dans les voies de défense sont transcrits (Li et *al.*, 2013).

Afin de surmonter cette PTI qui stoppe la pénétration du parasite et la colonisation de la plante, le bioagresseur produit et secrète des effecteurs qui lui permettent de poursuivre sa colonisation et d'affaiblir à nouveau la plante. On parle alors de sensibilité déclenchée par des effecteurs ou ETS (*effector triggered susceptibility*) (Li et *al.*, 2013).

Lors de l'attaque par un agent pathogène, la plante peut répondre aux ETS par une deuxième vague de défense décrite comme l'immunité déclenchée par les effecteurs ou ETI (*effector triggered immunity*), qui confine la colonisation des tissus au site initial de l'infection. Les phases successives de la coévolution de l'interaction plante-micro-organisme sont donc la PTI, l'ETS, l'ETI et l'alternance entre ETS et ETI qui résulte en un contournement par le bioagresseur des gènes de résistance spécifique de la plante hôte. L'ETI caractérise les interactions de type « incompatible », il s'agit donc d'une réponse plus forte, plus rapide et plus localisée comparée à la PTI. L'ETI aboutit le plus souvent à une mort cellulaire programmée

ou PCD (*programmed cell death*) localisée au niveau de l'infection. La Figure 5 illustre l'interaction plante-pathogène selon le modèle en « zigzag » décrit par Jones et Dangl (2006).

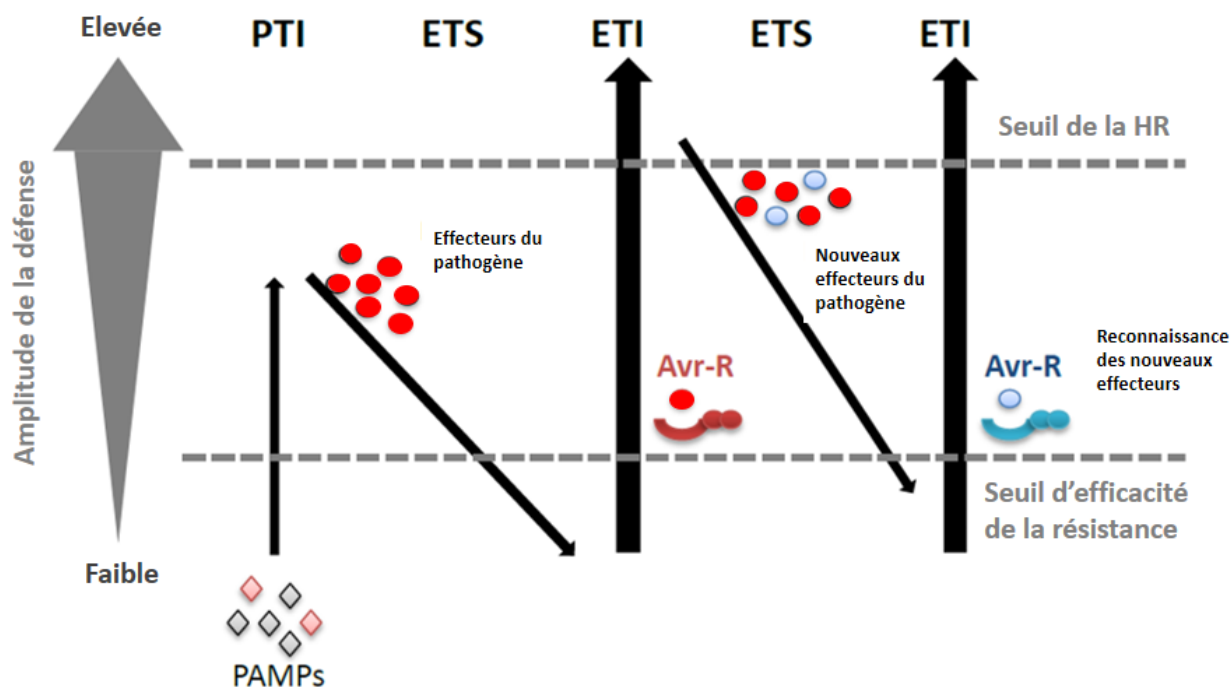


Figure 6. Modèle en « zigzag » proposé par Jones et Dangl, (2006) illustrant l'interaction plante-pathogène.

2.1.2 Les éliciteurs sur blé

Dans le cas de l'interaction blé-*Z. tritici*, l'induction de réponse précoce (PTI) par la reconnaissance de la chitine et des glucanes de *Z. tritici* a été mise en évidence. Ce phénomène est surmonté par la mise en place d'effecteurs codés par les gènes *Mg1LysM* et *Mg3LysM* chez *Z. tritici*, lui permettant d'échapper aux mécanismes de défense de la plante durant la phase biotrophe et de provoquer l'entrée en nécrotrophie.

Les éliciteurs sont regroupés en éliciteurs biotiques et abiotiques et peuvent être des micro-organismes vivants, des extraits de plantes (spermatophytes ou algues), des extraits de parois cellulaires microbiennes (chitosan, lipopolysaccharides, flagellines, lipopeptidoglycanes, exopolysaccharides), des métabolites microbiens (Rhamnolipides, lipopeptides, harpines, ergostérols, protéines microbiennes purifiées), ou d'autres molécules organiques (β -aminobutyric acid (BABA), vitamines, sucres, acides aminés, biochar) ainsi que

des minéraux et des ions (cuivre, bore, silicone, phosphites, composés à base de calcium) (Siah et *al.*, 2018b).

Dans le cas du blé, plusieurs produits ou molécules à effet éliciteur ont été testés sur un large spectre de maladies. Cependant, peu d'entre eux se sont montrés efficaces pour protéger préventivement la plante contre la septoriose et encore moins ont été homologués. Les éliciteurs testés déjà sur blé sont répartis en fonction de leur origine en deux catégories, à savoir les éliciteurs abiotiques et les éliciteurs biotiques :

Les éliciteurs abiotiques, comme le chlorure de potassium qui a été appliqué comme traitement foliaire sur blé, a induit les mécanismes osmotiques impliqués dans le contrôle de l'oïdium (Kettlewell et *al.*, 2000). Par ailleurs, KHCO_3 et NaHCO_3 se sont avérés capables de protéger le blé contre la rouille (Deliopoulos et *al.*, 2010) alors que la silice a permis l'induction de la production de composés antifongiques chez le blé infecté par l'oïdium (Rémus-Borel et *al.*, 2005) et l'a protégé également contre *P. nodorum* (Deliopoulos et *al.*, 2010). De même, l'effet de l'acide salicylique ainsi que l'heptanoate d'acide salicylique a été testé sur le pathosystème blé-oïdium par Renard-Merlier et *al.* (2007) ainsi que par Tayeh et *al.* (2013). Les résultats ont montré que l'heptanoate d'acide salicylique induit l'accumulation de H_2O_2 et la peroxydation des lipides. En outre, Zhuk et *al.*, (2014) ont montré que l'application exogène de l'acide oxalique permet d'augmenter la tolérance du blé à la septoriose dans des essais au champ.

Parmi les produits rares enregistrés comme éliciteurs sur blé, on retrouve le Bion[®] (Syngenta), ayant l'Acibenzolar-S-methyl (ASM) ou le BTH comme matière active. Le Bion[®] qui présente le premier SDP homologué et commercialisé en Europe montre des analogies fonctionnelles avec l'acide salicylique. Le produit est capable d'induire la SAR chez un grand nombre de plantes et s'est montré efficace contre un large spectre de bioagresseurs du blé comme l'oïdium, la rouille et la septoriose (Görlach et *al.*, 1996). Cependant, Walters et Heil, (2007) ont montré que le Bion[®] était aussi responsable de la diminution de la croissance de la plante et par conséquent sur son rendement, probablement en détournant beaucoup d'énergie vers l'induction des mécanismes de défenses au détriment du développement de la plante.

Les éliciteurs biotiques testés sur le blé sont encore moins nombreux et le seul qui est enregistré à ce jour pour lutter contre l'oïdium et la septoriose est le Vacciplant[®] (auparavant Iodus40[®], Goëmar, Arista LifeScience, France). La matière active de ce produit est la laminarine, qui est un β -1,3-glucane linéaire et soluble dans l'eau extrait de l'algue brune *Laminaria digitata* (Walters, et *al.*, 2014). Il a été montré que ce polysaccharide de stockage

stimule la réponse immunitaire de nombreuses plantes telles que la vigne, le tabac et le maïs contre une large gamme de maladies (Aziz et al., 2003, Klarzynski et al., 2000, Sobhy et al., 2012). Selon Ménard et al., (2004), la laminarine induit la synthèse des protéines PR et l'accumulation de phytoalexines en activant la voie de l'acide salicylique. Par ailleurs, Shetty et al. (2009) ont montré que le traitement de feuilles de blé avec des β -1,3-glucanes purifiés à partir de la paroi cellulaire de *Z. tritici* a conféré la résistance de la plante à *Z. tritici*. En outre, selon Cordo et al., (2007), *Trichoderma spp.*, stimule également les défenses du blé contre *Z. tritici*. L'efficacité du tréhalose (un disaccharide) contre l'oïdium du blé ainsi que son effet stimulateur de défense a été aussi confirmé par Tayeh et al. (2012). Dans leur étude, les auteurs ont montré que les gènes codant pour les chitinases, l'OXO et la LOX ont été induits et que le métabolisme des lipides a été activé. Le Milsana[®] a également été testé sur blé et a conféré des protections significatives contre l'oïdium (Randoux et al., 2006).

Il est à noter que le nombre des SDP commercialisés et homologués pour lutter contre la septoriose du blé reste très limité malgré l'incidence majeure de cette maladie.

2.2 Les biofongicides

Les biofongicides constituent, en plus des éliciteurs, une source alternative de contrôle des maladies des plantes. Il s'agit de formulation organiques qui peuvent dériver de plantes, animaux, microorganismes ou minéraux. Les biofongicides issus d'organismes vivants (champignons et bactéries) peuvent contrôler l'activité des champignons et bactéries pathogènes et agissent selon quatre différents modes d'action: (i) en produisant des antibiotiques ou des toxines, (ii) en parasitant les champignons pathogènes ou (iii) en rivalisant avec eux (compétition sur les nutriments) et (iv) pour certains d'entre eux en induisant les résistances localisées ou systémiques chez les plantes (Heydari et Pessarakli, 2010). Les extraits de certaines plantes (huiles essentielles, sirops, etc.), ou certains minéraux (cuivre, silice, etc.) peuvent également constituer des biofongicides intéressants. Les biofongicides présentent généralement une faible toxicité par rapport aux fongicides de synthèse sur les organismes non cibles. Ils sont également caractérisés par une décomposition rapide, induisant ainsi moins d'impacts négatifs sur l'environnement (United States Environmental Protection Agency, 2007; Couture, 2016).

Il y a relativement peu d'études publiées sur l'utilisation des micro-organismes ou leurs métabolites comme agents de biocontrôle contre *Z. tritici*. Celles publiées incluent l'utilisation de *Pseudomonas* (Levy et al. 1988, 1989, 1992; Flaishman et al. 1996), *Paecilomyces lilacinus*,

Nigrospora sphaeric, *Cryptococcus* sp., *Bacillus* sp. (Perello et al. 2002; Kildea et al. 2008 ; Mejri et al., 2017), *Trichoderma* spp., ainsi que les bactéries lactiques (Lynch et al., 2016). Certains résultats obtenus confirment le potentiel de ces produits comme moyens de biocontrôle dans la lutte contre *Z. tritici*, bien qu'aucune étude n'a abouti au développement d'un produit commercialisé en tant que produit de protection des plantes. Ceci pourrait être dû entre autres au fait que l'approbation et l'enregistrement des biopesticides dans l'UE sont confrontés à plusieurs contraintes due à l'application des mêmes critères d'homologation utilisés pour les pesticides conventionnels (Chandler et al., 2011), bien que de nouvelles directives facilitant leur enregistrement ont été développées (Czaja et al., 2015). A l'heure actuelle, plusieurs biofongicides sont commercialisés comme des biostimulants. Il est également à rappeler que les biofongicides ne sont pas tous autorisés dans l'agriculture biologique.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, trois lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* et ayant déjà été reportés comme biofongicides ou éliciteur ont été testés pour la première fois sur le pathosystème blé-*Z. tritici*.

2.2.1 Exemple d'agent de biocontrôle : *Bacillus subtilis*

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* produisent de nombreuses molécules antibiotiques et antifongiques dont certaines sont synthétisées par voie ribosomale (subtiline, subtilosine A, TasA, sublancine) alors que d'autres telles que la bacylisine, la chlorotetaine, la mycobaciline, les rhizocticines, la bacillaene, la difficidine, ainsi que les lipopeptides appartenant aux familles des surfactines, iturines et fengycines sont produites par synthèse peptidique non ribosomale (Mnif, 2015).

La rhizobactérie *B. subtilis* appartient à l'embranchement des firmicutes, à la famille des *Bacillaceae* et au genre *Bacillus* (Chtioui, 2011), est l'une des bactéries Gram+ les plus étudiées (Sonenshein et al, 2002). *Bacillus subtilis* dédie environ 5% de son génome à la synthèse d'antibiotiques et produit plus d'une vingtaine de composés antimicrobiens aux structures différentes (Ongena et Jacques 2008). La biosynthèse de molécules lipopeptidiques est l'un des mécanismes d'action majeurs de *B. subtilis* lui permettant la colonisation du milieu. Cette bactérie est actuellement utilisée comme agent de biocontrôle et les lipopeptides qu'elle produit font partie des plus connus (Jacques et al., 2014).

Les lipopeptides issus de *Bacillus* sp. ont été isolés durant les années 1949 et 1986 ; ils rassemblent plus de 30 peptides différents liés à des chaînes variées d'acides gras. A ce jour, on compte plus de 100 produits différents. La structure générale des lipopeptides est un cycle

peptidique de 7 à 10 acides α aminés L et D (Chtioui, 2011). La synthèse non ribosomale conduit à une hétérogénéité importante, non seulement au niveau du type et de la séquence en acides aminés (AA), mais aussi au niveau de la nature du cycle peptidique et la nature, longueur et ramification de la chaîne d'acides gras (Mnif, 2015 ; Ongena et Jacques 2008). Les lipopeptides du genre *Bacillus* sont classés selon leur séquence en acides aminés en 3 familles distinctes : les surfactines, les iturines et les fengycines (ou plipastatines). Cependant, suite à la découverte des kurstakines en 2000, il a été suggéré qu'elles soient également ajoutées en tant que famille de lipopeptides (Jacques, 2011).

2.2.1.1 Les surfactines

La surfactine tire son nom de son efficacité prouvée en tant que biosurfactant. Les AA L-Glu et L-Asp renforcent son caractère amphiphile (Coutte, 2009). Elle est capable de réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 27 mN.m⁻¹ à une concentration aussi faible que 0,01% et s'organise en micelles à une concentration supérieure à la CMC (concentration micellaire critique) de 10 mg/L. De potentielles activités antibactériennes, antivirales, anti tumorales, anticoagulantes, hémolytiques, inhibitrices d'enzymes ainsi qu'inductrices du mécanisme de résistance des plantes ont été démontrées pour la surfactine. Cependant, aucune activité antifongique directe ne lui a été attribuée, bien que des effets synergiques existeraient (Chtioui, 2011). Le mode d'action principal de la surfactine serait la perturbation des membranes ; elle semble également être un élément clé à la création de biofilms stables et pourrait inhiber les biofilms formés par d'autres bactéries (Romero et al, 2006).

2.2.1.2 Les iturines

La famille des iturines regroupe principalement les bacylomycines D, F, L et Lc, les iturines A et C et la mycosubtiline. Cette dernière fut le premier lipopeptide antifongique de *B. subtilis* mentionné dans la littérature par Walton and Woodruff en 1949. Un second composé similaire baptisé Iturine fut décrit plus tard par Delcambe (1950). Les iturines sont des heptapeptides cycliques également, reliés par une liaison amide à une chaîne d'acide gras β -aminée composé de 14 à 17 carbones. Contrairement aux autres lipopeptides, les iturines sont neutres ; ce sont également des biosurfactants. Bien que moins puissants que les surfactines, ils peuvent réduire la tension de surface à 43mN.m⁻¹ et former des micelles à la CMC (20 mg/L) (Jacques, 2011). Les iturines sont reconnues pour leur forte activité antifongique à l'encontre d'un large spectre de levures et de champignons. Cependant, leur activité antibactérienne et antivirale sont limitées, voire inexistantes. Cette toxicité à l'égard des champignons semble reposer sur leur

capacité de perméabilisation de la membrane, grâce à une perturbation de la pression osmotique conduisant à la formation de pores conducteurs d'ions (Ongena et Jacques, 2008).

2.2.1.3 *Les fengycines*

Les fengycines sont des décapeptides partiellement cycliques reliés à une chaîne d'acides gras β -hydroxylée de 14 à 18 carbones (Chtioui, 2011). Les fengycines ont une activité hémolytique moins importante que les iturines et surfactines mais gardent une forte toxicité fongique, particulièrement envers les champignons filamenteux. Leur mode d'action est moins bien connu que ceux des autres familles de lipopeptides. On sait cependant qu'ils interagissent avec les couches lipidiques et peuvent altérer la structure des membranes cellulaires (Ongena et Jacques, 2008). La revue de Ongena et Jacques (2008) a récapitulé les propriétés des lipopeptides mises en relation avec l'activité de biocontrôle des bactéries du genre *Bacillus* (Figure 7). Ces propriétés sont de trois natures :

- Favoriser la croissance invasive de la bactérie, donc potentiellement sa capacité à coloniser les feuilles et les racines, améliorant ainsi sa compétitivité (essentiellement la surfactine).
- Inhiber la croissance et/ou la germination des spores d'un grand nombre de champignons pathogènes (essentiellement fengycine et iturine).
- Stimuler les défenses naturelles des plantes (notamment surfactine et fengycine).

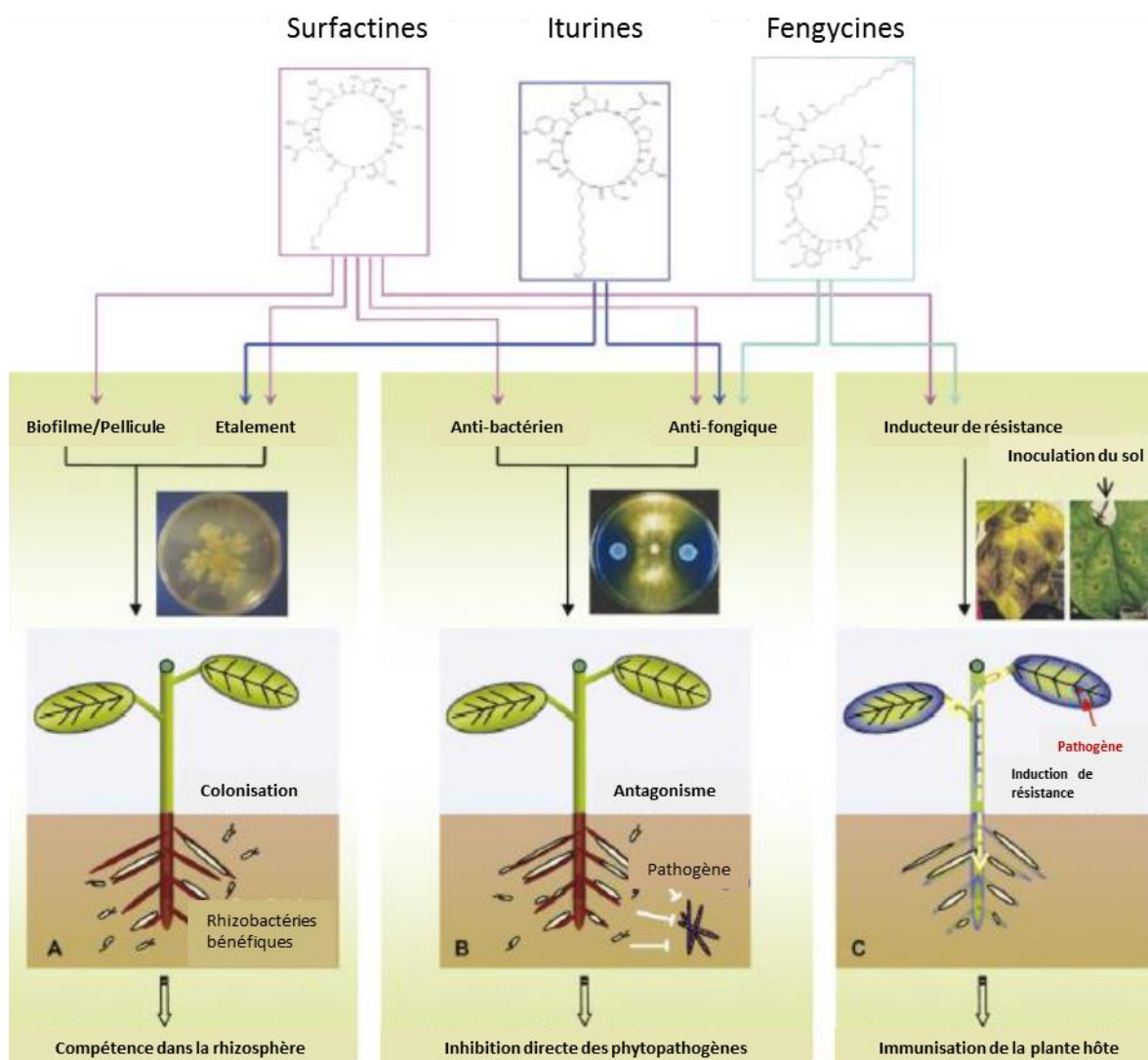


Figure 7. Structures et propriétés des trois principales familles des lipopeptides cycliques d'origine microbienne (Ongena et Jacques, 2008).

2.3 Produits à double activité

Certains produits de biocontrôle possèdent des propriétés à la fois élicitrices et directes. Le chitosan en est un exemple et sa double activité a été démontrée sur plusieurs plantes et plusieurs pathogènes (El Hadrami et *al.*, 2010). De même, des extraits de feuilles caduques ont montré leur effet comme antibactérien et stimulateur des défenses du tabac (Richard et *al.* 2014). Le Biochar constitue également un produit ayant un large spectre d'activité, combinant des effets éliciteurs, biostimulateurs, détoxifiant du sol ainsi que des effets directs sur les organismes phytopathogènes (Elad et *al.*, 2012). L'agent de biocontrôle *Trichoderma spp.* possède également une double activité, directe sur les champignons phytopathogènes et indirecte en stimulant les réponses de défense des plantes (Viterbo et *al.* 2002).

Bien que les produits de biocontrôle sont variés (nous nous sommes limité seulement à quelques exemples dans ce manuscrit), la réticence du marché face à eux peut être expliquée entre autre par le coût de leur production souvent trop élevé pour être compatible avec des applications à grande échelle (Benhamou et Rey, 2012). En effet, la disponibilité de sources premières, requises pour la production en quantité, présente l'une des limitations majeures au développement de nouveaux éliciteurs ou biofongicides. Cependant, les industries agricole et agro-alimentaire regorgent de matières premières souvent riches en composés intéressants et qui sont souvent produits à grande échelle. Ces produits peuvent être des bio-sources pour la conception de molécules de protection de plantes tout en respectant l'environnement.

2.4 Les biomasses : sources de produits de biocontrôle

L'article 19 de la loi n°2009-967 de programmation relative à la mise en œuvre du Grenelle de l'environnement, du 3 août 2009, définit la biomasse comme étant « La fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales, issues de la terre et de la mer, de la sylviculture et des industries connexes ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers ». Les biomasses ont aujourd'hui un enjeu majeur qui est celui d'assurer l'alimentation de la population mondiale. Les biomasses ont également le défi de garantir la transition énergétique, étant donné que les disponibilités en énergies fossiles sont en baisse continue. Enfin, les biomasses naturellement riches en divers composants à extraire et à purifier peuvent être valorisables comme ressources directes de matières premières dans différents types de réactions chimiques (Syndicat des énergies renouvelables, 2012). Il s'agit donc un réservoir à exploiter.

Dans l'industrie agro-alimentaire, une transformation d'une biomasse brute (matière première) pour l'obtention d'un produit fini, recherché par le consommateur, est réalisée. L'acquisition de ce produit final (huile, vin, sucre, meuble, etc.), est souvent accompagnée par une production de matières secondaires telles que les coproduits, les sous-produits et les déchets. Ces matières secondaires, bien qu'elles soient toutes issues du processus de fabrication, ont des valeurs et des utilisations différentes et méritent donc d'être définies.

Les coproduits sont obtenus de façon intentionnelle et inévitable lors du processus de fabrication du produit fini visé. Ces coproduits possèdent souvent leur propre marché et subissent une valorisation totale. Ils présentent donc une source supplémentaire de revenus pour le producteur.

Les sous-produits sont des substances ou des objets résiduels qui apparaissent lors du processus de production et qui répondent à une ou plusieurs utilisations possibles.

Les déchets correspondent aux résidus non utilisables obtenus au cours et après la production et doivent être éliminés par le producteur. L'élimination se fait par incinération, enfouissement dans le sol, mise en décharge etc. Ils constituent donc une nuisibilité pour l'environnement (à forte dose) et un coût additionnel pour le producteur.

Les produits secondaires agricoles et industriels ont l'avantage d'être abondants, disponibles à faible coût et riches en composés organiques. Ils peuvent pour beaucoup d'entre eux être valorisables principalement en alimentation animale (animaux de rente et compagnie), en production de matériaux biosourcés (panneaux de particules), en agriculture (fertilisants), ou en production d'énergie (biocarburant).

Les sous-produits de l'industrie agro-alimentaire sont constitués d'extraits ou de molécules qui peuvent être capables de déclencher des réactions de défense des plantes. En effet, certaines études ont montré que les extraits de marc de raisin qui est un sous-produit de la vinification, étaient capable de stimuler des réactions de défense locales induites chez le tabac, l'arabette et la tomate (Benouaret et *al.*, 2013, Goupil et *al.*, 2012). Selon Goupil et *al.*, (2012) le marc de raisin qui est riche en polyphénols est capables de réguler positivement les gènes *PR1* et *PR2* de façon locale et systémique chez le tabac. L'infiltration d'extraits de marc de raisin a entraîné une surexpression locale des gènes *PR1*, *PR2* et *PR3* dans les feuilles de tabac (Benouaret et *al.*, 2013). Benouaret et *al.*, (2014) ont montré que l'ajout de ces extraits à des cultures cellulaires de tabac en suspension, entraîne une alcalinisation extracellulaire, une surexpression des gènes de défense *PR3*, *PAL* et *CCoAOMT* (Caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase) impliqués dans la synthèse des phénylpropanoïdes et de la lignine ainsi que dans l'induction de la réponse HR (Benouaret et *al.*, 2014).

Par ailleurs, Richard et *al.* (2014) ont montré que des extraits de feuilles caduques de plantes ligneuses riches en composés polyphénoliques avaient à la fois des propriétés antifongique et élicitrice des défenses des plantes. En effet, l'infiltration des extraits phénoliques de ces feuilles a induit l'accumulation de composés antimicrobiens ainsi que l'expression de plusieurs gènes de défenses tels que ceux codant pour la *PAL*, *PR1*, *PR2* et *PR3* dans les tissus de plantes de tabac. Les surfaces foliaires infectées par la maladie (mildiou) ont été réduites de 45 % en comparaison avec le témoin non traité. Le biochar fabriqué à partir de bois dur ajouté comme amendement au sol de culture d'asperge a entraîné des réductions des lésions radiculaires causées par *Fusarium oxysporum f. sp. asparagi* et *F. proliferatum* par rapport à un témoin dont

le sol n'a pas été amendé (Elmer et Pignatello, 2011). Ce composé qui est une biomasse naturelle a plusieurs fonctions, telles que la détoxification du sol, l'amélioration de la croissance des plantes et donc de leurs résistances aux pathogènes et microorganismes, la stimulation des microbes bénéfiques de la rhizosphère qui agissent sur les pathogènes *via* l'antibiose et le parasitisme ou la compétition. Le biochar est aussi capable de stimuler les défenses des plantes soit grâce à (i) ses propres compositions chimiques dont certains composés peuvent être perçus comme des éliciteurs ou (ii) par l'intermédiaire des micro-organismes sur lesquels il agit (Elad et *al.*, 2012).

2.4.1 Exemple de biomasse valorisable: coproduits de la betterave sucrière

La betterave sucrière *Beta vulgaris* assure 20% de la production mondiale en sucre. La France est le premier producteur européen avec plus de 88 tonnes de racines/ ha et environ 13 tonnes de sucre/ ha. La betterave sucrière est la première culture industrielle en France ; elle est cultivée dans 8 régions et les Hauts-de-France ainsi que le Grand Est sont les principaux producteurs. Le processus de transformation résumé dans la figure 7 engendre plusieurs coproduits qui trouvent des débouchés utiles tels que la production d'additifs alimentaires, de bio-carburant, de produits synthétiques ainsi que de produits pharmaceutiques. La mélasse constitue le sirop issu des racines de betterave sucrière après l'extraction du saccharose. Elle est composée de 30% à 50% de sucres (liés aux composés minéraux et organiques) qui ne peuvent être extraits, ainsi que de composés azotés, de vitamines et d'autres micronutriments. La mélasse constitue également un milieu favorable au développement de diverses bactéries lactiques (Tomaszewska et *al.*, 2018). Ce jus brut contient environ 30% d'acides aminés, dont 50% est constituée de glutamine et d'acide glutamique (Hippchen et *al.*, 1978). La cyclisation de la glutamine conduit à la formation d'acide pyroglutamique (PGA), également appelé acide pidolique ou « acide aminé oublié » (Harland et *al.*, 2008). Le PGA représente une matière première abordable, dépourvue de toxicité et constituée d'unités fonctionnalisables intéressantes telle que le groupes lactame, permettant la création de nouvelles molécules bio-sourcées. Le PGA est considéré comme un hydratant physiologique, et est cité dans tous les manuels de cosmétologie grâce à sa présence prédominante dans les facteurs hydratants naturels. De nombreuses protéines portant l'acide pyroglutamique à l'extrémité N-terminale, telles que les protéines PR, sont connues pour leur implication dans les réactions de défense des plantes (Schilling et *al.*, 2007). Cependant, l'information quant aux caractéristiques du résidu PGA pour ces protéines n'a pas été étudiée.

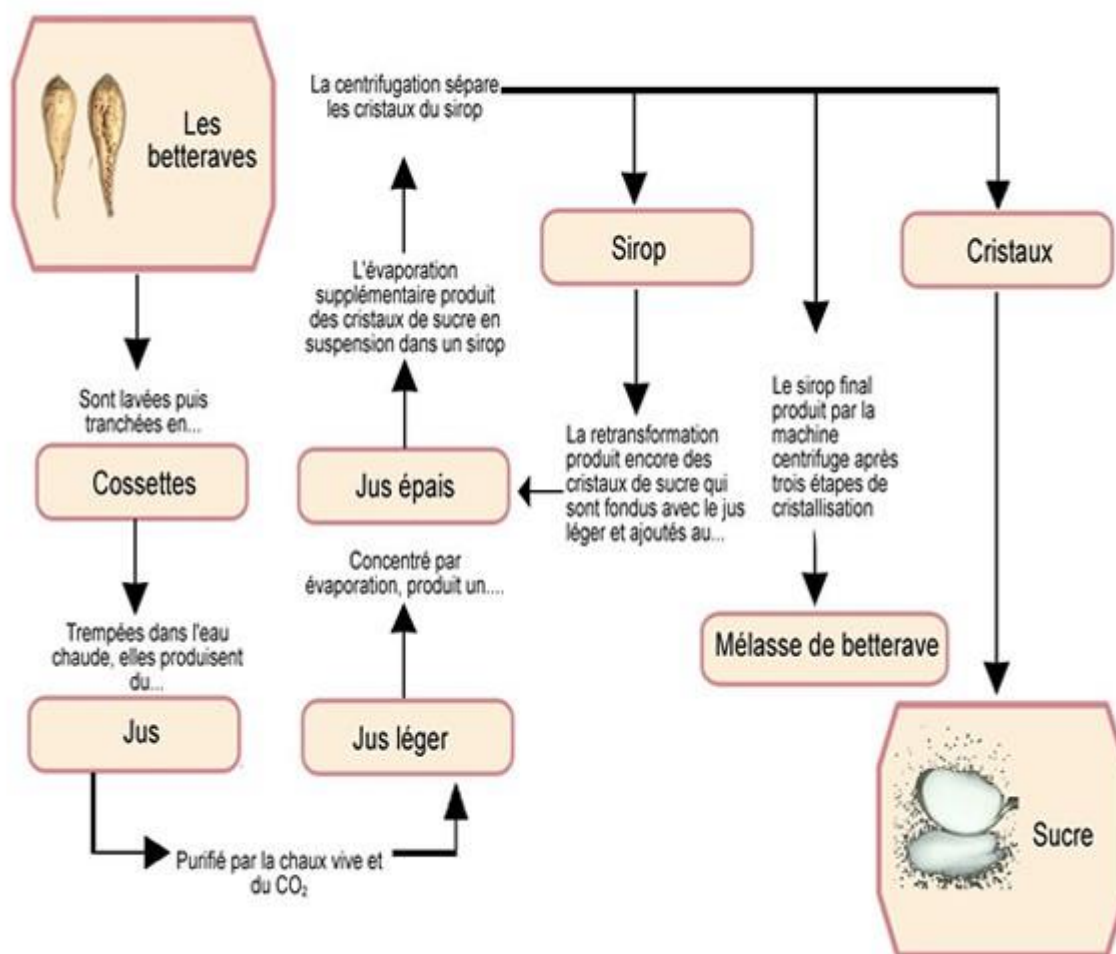


Figure 8. Processus de transformation de la betterave sucrière et différents sous-produits obtenus (Morrison, 2009).

2.4.2 La chimie verte

La chimie verte est le concept de désigner les matériaux et produits chimiques meilleurs pour l'environnement et la santé humaine et qui permettront la préservation d'une planète sur laquelle tous les produits seront utilisés d'une façon circulaire. Il s'agit donc d'une approche fondamentale pour développer des produits chimiques d'une manière saine et respectueuse de l'environnement sans avoir recours à l'utilisation d'ingrédient ou de solvants toxiques.

Douze principes de la chimie verte ont été développés par Anastas et Warner (1998) :

1. La prévention ; c'est-à-dire qu'il vaut mieux produire moins de déchets que de devoir les traiter et les nettoyer par la suite

2. L'économie des atomes, c'est-à-dire limiter la perte des atomes en sous-produits lors des réactions.
3. Des synthèses chimiques moins dangereuses pour l'environnement et l'humain
4. Designer des produits chimiques plus sains
5. Utiliser des solvants et auxiliaires sans danger
6. Conception pour l'efficacité énergétique
7. Utilisation de matière première renouvelable
8. Réduction des dérivés
9. Utiliser des catalyseurs
10. Designer des produits facilement dégradables
11. Analyse en temps réel pour éviter la pollution inutile
12. Prendre en compte la sécurité afin de limiter les risques d'accidents, d'explosions, d'incendies

La chimie verte permet ainsi de réduire les dépenses en utilisant des matières premières déjà existantes et en évitant les coûts de l'élimination de déchets toxiques que la chimie conventionnelle produit souvent.

Références bibliographiques

Abis S, (2015) Géopolitique du blé, Paris: IRIS éditions ; Armand Colin

Adhikari TB, Balaji B, Breeden J, Goodwin SB (2007) Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71:55–68

Agreste, (2015) (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Gaf16p120-131.pdf>)

Anastas P, Warner J (2000) *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, Oxford, New York

Arvalis (2013) Septoriose, miser sur le choix variétal et les seuils d'intervention. <https://www.arvalis-infos.fr/maladies-des-cereales-a-paille-septoriose-quelle-nuisibilite-et-quelle-strategie-de-protection--@/view-20824-arvarticle.html>. Accessed 11 April 2018

Aziz A, Poinssot B, Daire X, et al (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1118–1128. Doi: 10.1094/MPMI.2003.16.12.1118

Bearchell SJ, Fraaije BA, Shaw MW, Fitt BDL (2005) Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5438–5442. Doi: 10.1073/pnas.0501596102

Benhamou N, Rey P (2012) Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable.: I. Principes de la résistance induite. *phyto* 92:1–23 . Doi: 10.7202/1012399ar

Benouaret R, Goujon E, Goupil P (2013) Plant defence inducer properties of the grape marc extract. *IOBC- WP RS Bulletin* 89:95-97

Benouaret R, Goujon E, Goupil P (2014) Grape marc extract causes early perception events, defence reactions and hypersensitive response in cultured tobacco cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 77:84– 89 . Doi: 10.1016/j.plaphy.2014.01.021

Bolwell GP, Wojtaszek P (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:347–366. Doi: <https://doi.org/10.1006/pmpp.1997.0129>

Bonjean A, 2001. Histoire de la culture de céréales et en particulier du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). In: *Agric. Biodiversité Plantes. Dossier de l'Environnement de l'INRA*. Paris: Le Pershec S, Guy P, Fraval A. (Dir), 29–37. disponible sur: <http://www7.inra.fr/dpenv/pdf/bonjed21.pdf>

Brading PA, Verstappen ECP, Kema GHJ, Brown JKM (2002) A Gene-for-Gene Relationship Between Wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria Tritici* Blotch Pathogen. *Phytopathology* 92:439–445. Doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.4.439

- Brokenshire T (1975) Wheat Debris as an Inoculum Source for Seedling Infection by *Septoria tritici*. *Plant Pathology* 24:202–207. Doi: 10.1111/j.1365-3059.1975.tb01895.x
- Brown JKM, 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. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.017
- Bruce TJA (2012) GM as a route for delivery of sustainable crop protection. *J Exp Bot* 63:537–541. Doi: 10.1093/jxb/err281
- Brunner PC, Torriani SFF, Croll D, et al (2013) Coevolution and Life Cycle Specialization of Plant Cell Wall Degrading Enzymes in a Hemibiotrophic Pathogen. *Mol Biol Evol* 30:1337–1347. Doi: 10.1093/molbev/mst041
- Butault J-P, Delame N, Jacquet F, Zardet G (2012) L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction. In: *alim'agri*. <http://agriculture.gouv.fr/lutilisation-des-pesticides-en-france-etat-des-lieux-et-perspectives-de-reduction>. Accessed 20 May 2018
- Chandler D, Bailey AS, Tatchell GM, et al (2011) The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366:1987–1998 . Doi: 10.1098/rstb.2010.0390
- Chantret N, Salse J, Sabot F, et al (2005) Molecular Basis of Evolutionary Events That Shaped the Hardness Locus in Diploid and Polyploid Wheat Species (*Triticum* and *Aegilops*). *The Plant Cell* 17:1033–1045. Doi: 10.1105/tpc.104.029181
- Chartrain L, Brading PA, Makepeace JC, Brown JKM (2004) Sources of resistance to *septoria tritici* blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology* 53:454–460. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01052.x
- Chen Z, Malamy J, Henning J, et al (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4134–4137
- Chen Z, Ricigliano JW, Klessig DF (1993) Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9533–9537
- Cheval P, Siah A, Bomble M, et al (2017) Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. *Crop Protection* 92:131–133 . Doi: 10.1016/j.cropro.2016.10.017
- Chtioui O (2011) Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à disques tournants : thèse de doctorat. Lille, Université Lille I sciences et technologies, 196 p.
- 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. Doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01560.x
- Conseil international des céréales (2018). GMR 487 – 26 April 2018. <https://www.igc.int/downloads/gmrsummary/gmrsumme.pdf>.
- Coppin E, Debuchy R, Arnaise S, Picard M (1997) Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:411–428

Cordo C.A. et al, 2007. *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. *Biocontrol Sci. Technol*, 17(7), 687–698.

Cousin A, Mehrabi R, Guilleroux M, et al (2006) The MAP kinase-encoding gene *MgFus3* of the non-appressorium phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* is required for penetration and in vitro pycnidia formation. *Mol Plant Pathol* 7:269–278. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00337.x

Coutte F (2009) Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à membrane, Du génie moléculaire au génie des procédés : thèse de doctorat. Lille, Université Lille I sciences et technologies, 243 p.

Couture I (2016) Les biofongicides en production horticole, une solution pour la protection de la santé et environnement. In: MAPAQ. https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Regions/monteregie/articles/agroenvironnement/Pages/Biofongicides_en_production_horticole.aspx. Accessed 11 May 2018

Creelman RA, Mullet JE (1997) biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:355–381. Doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.355

Cunfer BM (1999). *Stagonospora* and *Septoria* pathogens of cereals: the infection process. In: van Ginkel M, McNab A, Krupinsky J eds. *Septoria and Stragonospora diseases of cereals: a compilation of global research*. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Czaja K, Góralczyk K, Struciński P, et al (2015) Biopesticides--towards increased consumer safety in the European Union. *Pest Manag Sci* 71:3–6 . Doi: 10.1002/ps.3829

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, et al (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–430. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

Delcambe L (1950) Iturine, new antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. *C R Seances Soc Biol Fil* 144:1431–1434

Deliopoulos T, Kettlewell PS, Hare MC (2010) Fungal disease suppression by inorganic salts: A review - ScienceDirect. *Crop Protection* 29:1059–1075
Dixon RA, Harrison MJ and Lamb CJ (1994). Early events in the activation of plant defense responses, *Anna. Rev. Phytopathol.* 32, 479-501

Douaiher MN, Nowak E, Durand R, Halama P, Reignault Ph. (2007) Correlative analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall degrading enzymes produced in vitro: the importance of xylanases and polygalacturonases. *Plant Pathol* 56: 79–86.

Doussinault G, Pavoine M-T, Jaudeau B, and Jahier J (2001) Évolution de la variabilité génétique chez le blé. In "Dossier de l'environnement de l'INRA, n°21", pp. 91-103, Paris.

Drummond JB, Craigie RA, Braithwaite M, et al (2015) The effect of fungicide dose rate and mixtures on *Zymoseptoria tritici* in two cultivars of autumn sown wheat. *New Zealand Plant Protection* 68:420–427

Duncan KE, Howard RJ (2000). Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research* (104), 1074-1082.

- Ebel J, Cosio EG (1994) Elicitors of Plant Defense Responses. International Review of Cytology 148:1–36. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62404-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62404-3)
- Elad y, Cytryn E, Meller-Harel Y, Graber E (2012) The Biochar Effect: Plant resistance to biotic stresses. Phytopathologia Mediterranea 50:335–349
- El Chartouni L, Randoux B, Duyme F, et al (2012) Correlation of cytological and biochemical parameters with resistance and tolerance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Plant Biol (Stuttg) 14 Suppl 1:11–21. Doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00443.x
- El Hadrami A, Adam LR, El Hadrami I, Daayf F (2010) Chitosan in Plant Protection. Mar Drugs 8:968–987. Doi: 10.3390/md8040968
- Elmer WH, Pignatello JJ (2011) Effect of Biochar Amendments on Mycorrhizal Associations and Fusarium Crown and Root Rot of Asparagus in Replant Soils | Plant Disease. 95:960–966
- United States Environmental Protection Agency EPA (2015) Biopesticides. In: US EPA. <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>. Accessed 11 May 2018
- Eriksen L, Munk L (2003) The Occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its Anamorph *Septoria tritici* in Winter Wheat during the Growing Season. European Journal of Plant Pathology 109:253–259. Doi: 10.1023/A:1022851502770
- Eyal Z (1999). Septoria and Stagonospora diseases of cereals: a comparative perspective. Pages 1-25 in: Septoria on Cereals. - A study of Pathosystems. J. A. Lucas, P. Bowyer, and H. M. Anderson, eds. IACR- Long Ashton Research station, Bristol, UK
- Fones H, Gurr S (2015) The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. Fungal Genet Biol 79:3–7. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.004
- Flaishman MA, Eyal Z, Zilberstein A, et al (1996) Suppression of Septoria tritici blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. Molecular plant-microbe interactions : MPMI (USA) 9:642 – 645
- Fraaije BA, Cools HJ, Fountaine J, et al (2005) Role of Ascospores in Further Spread of QoI-Resistant Cytochrome b Alleles (G143A) in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology 95:933–941. Doi: 10.1094/PHYTO-95-0933
- Gohari AM (2015) Identification and functional characterization of putative (a)virulence factors in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. Phd, Wageningen University
- Goodwin SB, Thompson I (2011) Development of isogenic lines for resistance to Septoria tritici blotch in wheat. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding - UZEI (Czech Republic)
- Goodwin SB, M'barek SB, Dhillon B, et al (2011) Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. PLoS Genet 7:e1002070. Doi: 10.1371/journal.pgen.1002070
- Goodwin SB (2007) Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to Septoria tritici blotch in wheat. Australasian plant pathology APP
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, et al (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers

of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629–643. Doi: 10.1105/tpc.8.4.629

Goupil P, Benouaret R, Charrier O, et al (2012) Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicology* 21:1541–1549. Doi: 10.1007/s10646-012-0908-1

Guériaux D, Tessier R (2018) La réduction de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques. In: Alim'agri. <http://agriculture.gouv.fr/la-reduction-de-lutilisation-des-produits-phytopharmaceutiques>. Accessed 1 May 2018

Halama P, Lacoste L (1992) Déterminisme de la reproduction sexuée du *Phaeosphaeria* (*Leptosphaeria*) nodorum agent de la septoriose du blé. II. Action de la température et de la lumière. *Canadian Journal of Botany* 70:1563–1569. Doi: 10.1139/b92-197

Hammond-Kosack KE, Rudd JJ (2008) Plant resistance signalling hijacked by a necrotrophic fungal pathogen. *Plant Signal Behav* 3:993–995

Heath Michele C. (2001) Septoria on cereals: a study of pathosystems. Ed. by J. A. Lucas, P. Bowyer and H. M. Anderson. 353 pages. Wallingford, UK: CAB International, 1999. £55.00 h/b. ISBN 0 85199 269 2. *New Phytologist* 145:7–9. Doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00564.x

Heil M (2014) Trade-offs associated with induced resistance. In: *Induced Resistance for Plant Defense*. Wiley-Blackwell, pp 171–192

Henry G, Thonart P, Ongena M (2012) PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnol Agron Soc Environ*

Herth A, 2011. Le biocontrôle pour la protection des cultures, 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes. Rapport parlementaire remis au premier Ministre Francois Fillon.

Heydari A, Pessarakli M (2010) A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists - SciAlert Responsive Version. 10:273–290

Hillocks RJ (2012) Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection* 31:85–93. Doi: 10.1016/j.cropro.2011.08.008

Hippchen H, Schneider H, Schwingeler R (1978) Process for obtaining amino acids from the raw juices of sugar manufacture

Hunter, Coker, Royle (1999) The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* 48:51–57. Doi: 10.1046/j.1365-3059.1999.00310.x

Jacques P (2011) Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus spp.* In: SOBERÓN-CHÁVEZ G. (Ed). *Biosurfactants*. Münster (Allemagne), Springer, p 57-92

Jacques P, Krier F, Deravel J, Coutte F, Bechet M, Leclere V, Chollet M, Coucheney F, Rochex A, Boistel C, Lemiere S, Demuynck S, Lepretre A, Höfte M, Van Hese N, D'aes J, Pauwelyn E, Ongena M, Cawoy H, Henry G, Ait Barka E, Dorey S, Jacquard C, Clement C, Farace G, Fernandez O, Reignault P, Randoux B, Khong G, Tisserant B, Delanote L, Temmerman F, Bogaert A, Van Nieuwenhuysen P, Cap N, Beyers T (2014) Les lipopeptides

d'origine microbienne. *Phytoma*, 672, 38–42

Jashni MK. Identification and functional characterization of proteases and protease inhibitors involved in virulence of fungal tomato pathogens. 183 pages. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL (2015).

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329. Doi: 10.1038/nature05286

Jørgensen LN, Hovmøller MS, Hansen JG, et al (2014) IPM Strategies and Their Dilemmas Including an Introduction to www.eurowheat.org. *Journal of Integrative Agriculture* 13:265–281. Doi: 10.1016/S2095-3119(13)60646-2

Keen N, Partridge, Zaki A (1972) Pathogen-Produced Elicitor of a Chemical Defense Mechanism in Soybeans Monogenically Resistant to *Phytophthora Megasperma* Var *Sojae*. *Phytopathology* 62:768–768

Kema GHJ, van der Lee TAJ, Mendes O, et al (2008) Large-scale gene discovery in the septoria tritici blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* with a focus on in planta expression. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1249–1260. Doi: 10.1094/MPMI-21-9-1249

Kema GH, Verstappen EC, Waalwijk C (2000) Avirulence in the wheat septoria tritici leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* is controlled by a single locus. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1375–1379. Doi: 10.1094/MPMI.2000.13.12.1375

Kema GHJ, Yu DZ, Rijkenberg FHJ, et al (1996) Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86:777–786

Kettlewell PS, Cook JW, Parry DW (2000) Evidence for an Osmotic Mechanism in the Control of Powdery Mildew Disease of Wheat by Foliar-applied Potassium Chloride. *European Journal of Plant Pathology* 106:297–300. Doi: 10.1023/A:1008761202455

Kilaru S, Steinberg G (2015) Yeast recombination-based cloning as an efficient way of constructing vectors for *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet Biol* 79:76–83. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.03.017

Kildea S, Ransbotyn V, Khan MR, et al (2008) *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. *Biological Control* 47:37–45. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.07.001

Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, et al (2000) Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol* 124:1027–1038

Łaźniewska J, Macioszek VK, Kononowicz AK (2012) Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 78:24–30. Doi: 10.1016/j.pmp.2012.01.004

Lee W-S, Rudd JJ, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2014) *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 27:236–243. Doi: 10.1094/MPMI-07-13-0201-R

- Leroux P, Albertini C, Gautier A, et al (2007) Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 63:688–698. Doi: 10.1002/ps.1390
- Leroux P, Walker A.S, Albertini C. and Gredt M.. (2006). Resistance to fungicides in French populations of *Septoria tritici*, the causal agent of wheat leaf blotch. *Aspects of Applied Biology*(78), 153-162.
- E. Levy, Z. Eyal, S. Carmely, et al (1989) Suppression of *Septoria tritici* and *Puccinia recondita* of wheat by an antibiotic-producing fluorescent pseudomonad. *Plant Pathology*. 38:564–570
- Levy E, Eyal Z, Chet I (1988) Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust on wheat seedling leaves by pseudomonads. *Plant pathology* 37: 551-557
- Levy E, Gough FJ, Berlin KD, et al (1992) Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. *Plant Pathology* 41:335–341. Doi: 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02355.x
- Lev-Yadun S, Gopher A, Abbo S (2000) Archaeology. The cradle of agriculture. *Science* 288:1602–1603
- Li Y, Huang F, Lu Y, et al (2013) Mechanism of plant–microbe interaction and its utilization in disease-resistance breeding for modern agriculture. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 83:51–58. Doi: 10.1016/j.pmpp.2013.05.001
- Lucas JA (2004) Survival, surfaces and susceptibility – the sensory biology of pathogens. *Plant Pathology* 53:679–691. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01106.x
- Lynch KM, Zannini E, Guo J, et al (2016) Control of *Zymoseptoria tritici* cause of septoria tritici blotch of wheat using antifungal *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology* 121:485–494. Doi: 10.1111/jam.13171
- Marshall R, Kombrink A, Motteram J, et al (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 Physiol* 156:756–769. Doi: 10.1104/pp.111.176347
- Matsuoka Y (2011) Evolution of polyploid triticum wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant Cell Physiol* 52:750–764. Doi: 10.1093/pcp/pcr018
- McCartney C, Mercer PC, Cooke LR, Fraaije BA (2007) Effects of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in Northern Ireland. *Crop Protection* 26:1272–1280. Doi: 10.1016/j.cropro.2006.10.027
- McDonald MC, McDonald BA, Solomon PS (2015) Recent advances in the *Zymoseptoria tritici*–wheat interaction: insights from pathogenomics. *Front Plant Sci* 6:. Doi: 10.3389/fpls.2015.00102

- Mehrabi R, Kema GHJ (2006) Protein kinase A subunits of the ascomycete pathogen *Mycosphaerella graminicola* regulate asexual fructification, filamentation, melanization and osmosensing. *Mol Plant Pathol* 7:565–577. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00361.x
- Mehrabi R, M'Barek SB, van der Lee TAJ, et al (2009) G α and G β Proteins Regulate the Cyclic AMP Pathway That Is Required for Development and Pathogenicity of the Phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Eukaryot Cell* 8:1001–1013. Doi: 10.1128/EC.00258-08
- Mehrabi R, Taga M, Kema GHJ (2007) Electrophoretic and cytological karyotyping of the foliar wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals many chromosomes with a large size range. *Mycologia* 99:868–876
- Mehrabi R, Van der Lee T, Waalwijk C, Gert HJK (2006) MgSlt2, a cellular integrity MAP kinase gene of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is dispensable for penetration but essential for invasive growth. *Mol Plant Microbe Interact* 19:389–398. Doi: 10.1094/MPMI-19-0389
- Mehrabi R, Zwiers L-H, de Waard MA, Kema GHJ (2006) MgHog1 regulates dimorphism and pathogenicity in the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 19:1262–1269. Doi: 10.1094/MPMI-19-1262
- Mejri S, Siah A, Coutte F, et al (2017) Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ Sci Pollut Res Int*. Doi: 10.1007/s11356-017-9241-9
- Mirzadi Gohari A, Mehrabi R, Robert O, et al (2014) Molecular characterization and functional analyses of ZtWor1, a transcriptional regulator of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Mol Plant Pathol* 15:394–405. Doi: 10.1111/mpp.12102
- Mnif I, Ghribi D (2015) Lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Peptide Science*, vol. 104, 3, 129–147.
- Morrison S (2009) Un coup d'œil sur l'agriculture canadienne : Du sucre dans la betterave? In: *Statistique Canada*. <https://www.statcan.gc.ca/pub/96-325-x/2007000/article/10576-fra.htm>. Accessed 28 May 2018
- Nelson MA (1996) Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends Genet* 12:69–74
- Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, vol. 16, 3, 115–125.
- Ors ME, Randoux B, Selim S, et al (2018) Cultivar-dependent partial resistance and associated defence mechanisms in wheat against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 67:561–572. Doi: 10.1111/ppa.12760
- Orton ES, Deller S, Brown JKM (2011) *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control. *Mol Plant Pathol* 12:413–424. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00688.x
- Oste B, Huguerot G, Delos M, Freydier M, Henaff G, Gatellet J, Pillon O, Feurprier B. et Vergnaud A. (2000). Bilan phyto-sanitaire de la campagne 1998/99. *Phytoma — la défense*

des végétaux, 523:12–16.

Palmer C-L, Skinner W (2002) *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. Mol Plant Pathol 3:63–70. Doi: 10.1046/j.1464-6722.2002.00100.x

Parent C, Capelli N, Dat J (2008). Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. Comptes Rendus Biologies, 331: 255–261.

Park J-H, Halitschke R, Kim HB, et al (2002) A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. Plant J 31:1–12

Perelló A., Simón Mr., Arambarri Am. (2002) Interactions between Foliar Pathogens and the Saprophytic Microflora of the Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phylloplane Journal of Phytopathology. 150:232–243

Pieterse CM, Van Wees SC, van Pelt JA, et al (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. Plant Cell 10:1571–1580

Pieterse CMJ, Van Loon LC (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends Plant Sci 4:52–58

Ponomarenko A, Gooding S B and Kema GJ (2011). Septoria Tritici Blotch (Stb). Plant Health Instructor, from <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Septoria.aspx>

Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ, et al (2011) *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia 26:57–69. Doi: 10.3767/003158511X571841

Ravensberg W (2015) Crop protection in 2030: towards a natural, efficient, safe and sustainable 1372 approach. International Symposium Swansea University 7-9 September 2015

Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Plant Mol Biol 53:741–754. Doi: 10.1023/B:PLAN.0000019120.74610.52

Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, et al (2007) Iodine 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction - ScienceDirect. 68:1156–1164

Richard C, Goupil P, Ter Halle A (2014) Use of a natural leave extract for dual applications: enhancing plant resistance towards pathogens and photoprotection of active ingredients - ficheEn64.pdf

Rivas-San Vicente M, Plasencia J (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. J Exp Bot 62:3321–3338. Doi: 10.1093/jxb/err031

Rohel EA, Payne AC, Fraaije BA, Hollomon DW (2001) Exploring infection of wheat and

carbohydrate metabolism in *Mycosphaerella graminicola* transformants with differentially regulated green fluorescent protein expression. *Mol Plant Microbe Interact* 14:156–163. Doi: 10.1094/MPMI.2001.14.2.156

Romero D, De Vicente A, Rakotoaly Rh, Dufour S E, Veening J-W, Arrebola E, Cazorla Fm, Kuipers Op, Paquot M, Perez-Garcia A (2006) The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 20, 4, 430-440.

Rudd JJ, Kanyuka K, Hassani-Pak K, et al (2015) Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiol* 167:1158–1185. Doi: 10.1104/pp.114.255927

Rudd JJ, Keon J, Hammond-Kosack KE (2008) The wheat mitogen-activated protein kinases TaMPK3 and TaMPK6 are differentially regulated at multiple levels during compatible disease interactions with *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Physiol* 147:802–815. Doi: 10.1104/pp.108.119511

Saintenac C, Lee W-S, Cambon F, et al (2018) Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nat Genet* 50:368–374. Doi: 10.1038/s41588-018-0051-x

Sánchez-Vallet A, McDonald MC, Solomon PS, McDonald BA (2015) Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genet Biol* 79:29–32. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.001

Sanderson, F.R. et Hampton, J. G. (1978). Role of the perfect states in the epidemiology of the common Septoria diseases of wheat. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. (21), pp. 277-281.

Selim S, Roisin-Fichter C, Andry J-B, et al (2014) Real-time PCR to study the effect of timing and persistence of fungicide application and wheat varietal resistance on *Mycosphaerella graminicola* and its sterol 14 α -demethylation-inhibitor-resistant genotypes. *Pest Manag Sci* 70:60–69. Doi: 10.1002/ps.3525

Shaw MW, Royle DJ (1989). Estimation and validation of a function describing the rate of yield loss in winter wheat due to infection by *Mycosphaerella graminicola* *Annals of Applied Biology* 115, 425 – 42.

Shaw MW, Bearchell SJ, Fitt BDL, Fraaije BA (2008) Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola*. *New Phytol* 177:229–238. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02236.x

Shetty NP, Kristensen BK, Newman MA, Moller K, Gregersen PL, and Jørgensen HJL (2003). Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62, 333-346.

Shetty NP, Mehrabi R, Lütken H, et al (2007) Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytol* 174:637–647. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02026.x

Shewry PR (2009) Wheat. *J Exp Bot* 60:1537–1553. Doi: 10.1093/jxb/erp058

Siah A., Bomble M., Tisserant B., Cadalen T., Holvoet M., Hilbert J.L., Halama P., Reignault Ph. (2018a). Genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in northern France region, field, plant and leaf layer scales. *Phytopathology*, doi: 10.1094/PHYTO-09-17-0322-R (in press).

Siah A, Deweer C, Duyme F, et al (2010b) 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. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02303.x

Siah A, Magnin-Robert M, Randoux B, et al (2018b) Natural Agents Inducing Plant Resistance Against Pests and Diseases. In: *Natural Antimicrobial Agents*. Springer, Cham, pp 121–159

Siah A, Tisserant B, El Chartouni L, et al (2010a) Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal Biol* 114:980–990. Doi: 10.1016/j.funbio.2010.09.008

Sidhu YS, Chaudhari YK, Usher J, et al (2015) A suite of Gateway® compatible ternary expression vectors for functional analysis in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet Biol* 79:180–185. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.03.021

Simón MR, Cordo CA, Castillo NS, et al (2012) Population Structure of *Mycosphaerella graminicola* and Location of Genes for Resistance to the Pathogen: Recent Advances in Argentina. In: *International Journal of Agronomy*. <https://www.hindawi.com/journals/ija/2012/680275/>. Accessed 10 May 2018

Sobhy IS, Erb M, Sarhan AA, et al (2012) Less is more: treatment with BTH and laminarin reduces herbivore-induced volatile emissions in maize but increases parasitoid attraction. *J Chem Ecol* 38:348–360. Doi: 10.1007/s10886-012-0098-6

Somai-Jemmali L, Siah A, Harbaoui K, et al (2017) Correlation of fungal penetration, CWDE activities and defense-related genes with resistance of durum wheat cultivars to *Zymoseptoria tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100:117–125. Doi: 10.1016/j.pmpp.2017.08.003

Sonenshein AL, Hoch JA, Losick RM (1993) *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: From Genes to Cells. In: Adlibris. <https://www.adlibris.com/se/bok/bacillus-subtilis-and-other-gram-positive-bacteria-from-genes-to-cells-9781555810535>. Accessed 10 May 2018

Statista (2018) Total U.S. wheat production value 2017 | Statistic. In: Statista. <https://www.statista.com/statistics/190362/total-us-wheat-production-value-from-2000/>. Accessed 10 May 2018

Steinberg G (2015) Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genet Biol* 79:17–23. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.002

Stenberg JA, Heil M, Åhman I, Björkman C (2015) Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease. *Trends Plant Sci* 20:698–712. Doi: 10.1016/j.tplants.2015.08.007

- Stergiopoulos I, Zwiers L-H, De Waard MA (2003) The ABC transporter MgAtr4 is a virulence factor of *Mycosphaerella graminicola* that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 16:689–698. Doi: 10.1094/MPMI.2003.16.8.689
- Syndicat des énergies renouvelables (2012) Origines et usages de la biomasse. http://www.enr.fr/userfiles/files/Kit%20de%20communication/2010102323_SERBiomasse_complet.pdf. Accessed 10 May 2018
- Tayeh C (2012). Induction of resistances in wheat (*Triticum aestivum* L.) during a compatible interaction with *Blumeria graminis* (DC. EO Speer): mechanisms involved after applications of trehalose and heptanoyl salicylic acid, a functionalized derivative of salicylic acid. Calais, France: University of Littoral Côte d'Opale, PhD thesis.
- Tayeh C, Randoux B, Bourdon N, Reignault Ph, (2013). Lipid metabolism is differentially modulated by salicylic acid and heptanoyl salicylic acid during the induction of resistance in wheat against powdery mildew. *Journal of Plant Physiology*, 170: 1620–1629.
- Tomaszewska J, Bieliński D, Binczarski M, et al (2018) Products of sugar beet processing as raw materials for chemicals and biodegradable polymers. *RSC Advances* 8:3161–3177. Doi: 10.1039/C7RA12782K
- Torriani SFF, Melichar JPE, Mills C, et al (2015) *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet Biol* 79:8–12. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.010
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135–162. Doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425
- Vidhyasekaran P (2015) Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity. Springer Netherlands
- Viterbo A, Ramot O, Chernin L, Chet I (2002) Significance of lytic enzymes from *Trichoderma spp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:549–556. Doi: 10.1023/A:1020553421740
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47:177–206. Doi: 10.1146/annurev.phyto.050908.135202
- Walters DR, Fountaine JM (2009) Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *The Journal of Agricultural Science* 147:523–535. Doi: 10.1017/S0021859609008806
- Walters DR, Heil M, (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 71(1), 3–17.
- Walters DR, Newton AC, and Lyon GD, (2014) Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection 2nd ed. Dale R. Walters et al, eds, Wiley-Blackwell
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot* 64:1263–1280. Doi: 10.1093/jxb/ert026

Walton RB, Woodruff HB (1949) A CRYSTALLINE ANTIFUNGAL AGENT, MYCOSUBTILIN, ISOLATED FROM SUBTILIN BROTH. J Clin Invest 28:924–926. Doi: 10.1172/JCI102180

Ware SB (2006) Aspects of sexual reproduction in *Mycosphaerella* species on wheat and barley : genetic studies on specificity, mapping, and fungicide resistance. Phd, S.n.

Wittenberg AHJ, van der Lee TAJ, Ben M’barek S, et al (2009) Meiosis drives extraordinary genome plasticity in the haploid fungal plant pathogen *Mycosphaerella graminicola*. PLoS ONE 4:e5863. Doi: 10.1371/journal.pone.0005863

Yang F, Li W, Jørgensen HJL (2013) Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. PLoS ONE 8:e81606. Doi: 10.1371/journal.pone.0081606

Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals - zadoks_scale_1974.pdf. 14:415–421

Zhang S, Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. Trends Plant Sci 6:520–527

Zhuk IV, Lisova GM, Dovgal ZM, Dmitriev AP (2014) The induction of *Triticum aestivum* L. tolerance to *Septoria tritici* by oxalic acid. Modern Phytomorphology 6:105–108. Doi: 10.5281/zenodo.160461

II. Problématique et objectifs de la thèse

Les produits de biocontrôle, en particulier les inducteurs de résistance, représentent un levier prometteur pour réduire l'utilisation des produits phytosanitaires conventionnels en agriculture, limitant ainsi l'impact de ces derniers sur l'environnement et la santé humaine. L'intégration des produits de biocontrôle dans les stratégies de la lutte intégrée (*Integrated Pest Management*, IPM) est fortement encouragée en Europe, en particulier depuis la mise en place de la directive 2009/128/CE visant à limiter le recours aux pesticides conventionnels et à promouvoir l'utilisation d'intrants compatibles avec une agriculture durable. Cette directive impose à chaque état membre de mettre en œuvre un plan d'action national basé sur l'IPM, afin de réduire la dépendance aux pesticides de synthèse (Villaverde et *al.*, 2014). Plusieurs plans d'action nationaux ont été lancés en Europe, comme Ecophyto en France, *Green deal project* aux Pays-Bas, *Biopesticide track* en Belgique, et *Pesticide levy system* au Danemark (Ravensberg 2015).

Aujourd'hui, les produits de biocontrôle ne représentent que 5 % du marché total de la protection des cultures (environ 3 milliards de dollars dans le monde), mais cette part est en croissance et devrait augmenter de 8,84% par an, pour atteindre plus de 7 % du marché d'ici 2025 (Olson, 2015). Selon une estimation basée sur la dynamique du marché de la protection des plantes, l'inversion des courbes de la part des produits de produits de biocontrôle et de celle des produits conventionnels aura lieu vers les années 2050 (Figure 9).

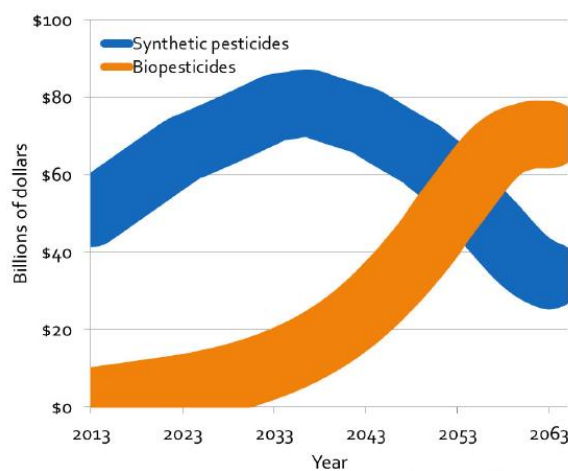


Figure 9. Estimation de l'évolution de la part des produits de biocontrôle (bio-pesticides) et celle des produits conventionnels dans le marché de protection des plantes (Olson, 2015).

A l'échelle mondiale, il existe des centaines d'entreprise de biocontrôle, dont la plupart (plus de 230) sont regroupées au sein de l'association internationale des fabricants des produits de biocontrôle (*International Biocontrol Manufacturers Association*, IBMA). En France, un consortium biocontrôle fédérant des acteurs publics (INRA, Universités, etc.) et privés (IBMA,

etc.) a été mis en place afin de promouvoir la recherche et lever les verrous à l'utilisation de ces produits à large échelle sur le terrain.

Malgré l'attente des agriculteurs et des acteurs de la filière de protection des plantes, il existe aujourd'hui très peu de produits de biocontrôle homologués sur le blé, nonobstant l'importance de cette culture (1^{ière} culture en Europe). Vis-à-vis de la septoriose, la principale maladie sur cette culture et qui est la cible de 70% des fongicides vendus en Europe (Fones et Gurr, 2015), seules deux substances actives d'inducteurs de résistance sont homologuées (Vacciplant[®], à base de laminarine, un extrait de l'algue brune *Laminaria digitata*, Goëmar-Arysta Lifescience, et Bion[®], à base de Acibenzolar-S-méthyl, un analogue fonctionnel de l'acide salicylique, Syngenta). Par ailleurs, il existe très peu d'innovation dans la littérature pour identifier de nouveaux inducteurs de résistance, dans la mesure où ce sont les mêmes composés qui sont le plus souvent étudiés sur différents pathosystèmes (Tayeh *et al.*, 2014, Siah *et al.*, 2018). Les travaux de cette thèse se situent dans ce contexte et visent à identifier de nouveaux composés de biocontrôle efficaces sur le blé vis-à-vis de *Z. tritici*. Plus concrètement, les objectifs de la thèse consistent à :

- Concevoir de nouvelles molécules inductrices de résistance à partir de l'acide pyroglutamique, un coproduit issu de mélasses de la betterave sucrière. L'obtention des molécules est basée sur les principes de la chimie verte visant des molécules pas ou peu toxiques et respectant les valeurs du développement durable. Des fonctionnalisations (modifications) chimiques ont été réalisées pour étudier la relation structure-activité des molécules et pour optimiser leur efficacité.
- Evaluer l'efficacité de protection des molécules sur le blé (*in planta*) et leur effet direct antifongique (*in vitro* et *in planta*).
- Caractériser les réactions de défense induites par les molécules les plus efficaces à l'aide de tests moléculaires (expression de gènes impliqués dans les réactions de défense).

En outre, la saccharine, le GABA, ainsi que des lipopeptides produits par la bactérie *Bacillus subtilis* (mycosubtiline, surfactine et fengycine), des composés ayant déjà montré dans la littérature des efficacités sur d'autres pathosystèmes, ont également été intégrés dans le panel des molécules étudiées.

Les principaux résultats obtenus dans le cadre de ces travaux sont valorisés par quatre articles scientifiques (deux en cours de finalisation, un soumis et un accepté) qui sont présentés ci-après.

III. Résultats

Article 1

La saccharine induit les réactions de défense chez le blé vis-à-vis de *Zymoseptoria tritici*

Dans ce papier, nous avons démontré pour la première fois la capacité de la saccharine à induire des réactions de défenses chez le blé contre *Zymoseptoria tritici*. En effet, le traitement du cultivar sensible Alixan avec la saccharine à la dose 15 mM deux jours avant inoculation avec la souche pathogène de *Z. tritici* T02596 a permis de réduire la sévérité de la maladie de 77% par rapport au témoin non-traité inoculé. Les analyses *in vitro* et *in planta* ont montré que la saccharine ne présente aucun effet antifongique direct, ni sur la germination des spores, ni sur la croissance des hyphes. Des études d'expression de gènes effectuées entre 2 et 7 jours post traitement (dpt) en condition inoculée ou non inoculée ont révélé que la saccharine induit l'expression des gènes codant pour la lipoxygénase (LOX) à toutes les dates étudiées et la protéine (PR1) à 7 jours post inoculation en conditions infectieuse et non infectieuse. Cependant, aucune induction des expressions des gènes codant pour la peroxydase (POX2) et la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) n'a été observée. Nos résultats mettent en évidence la capacité de la saccharine à protéger le blé contre *Z. tritici* par l'induction des défenses de l'hôte. Des analyses supplémentaires permettraient de mieux comprendre les voies de défense activées par cette molécule.

Saccharin elicits defense pathways and protects wheat against the hemibiotrophic pathogen *Zymoseptoria tritici*

Samara Mejri¹, Maryline Magnin-Robert², Ali Siah¹, Béatrice Randoux², Benoit Tisserant², Alina Ghinet^{3,4,5}, Patrice Halama¹ and Philippe Reignault²

¹ Institut Charles Viollette (ICV, EA 7394), SFR Condorcet FR CNRS 3417, Institut Supérieur d'Agriculture, Yncréa Hauts-de-France, 48, bd Vauban, BP 41290, F-59014 Lille cedex, France

² Univ. Littoral Côte d'Opale, UCEIV - EA 4492, SFR Condorcet FR CNRS 3417, CS 80699, F-62228, Calais cedex, France.

³ Lille Inflammation Research International Center (LIRIC, Inserm U995), Université de Lille, CHRU de Lille, Faculté de médecine - Pôle recherche, Place Verdun, F-59045 Lille cedex, France

⁴ Laboratoire de chimie durable et santé, Hautes Etudes d'Ingénieur, Yncréa Hauts-de-France, 13, rue de Toul, F-59046 Lille cedex, France

⁵ Faculty of Chemistry, University of Iasi, Bd. Carol I, nr. 11, 700506 Iasi, Romania

Abstract

Plant resistance inducers are among the most promising alternatives for a more sustainable crop protection. Here, we established for the first time the ability of saccharin, a metabolite derived from probenazole, to induce protection in wheat against *Zymoseptoria tritici*, the most frequently occurring pathogen on this crop. Our experiments were performed in the greenhouse by treating seedlings of the wheat cv. Alixan with 15 mM saccharin two days before inoculation with the *Z. tritici* strain T02596. Foliar application of saccharin resulted in 77 % disease severity reduction when compared to non-treated control plants. In vitro and in planta assays showed that saccharin did not exhibit any direct antifungal effect, neither on spore germination, nor on hyphal growth. Molecular investigations from 2 to 7 days post-treatment (dpt) revealed that saccharin up-regulated the expression of genes encoding for lipoxygenase (LOX) at all studied time-points and pathogenesis-related protein 1 (PR1) at 7 dpt, in both non-infectious and infectious contexts. However, saccharin did not induce significant up-regulation of genes encoding for peroxidase (POX2) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Our findings report the ability of saccharin to protect wheat against *Z. tritici* through the induction of host defenses. Further analyses would provide a better understanding of defense pathways activated by this molecule.

Key words: Wheat, *Zymoseptoria tritici*, resistance inducers, elicitors, sustainable agriculture

Introduction

Almost 12% of universal plant production were recently estimated to be lost yearly because of crop diseases (Walters *et al.* 2013). These losses could reach 40 % agricultural production when combined to animal pests and weed threats (Oerke 2006). During the 20th century, a wide range of chemical pesticides was developed, formulated and used to control plant aggressors such as insects, fungi, bacteria, viruses and weeds. Pesticides proved to play a significant role in food production and security. Unfortunately, many studies demonstrated that chemical pesticides are toxic to humans and animals (Van der Werf 1996; Berny 2007), and that they are responsible for both life-threatening and chronic health effects, depending on the quantity and the ways of exposure. Moreover, many pesticides are considered soil and water polluting (Pimentel 2005). Therefore, the reduction of chemical inputs and research toward sustainable agricultural practices, such as the use of biocontrol products, are nowadays encouraged. One of the most original biocontrol products are plant resistance inducers, also called elicitors (Siah *et al.* 2018). Such products can be of natural or synthetic origins and their recognition by the host can lead to the activation of a wide range of plant defense mechanisms. During plant-microbe interactions, three main categories of elicitors can be involved in plant immunity, each category being a potential reservoir of biocontrol tools: pathogen-associated molecular pattern (PAMP), microbe-associated molecular patterns (MAMPs), both considered as exogenous elicitors, and damage-associated molecular pattern (DAMP), corresponding to endogenous elicitors. Elicitors can activate different types of resistances, such as local acquired resistance (LAR) that is limited to the treated site, systemic acquired resistance (SAR) that is expressed in parts of the plant spatially distant from the treated site, and induced systemic resistance (ISR), triggered at the root level by certain beneficial microorganisms occurring in the rhizosphere such as plant growth-promoting rhizobacteria (Siah *et al.* 2018). Plant treatments with resistance inducers result in the induction of several defense mechanisms, including the activation of reactive-oxygen species (ROS) metabolism, the synthesis of pathogenesis-related (PR)-proteins and phytoalexin and the induction of phenylpropanoid and/or octadecanoid pathways (Garcion *et al.* 2014).

The resistance inducer probenazole (3-allyloxy-1,2-benzisothiazole-1,1-oxide) is a very known activator of SAR; it has been shown to confer protection in several plants, including rice and tobacco (*e.g.* Iwata 2001; Yoshioka *et al.* 2001; Nakashita *et al.* 2002). Probenazole is the active ingredient of Oryzmate[®], a resistance inducer developed by Meiji Holdings, CO., Ltd. (Japan) for the control of rice blast. Saccharin (2,3-dihydro-3-oxobenzoisulfonazole) is one of the metabolites of probenazole (Uchiyama *et al.* 1973) and is the oldest and the most common

synthetic sweetener (Geana et al. 2012). Like probenazole, saccharin has also been reported as an inducer of systemic resistance in several plants such as tobacco, cucumber, bean (Siegrist et al. 1998), barley (Boyle and Walters 2005a) and soybean (Srivastava et al. 2011).

Even though saccharin has already been tested on a broad spectrum of pathosystems, it has never been investigated on wheat against *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of Septori tritici blotch, despite the strong economic importance of this pathogen. In France, wheat represents the most widely cultivated crop (Hossard et al. 2014), with 54% of total occupied surfaces (Agreste 2016). *Z. tritici* is the most frequently occurring and one of the most economically damaging pathogen on wheat crops in Europe and several other areas around the world (Jørgensen et al. 2014). Severe disease epidemics may lead to more than 50 % of yield losses (Ponomarenko et al. 2011). Nowadays, there is no completely resistant wheat cultivar and the control of the disease relies mainly on the use of conventional fungicides. Meanwhile, the durability of this control strategy is compromised in the field because *Z. tritici* displays a high capacity of adaptation and often succeeds in developing new resistances to fungicides and the overcoming of the resistances of its host (Cowger et al. 2000; Cheval et al. 2017). Hence, the aim of the present study was to examine the protection efficacy of saccharin when tested as a preventive treatment on wheat against *Z. tritici*. Furthermore, the mode of action of saccharin was investigated by assessing its direct antifungal activity toward *Z. tritici* using both *in vitro* and *in planta* bioassays, and by monitoring, during the early stages of treatment and infection, the relative expression of four genes involved in various defense pathways.

Materials and methods

Plant growth, treatment and inoculation

Grains of the susceptible wheat cultivar Alixan (Limagrain) were pre-germinated in Petri dishes (12 x 12 cm) on moist filter paper and sprouted grains were placed into three-liter pots filled with universal loam (Gamm Vert, France). Replicates of three pots with 12 grains were used for each condition and two repetitions were done separately in time. Experiments were performed under semi controlled conditions at 18 °C ($\pm$ 2 °C) with a day-night cycle of 16/8 h and supplementary lighting. When the third leaf of the plants was fully expanded, exogenous treatments were applied using a manual hand sprayer. In all experiments, saccharin was first dissolved in 1% ethanol (v/v) of final distilled water volume. Each pot containing 12 plants received 30 mL of saccharin solution at 15 mM amended with 0.15% (Cantor[®], Grandes Cultures, Jouffray Drillaud, France) as a wetting agent. Control plants were sprayed with distilled water

alone or amended with 0.15% Cantor[®] (v/v) and 1% ethanol (v/v). Two days after treatments, plants were inoculated by spraying a spore suspension at 10^6 spores.mL⁻¹ distilled water amended with 0.05 % polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20, Sigma Aldrich, USA). Spore suspensions were produced on *potato* dextrose agar (PDA) medium according to Siah et al. (2010a), using the *Z. tritici* strain T02596 isolated in 2014 from Northern France and selected for its pathogenicity in preliminary experiments. Immediately after inoculation, each pot was covered with a clear polyethylene bag for three days in order to ensure a water-saturated atmosphere required for a good fungal spore germination. Disease severity was scored 21 days post-inoculation (dpi) by assessing the percentage of the third leaf area covered by lesions (chlorosis or necrosis) bearing pycnidia.

***In vitro* antifungal assay**

Direct antifungal effect of saccharin was assessed in clear and sterile flat-bottomed polystyrene microplates (Iwaki, Asahi techno glass, Japan), according to Siah et al. (2010b). Plate wells were filled with 150 µL of liquid glucose peptone medium (14.3 g L⁻¹ dextrose (VWR), 7.1 g L⁻¹ bactopectone (Difco laboratories) and 1.4 g L⁻¹ yeast extract (Merck)) amended with saccharin at 15 mM (final concentrations in 200 µL of medium)]. Aliquots of 50 µL containing 2.10^5 spores mL⁻¹ of the *Z. tritici* strain T02596 were added to each well. Eight wells were used as replicates for each condition. Inoculated and non-inoculated medium without saccharin were used as experimental controls. The plate was incubated for six days at 20°C in the dark while being shaken at 140 rpm. Fungal growth was measured using a plate reader (MRX, Dynex technologies) at 405 nm. For the wetting agent Cantor[®], direct antifungal activity was assessed on PDA medium according to (Siah et al. 2010b), since this product alone strongly influenced the optical density when compared to control medium during microplate reading. Cantor[®] was added to PDA medium at 50 °C after autoclaving at the same concentration used in the greenhouse (0.15%), corresponding to the field approved concentration. Aliquots of 5µL of 5.10^5 spores mL⁻¹ were spotted on the PDA plates. Five Petri dishes with one spot on each were used as replicates. After incubation for 10 days at 20°C in the dark, the colony perpendicular diameters were measured for each spot and compared to spots developed on control medium.

***In planta* cytological assay**

The assessment of spore germination and epiphytic hyphal growth was performed using Fluorescence Brightener 28 (Calcofluor, Sigma Aldrich). Three third-leaf segments (4 cm) from different plants and different pots were used as replicates for each condition. Segments were collected 1 and 5 days post inoculation (dpi) from control plants, plants treated with saccharin

and plants treated with Cantor[®]. Segments were colored and prepared as mentioned by Mejri *et al.* (2017) and were observed microscopically (Nikon, Eclipse 80i) under UV illumination. Observations were made on 100 different and randomly observed fungal spores on each leaf segment. The effect of saccharin on spore germination was measured at 1 dpi by scoring the percentage of germinated spores. The effect of saccharin on hyphal growth was assessed at 5 dpi by noting four classes of fungal germination events: class 1, non-germinated spore; class 2, germinated spore with small germ tube; class 3, germinated spore with developed germ tube; class 4, germinated spore with extensively developed epiphytic hyphae.

Plant RNA extraction

To examine the plant gene expression, leaf samples were collected at 2, 3, 4 and 7 (dpt) for both inoculated (i) and non-inoculated (ni) conditions, immediately wrapped in aluminum foil, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen and total RNA was extracted from 100 mg of leaves tissues using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, The Netherlands). Genomic DNA contaminating the samples was removed using RNase-Free DNase Set (Qiagen, The Netherlands). The obtained RNA was suspended in 60 µL of RNase-free water and quantified by measuring the absorbance at 260 nm (Eppendorf AG, BioPhotometer). Three third leaves from different pots were used as independent biological replicates for each condition.

Real-time reverse-transcription Polymerase chain reaction analysis of gene expression

The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) was used to insure reverse transcription of obtained RNA according to the manufacturer's protocol. The PCR reactions were conducted on subsequent obtained cDNA to amplify four wheat genes, encoding for lipoxygenase (LOX) involved in the octadecanoid pathway, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) involved in the phenylpropanoid pathway, peroxidase (POX2) in the reactive oxygen species (ROS) metabolism and the pathogenesis-related protein 1 (PR1). Actin (ACT) and β -tubulin (TUB) encoding genes were used as housekeeping genes after preliminary assays performed on different samples. Primer efficiencies were calculated by performing real-time PCR on several dilutions of cDNA samples corresponding to different conditions (Table 1). Reactions were carried out in real-time PCR detector C1000T (Bio-Rad) using the following thermal profile: 3:10 min at 95° (denaturation) and 30s at 60° (annealing/extension) for 39 cycles. Melting curve assays were performed from 65 to 95°C and 0.5°C/s and melting peaks were visualized to check the specificity of each amplification.

Table 1 Primers used in quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) studies

gene	Primer sequences 5'-3'	Accession numbers	Efficacy/template
<i>ACT</i> (<i>actin, housekeeping gene</i>)	AACCTTCAGTTGCCCAGCAA TGTTCGACCGCTGGCATA	AB181991	98.9 %
<i>TUB</i> (<i>beta tubulin, housekeeping gene</i>)	GGAGTACCCTGACCGAATGATG AACGACGGTGTCTGAGACCTTT	U76895	104.3 %
<i>LOX</i> (<i>lipxygenase</i>)	GGGCACCAAGGAGTACAAGGA GCTCGTGATGGTGTGGATGA	U32428	103.7 %
<i>PAL</i> (<i>phenylalanine ammonia lyase</i>)	CCCCCATTGGTGTCTCCAT ACTGCGCGAACATCAGCTT	AY005474	102.9 %
<i>POX2</i> (<i>peroxidase</i>)	AGCCACAGCCACAACCAGATA AGAAATGCGAGAGGCAGAACC	X85228	102.3 %
<i>PR1</i> (<i>pathogenesis related</i>)	CATGCACCTTCGTATGCCTAACT TGGCTTATTACGGCATTTCCTT	HQ541964	105 %

Results correspond to the means of at least two leaves sampled under the same condition and expressed relatively to the control for which the expression value was fixed at 1. Two controls were considered: (i) non-treated non-inoculated control for treated non-inoculated as well as non-treated inoculated conditions, and (ii) non-treated inoculated control for treated inoculated conditions. The analyzed genes were considered significantly down- or up-regulated compared to controls when changes in their expression was $<0.5x$ or $>2x$, respectively.

Data analyses

Comparisons between percentage of disease severity, *in vitro* fungal growth, *in planta* spore germination and *in planta* hyphal growth were carried out with the Tukey test at a significance level of $P = 0.05$ using the XLSTAT software (Addinsoft, France). For gene expression, the relative levels of expression were determined using the CFX96 Touch software. The obtained results represent the relative expression of treated plants inoculated or not compared to the non-treated non-inoculated and non-treated inoculated controls for each date.

Results

Treatment with saccharin protects wheat against *Z. tritici*

Foliar treatment of the susceptible wheat cultivar Alixan with 15 mM saccharin using Cantor[®] as a wetting agent, two days before inoculation with the pathogenic *Z. tritici* strain T02596, was performed in the greenhouse in order to evaluate the protection efficacy of this molecule. A high level of disease severity (55.6 % of diseased leaf area) was scored at 21 dpi on non-treated inoculated control plants. Plants treated with Cantor[®] alone did not exhibit any significant difference when compared to control plants treated with water alone (Fig. 1). However, a

significant reduction of disease severity was recorded on plants treated with saccharin, with a protection level that reached 77 % reduction when compared to control plants. Saccharin-treated plants did not display any impact on their vigor when compared to control plants (Fig. 1).

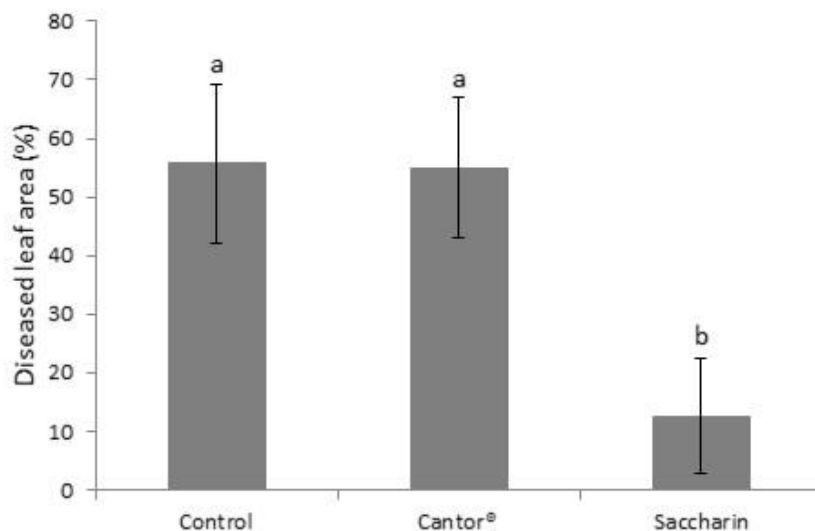


Fig. 1 Disease severity level on plants of the wheat cultivar Alixan treated or not with 15 mM saccharin 2 days before challenge inoculation with the pathogenic *Zymoseptoria tritici* strain T02596. Cantor® used as wetting agent at the approved field dose (0.15%) was tested as an independent treatment. Disease symptoms were recorded 21 days post-inoculation by scoring the percentage of the third leaf area covered with lesions bearing pycnidia. Means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

Saccharin did not affect directly *Z. tritici*, neither *in vitro* nor *in planta*

The concentration of saccharin (15mM) tested in protection assays, as well as the approved field concentration of the wetting agent Cantor® (0.15%) were examined for their direct antifungal effect against *Z. tritici*. *In vitro* notations revealed no direct effect of saccharin on *Z. tritici* development at the tested concentration. Likewise, the wetting agent, Cantor® did not exhibit any direct biocide effect towards *Z. tritici*. On the contrary, Cantor® slightly enhanced the sizes of fungal *in vitro* colonies, due to its wetting effect (*data not shown*). *In planta* microscopic notations performed on the surface of wheat leaves showed that at 1 dpi, 73% of spores were germinated in non-treated and inoculated control plants and both saccharin and Cantor® did not reduce the rate of germinated spores (Table 2).

Table 2 Rates of germinated spores at 1 day after inoculation in plants of the cultivar Alixan treated or not with Cantor® (0.15%) or saccharin (15 mM) and inoculated with the *Zymoseptoria tritici* strain T02596.

Treatments	Rate of germinated spores (%)
Control	73 a
Cantor®	80 a
Saccharin	82 a

Means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

At 5 dpi, fungal germ tubes were randomly oriented on the leaf surface without specific positioning towards stomata and no chemotropism or thigmotropism could be noticed (*data not shown*). No significant differences in the patterns of epiphytic hyphal growth were highlighted on the leaves treated with saccharin and Cantor® when compared to non-treated inoculated control plants (Fig. 2).

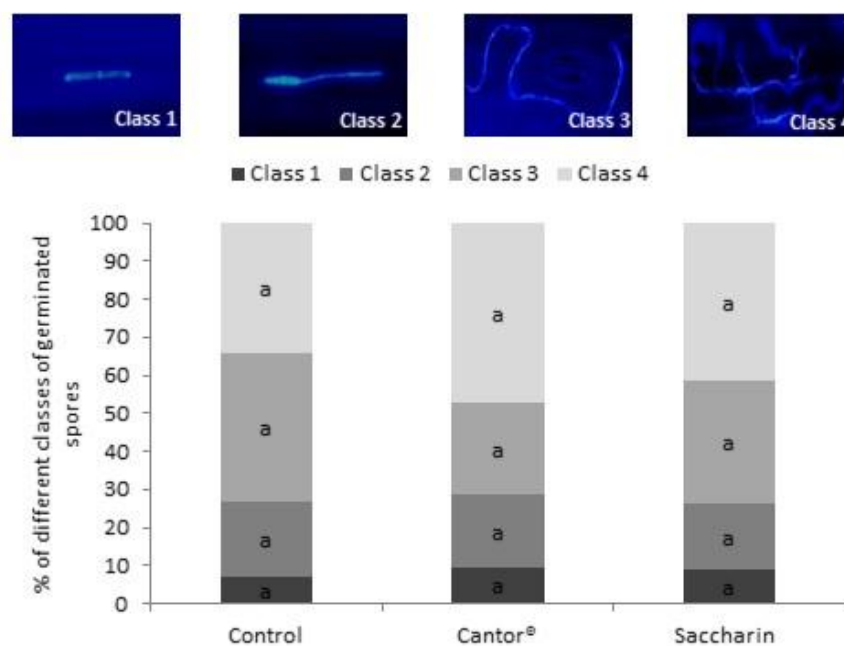


Fig 2. *In planta* effect of saccharin and Cantor® treatments on epiphytic hyphal growth of the *Zymoseptoria tritici* strain T02596 within the leaves of the wheat cultivar Alixan. Four different classes of Calcofluor-stained germinated spores were assessed five days post-inoculation from 100 different spores on each leaf segment for each condition. Class 1, non-germinated spores; Class 2, germinated spores with small germ tube; class 3, germinated spores with developed germ tube and class 4, germinated spores with a strongly developed germ tube. Within each class, bars with common letters are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

Saccharin elicits and primes defenses in wheat leaves against *Z. tritici*

The expression time course of LOX-, PAL-, POX2- and PR1-encoding genes was examined using quantitative RT-qPCR in treated (t) and non-treated (nt) plants in both non-inoculated (ni) and inoculated (i) conditions and was normalized to the ACT and TUB gene expression. In (ni) conditions, marked changes in the expression profiles of *LOX*, *POX2* and *PR1* were observed in saccharin (t, ni) plants when compared to reference (nt, ni) control, while no change was recorded in *PAL* expression at all tested time-points (Fig. 3A). For the *LOX* gene, the expression level was about 32-, 110-, 180- and 24-folds, up-regulated at 2, 3, 4 and 7 dpt, respectively. *POX2* and *PR1* were 0.3- and 0.07-folds down-regulated, respectively, at 2 dpt, while both genes were up-regulated at the following sampled dates. *PR1* was highly up-regulated at 7 dpt, with 296-fold. For Cantor® (t, ni) plants, slight changes in gene expression patterns were observed at all sampled dates, characterized mainly by down-regulations (Fig. 3A).

The specific effect of inoculation in (nt) control plants was also assessed in order to highlight the way by which the fungus alone influences the investigated gene expression (Fig. 3B). The (nt, i) plants showed a down-regulation of *LOX* expression at 3 and 7 dpt, corresponding to 1 and 5 dpi, while no change in this gene expression was scored at 4 dpt when compared to (nt, ni) control plants. *POX2* was 115-, 42- and 21-folds up-regulated at 3, 4 and 7 dpt, respectively. *PR1* was also up-regulated at different time-points with 6-, 19- and 11-folds at 3, 4 and 7 dpt, respectively (Fig. 3B).

Finally, in order to investigate a possible priming effect of saccharin treatment, we performed a comparison between (t, i) plants and (nt, i) plants and results showed marked changes mainly in the expression profiles of *LOX* and *PR1* genes. *LOX* was up-regulated at all time-points and the highest expression was scored at 7dpt, with 1583-fold. *PR1* was 2- and 72- folds up-regulated at 4 and 7 dpt, respectively. *POX2* expression remained unchanged when compared to (i) control at all sampled dates, while a slight up-regulation of 3-fold was observed at 4 dpt for the *PAL* gene expression (Fig. 3C).

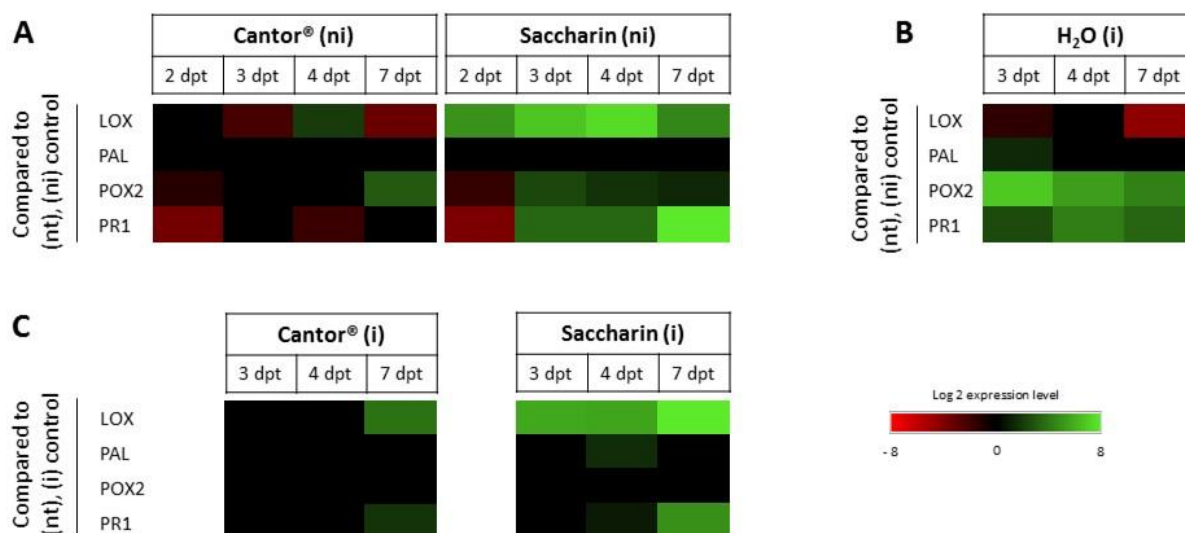


Fig 3. Relative expression of four selected defense-related genes in the leaves treated or not with saccharin and Cantor® and inoculated or not with *Z. tritici* pathogenic strain T02596. (A) Saccharin and Cantor® treated non-inoculated (t, ni) plants compared to water treated non inoculated control (nt, ni). (B) Water treated and inoculated (nt, i) plants compared to water treated non inoculated control (nt, ni); and (C) saccharin and Cantor® treated and inoculated plants (t, i) compared to water treated inoculated control (nt, i). The color scale represents the log₂ values of different relative genes' expressions; in black no changes in gene expression compared to control, over-expression >2x appear in shades of green while down-expression <0.5x is presented with shades of red.

Discussion

The current controversy on the wide use of conventional pesticides and the frequent adaptation of pathogens to control strategies requires the identification of new eco-friendly and sustainable control tools. Plant resistance inducers are considered as one of the most promising alternatives satisfying such requirements. Our findings showed that saccharin, when applied as a preventive foliar treatment on wheat, significantly reduce the disease severity caused by *Z. tritici* (more than 70 % disease reduction). Saccharin was previously shown to induce resistance in several plants against pathogens. For instance, an application of 3 mM saccharin by painting the molecule solution on to first leaves or as soil drench under semi-controlled conditions allowed significant protection of bean against *Uromyces viciae-fabae*, although percentages of protection were not mentioned by the authors (Boyle and Walters 2005a). Identical treatment applied on barley against *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* allowed up to 88% disease suppression (Boyle and Walters 2005b). Similarly, saccharin spraying (0.24 mg mL⁻¹) on bean conferred significant protection against *Uromyces appendiculatus* in both greenhouse and

outdoor experiments, where disease reduction reached 70 and 85%, respectively (Delgado et al. 2013). Srivastava et al. (2011) also tested the effect of 3 mM saccharin as foliar treatment or as root drench on soybean against *Phakopsora pachyrhizi* and found that the mode and the stage of application were two important factors influencing the efficacy of the molecule. On the other hand, probenazole, which is the precursor of saccharin, has also been reported to confer protection in plants against pathogen attacks. For example, probenazole has been shown to protect rice against *Magnaporthe oryzae* through the triggering of host defense mechanisms (Iwata 2001; Schreiber and Desveaux, 2008). Application of probenazole on rice increase the activities of defense-related enzymes, such as POX, polyphenol oxidase, PAL, tyrosine ammonia-lyase and catechol-O-methyltransferase, and enhances the accumulation of salicylic acid and PR-proteins (Midoh and Iwata 1996; Iwata 2001; Iwai et al. 2007). The involvement of salicylic acid in the expression of resistance induced by probenazole has also been demonstrated in *Arabidopsis thaliana* plants infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* or *Peronospora parasitica* (Yoshioka et al. 2001).

The protective effect of saccharin highlighted here in wheat against *Z. tritici* likely results from an activation of host defense mechanisms rather than from a direct antifungal activity, as demonstrated in both *in vitro* and *in planta* assays. The ability of saccharin to induce resistance in plants has been previously reported using biochemical markers. Indeed, treatment of barley with saccharin primed cinnamyl alcohol dehydrogenase and peroxidase activities in response to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* infection, while PAL activity was reduced in treated inoculated plants (Boyle and Walters 2005a). Here, we revealed using molecular markers that saccharin induces and primes the expression of defense-related genes in plants. Our results showed that *LOX* gene is the most responsive gene during the protection observed in wheat against *Z. tritici*. The expression of this gene was interestingly high in saccharin (t, ni) or (t, i) plants when compared to (nt, ni) or (nt, i) controls, respectively. Many studies showed the role of LOX during plant-pathogen interactions. For instance, Ray et al. (2003) showed that the level of *LOX* transcription reached its maximum for both susceptible and resistant wheat cultivars at 3 hours after inoculation with *Z. tritici*, and that an important decrease in the expression level starts at 6 hai. Since the level of transcription within the susceptible cultivar is higher, the authors suggested that *LOX* gene may be an important factor for the colonization and settlement of the fungus and that the rapid down-regulation of *LOX* gene appears to be related to the pathogen and typical of the resistant cultivars. Our findings showed that the *LOX* expression was down-regulated in (nt, i) plants and in Cantor® (ni) plants at 1 and 5 dpi (i.e. 3

and 7 dpt), while strong upregulations of this gene were observed at different time points for saccharin (t) plants in both (i) and (ni) conditions (Fig. 3). These later findings clearly show that saccharin primes *LOX* gene in wheat and suggest that its early priming leads to a significant protection of the plant against fungal infection. However, late priming (7 dpt, *i.e.* 5 dpi) of the *LOX* gene, for instance by Cantor[®], seem to result in no protection against *Z. tritici*. Randoux *et al.* (2006) and Renard-Merlier *et al.* (2007) showed that exogenous treatment of susceptible wheat cultivars with elicitors (heptanoyl salicylic acid and Milsana[®]) up-regulated *LOX* activity and induced resistance to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, thus, agreeing our findings.

We did not observe any modification in *PAL* expression in all tested conditions and at all investigated time points, suggesting that *PAL*-mediated pathway, involving salicylic acid, did not play a key role in the saccharin-induced resistance. Shetty *et al.* (2009) established that *PAL* gene expression is not involved in wheat-*Z. tritici* interaction and that there were no expression level differences in susceptible and resistant wheat cultivars infected with *Z. tritici*, although Adhikari *et al.* (2007) recorded an induction of *PAL* gene expression in resistant wheat cultivars between 3 and 6 hours post inoculation. Boyle and Walters (2005a) found that saccharin treatments did not increase *PAL* activity in treated non-inoculated barley, while the inoculation significantly reduced *PAL* activity 14 days post treatment.

We found that in (ni) conditions, *POX* gene expression was down-regulated by saccharin treatment at 2 dpt before being 5-fold up-regulated by 3 dpt. A late up regulation of this gene (7 dpt) was also observed in Cantor[®] (t, ni) plants. In (i) conditions, in absence of treatments, an important up-regulation of *POX* gene was observed at all tested time points, with a maximum of 115-fold at 3 dpt (*i.e.* 1 dpi). Interestingly, there was no difference at all in *POX2* gene expression, between (t, i) plants and (nt, i) control. Taken together, these findings suggest that saccharin elicits but does not prime *POX2* expression in wheat against *Z. tritici*. The only factor influencing *POX2* expression in (i) conditions seem to be fungal infection. Indeed, *POX* has been associated to innate resistance against *Z. tritici* when Shetty *et al.* (2003) reported that resistant wheat cultivars accumulate *POX* transcripts and had an important *POX* activity compared to susceptible cultivars when inoculated with *Z. tritici*.

Regarding *PR1*, we found that the expression of this gene in saccharin (t, ni) plants compared to (nt, ni) control was down-regulated at 2 dpt to be later up-regulated during the following time points. When treated plants are inoculated and compared to (nt, i) control, there was no modification in the *PR1* expression profile at 3 dpt (*i.e.* 1dpi), while up-regulations of 2- and 72- folds were observed at 4 and 7 dpt (2 and 5 dpi), respectively. *PR1* gene is known to be a

SA-dependent gene, induced in response to variety of pathogens attacks, and to be a molecular marker of plant SAR (Ryals *et al.* 1996).

In conclusion, the present study reports for the first time the potential of saccharin to confer strong protection in wheat against *Z. tritici* (up to 77 % disease reduction), hence providing new insights into the development of new elicitors for the management of this pathogen. *In vitro* and *in planta* assays confirmed that the protection conferred by saccharin is due to a host resistance induction rather than to a direct antifungal effect. Indeed, gene expression assay revealed that saccharin both elicit and primes defense reactions in wheat following foliar treatment. Among the investigated genes, involved in different defense pathways, *LOX* gene seemed to be the most involved in the resistance induced by saccharin in wheat against *Z. tritici*, suggesting a possible involvement of jasmonic acid pathway in the resistance induced by this molecule in wheat. However, additional experiments are required to decipher the defense pathways induced and primed by saccharin in the case of the wheat-*Z. tritici* pathosystem.

Acknowledgements

This research was conducted in the framework of the Optistim project, founded by the “Matériaux Verts Fonctionnels” program, Yncréa Hauts-de-France, and the Alibiotech project, founded by the European Union, the French State and the French Region of Hauts-de-France.

References

- Adhikari TB, Balaji B, Breeden J, Goodwin SB, (2007) Resistance to wheat *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 55–68.
- Agreste, (2016) Produits agroalimentaires : Céréales commerce mondial (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Gaf16p120-131.pdf>) Accessed 20/02/2018.
- Berny P. Pesticides and the intoxication of wild animals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2007;30:93–100.
- Boyle C, Walters D, (2005a) Induction of systemic protection against rust infection in broad bean by saccharin: effects on plant growth and development. *New Phytologist* 167: 607–612
- Boyle C, Walters DR, (2005b) Saccharin-induced protection against powdery mildew in barley: Effects on growth and phenylpropanoid metabolism. *Plant Pathology* 55: 82 – 91
- Cheval P, Siah A, Bomble M, et al (2017) Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. *Crop Prot* 92:131–133. [Doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.017](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.017)

Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC, (2000) Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* 49, 445–51.

Delgado DZ, De Freitas MB, Stadnik MJ (2013) Effectiveness of saccharin and ulvan as resistance inducers against rust and angular leaf spot in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Crop Protection* 47: 67-73.

Garcion C, Lamotte O, Cacas JL, Métraux JP (2014) Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: Walters DR, Newton AC, Lyon GD (eds) *Induced resistance for plant defence: A sustainable approach to crop protection*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 106–136

Geana EI, Iordache A-M, Ionete RE (2012) Simultaneous determination of artificial sweeteners in possible counterfeited wines, using high performance liquid chromatography with DAD detection. *Ovidius University Annals of Chemistry Volume* 23, Number 1, pp. 77-81

Hossard L, Philibert A, Bertrand M, Colnenne-David C, Debaeke P, Munier-Jolain N, Jeuffroy H, Richard G, Makowski D (2014) Effects of halving pesticide use on wheat production. *Sci Rep.* 4: 4405.

Iwai T, Seo S, Mitsuhashi I, Ohashi Y (2007) Probenazole-induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe oryzae* in adult rice plants. *Plant Cell Physiol.* 48 915–924

Iwata M (2001) Probenazole – a plant defence activator. *Pesticide Outlook* 12 28–31

Jørgensen LN, Hovmøller MS, Hansen JG, et al (2014) IPM Strategies and Their Dilemmas Including an Introduction to www.eurowheat.org. *Journal of Integrative Agriculture* 13:265–281.

Mejri S, Siah A, Coutte F, Magnin-Robert M, Randoux B, Tisserant B, Krier F, Jacques P, Reignault Ph, Halama P (2017) Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1–12.

Midoh N, Iwata M (1996) Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol.* 37: 9-18.

Nakashita H, Yoshioka K, Yasuda M, Nitta T, Arai Y, Yoshida S, Yamaguchi I (2002) Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61: 197-203.

Oerke EC (2006) Crop Losses to Pests. *Journal of Agricultural Science*, 144: 31-43.

Pimentel D (2005) Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environ. Dev. Sustain.*;7:229–252.

Ponomarenko A, Goodwin SB, Kema GHJ (2011) *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor* doi:10.1094/PHI-I-2011-0407-01.

Randoux B, Renard D, Nowak E, Sanssené J, Courtois J, Durand R, Reignault Ph (2006) Inhibition of *Blumeria Graminis* f. sp. *tritici* germination and partial enhancement of wheat defences by Milsana. *Phytopathology* 96, 1278-1286.

- Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol.* 53: 701-714.
- Renard-Merlier D, Randoux B, Nowak E, Farcy F, Durand R, Reignault Ph (2007) Iodine 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* 68: 1156-1164.
- Ryals J, Neuenschwander U, Willits M, Molina A, Steiner HY, Hunt M (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 8: 1809-1819
- Schreiber KJ, Desveaux D (2008) Message in a bottle: Chemical biology of induced disease resistance in plants. *Plant Pathology Journal* 24: 245-268.
- Shetty NP, Kristensen BK, Newman MA, Møller K, Gregersen PL, Jørgensen HJL. (2003) Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 333–46.
- Shetty NP, Jensen JD, Knudsen A *et al*, (2009) Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60, 4287–300.
- Siah A, Randoux B, Magnin-Robert M, Choma C, Rivière C Halama P, Reignault Ph (2018) Natural agents inducing plant resistance against pests and diseases. In *Natural Antimicrobial Agents, Sustainable Development and Biodiversity series*. Springer, Cham, pp 121–159
- Siah A, Deweer C, Duyme F, *et al* (2010a) 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. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02303.x
- Siah A, Magnin-Robert M, Randoux B, *et al* (2018b) Natural Agents Inducing Plant Resistance Against Pests and Diseases. In: *Natural Antimicrobial Agents*. Springer, Cham, pp 121–159
- Siegrist, J, Miihlenbeck, S, Buchenauer, H, (1998) Cultured parsley cells, a model system for the rapid testing of abiotic and natural substances as inducers of systemic acquired resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 223-238
- Srivastava P, George S, Marois JJ, Wright DL, Walker DR (2011) Saccharin-induced systemic acquired resistance against rust (*Phakopsora pachyrhizi*) infection in soybean: Effects on growth and development. *Crop Protection* 30: 726-732
- Uchiyama M, Abe H, Sato R, Shimura M, Watanabe T (1973) Fate of 3-AllyLOxy-2,3-benzisothiazole 1,1-dioxide (Oryzemat) in rice plants. *Agric. Biol. Chem.* 37: 737-745
- Van der Werf HMG (1999) Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agr. Ecosyst. Environ.* 60:81–96
- Walters DR, Ratsep J, and Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *J. Exp. Bot.* 64:1263-1280
- Yoshioka K, Nakashita H, Klessig DF and Yamaguchi I (2001) Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *Plant J.* 25: 149–157.

Article 2

De nouveaux éliciteurs biosourcés issus de coproduits de la betterave sucrière protègent le blé contre *Zymoseptoria tritici* en induisant les mécanismes de défense de l'hôte

Dans ce travail, nous avons évalué l'efficacité de protection sur blé contre *Z. tritici* de 31 molécules dont l'acide γ -aminobutyrique (GABA), l'acide pyroglutamique (PGA, bio-sourcé à partir de coproduits issus de l'industrie de la betterave sucrière), la molécule M1 (dérivée du PGA) ainsi que 28 molécules fonctionnalisées à partir de M1 en utilisant des procédés de chimie verte. Les traitements foliaires avec le GABA, M1 et 15 des molécules fonctionnalisées ont permis l'obtention de taux de protection significatifs, allant jusqu'à 63%. Les tests *in vitro* réalisés sur l'ensemble des molécules ont prouvé l'absence de toute activité directe vis-à-vis du pathogène. Une étude de la relation structure-activité avec les différentes molécules a démontré l'importance de tous les groupements chimiques constituant la molécule M1 et leur implication dans la protection observée. Des essais supplémentaires *in planta* ont confirmé l'absence d'effet direct de M1, M2 et GABA sur le développement de *Z. tritici*, ni sur la germination des spores, ni sur la croissance mycélienne. Ces résultats qui concordent avec ceux obtenus *in vitro* confirment donc que la protection observée est due exclusivement à l'activation des défenses naturelles de l'hôte. L'étude de l'expression relative de quatre gènes impliqués dans les réactions de défense du blé, *LOX* (lipoxygénase), *PAL* (phénylalanine ammonia-lyase), *POX2* (peroxydase) et *PR1* (protéine 1 liée à la pathogénèse), a été réalisée sur les plantes traitées par M1, M2 et GABA à différentes dates après traitement en conditions infectieuses et non infectieuses. Les résultats ont révélé que les trois molécules induisent de façon variable l'expression relative de ces gènes. Cette étude met en évidence une nouvelle famille d'éliciteurs bio-sourcés capables d'induire les réactions de défense chez le blé contre *Z. tritici*, fournissant ainsi une nouvelle source de molécules pour le contrôle durable de ce pathogène.

New elicitors bio-sourced from sugar beet by-products induce resistance in wheat against *Zymoseptoria tritici*

Samara Mejri¹, Alina Ghinet^{2,3,4}, Maryline Magnin-Robert⁵, Béatrice Randoux⁵, Cristina Abuhaie^{2,3}, Benoit Tisserant⁵, Benoit Rigo^{2,3}, Patrice Halama¹, Philippe Reignault⁵ and Ali Siah¹

¹ Institut Charles Viollette (ICV, EA 7394), SFR Condorcet FR CNRS 3417, Institut Supérieur d'Agriculture, Yncréa Hauts-de-France, 48, bd Vauban, BP 41290, F-59014 Lille cedex, France

² Lille Inflammation Research International Center (LIRIC, Inserm U995), Université de Lille, CHRU de Lille, Faculté de médecine - Pôle recherche, Place Verdun, F-59045 Lille cedex, France

³ Laboratoire de chimie durable et santé, Hautes Etudes d'Ingénieur, Yncréa Hauts-de-France, 13, rue de Toul, F-59046 Lille cedex, France

⁴ Faculty of Chemistry, University of Iasi, Bd. Carol I, nr. 11, 700506 Iasi, Romania

⁵ Univ. Littoral Côte d'Opale, UCEIV - EA 4492, SFR Condorcet FR CNRS 3417, CS 80699, F-62228, Calais cedex, France.

Corresponding author: Ali Siah (ali.siah@yncrea.fr ; +33 3 28 38 48 48).

Abstract

The current controversy on the wide use of conventional fungicides and the frequent adaptation of pathogens to control strategies requires the discovery of new eco-friendly and sustainable control tools. Elicitors are considered as one of the most promising alternatives satisfying such requirements. Here, we assessed a set of 31 molecules, including γ -aminobutyric acid (GABA), pyroglutamic acid (PGA, bio-sourced from sugar beet byproducts), M1 (derived from PGA) and 28 other molecules functionalized from M1 using green chemistry, for their protection efficacy on wheat against *Z. tritici*, the major disease on this crop as well as their mode of action. Foliar application of these molecules provided significant protection rates (up to 63 % disease severity reduction) obtained with GABA, M1 and 15 molecules functionalized from M1. An investigation of structure-activity relationship highlighted the importance of all chemical groups of the pharmacophore of M1 in the activity obtained with these molecules. *In vitro* bioassays revealed that they did not exhibit any direct activity towards the pathogen, indicating that the protection efficacy conferred by these molecules is therefore due to host defense activation. Further characterizations of the most efficient molecules M1, M2 and GABA confirmed this finding and revealed that these three molecules up-regulate with various patterns and at the early stages after treatment and infection, the expression of genes encoding for LOX (lipoxygenase), PAL (phenylalanine ammonia-lyase), POX (peroxidase) and PR1 (pathogenesis-related protein 1). Additional *in planta* assays confirmed that M1, M2 and GABA did not display any *in planta* direct effect, thus agreeing *in vitro* findings. This study reports a new family of bio-sourced elicitors inducing resistance in wheat against *Z. tritici*, hence providing new insights into the sustainable control of this pathogen.

Key words: Elicitors, green chemistry, byproducts, wheat, *Zymoseptoria tritici*

Introduction

Septoria tritici blotch (STB) caused by the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* is one of the most challenging diseases on wheat crops. Disease management relies mainly on the use of conventional fungicides, and at lesser extent on resistant cultivars. In the European Union where the climate is suitable for disease development, about 70 % of marketed fungicides target STB (Fones and Gurr 2015), and the cost of fungicide application due to this disease is about 1.2 billion euros in France, Germany and the United Kingdom, considered all together (Torriani et al. 2015). Such chemical inputs are increasingly controversial because of their potential hazardous effects on both the environment and human health. Moreover, their intensive use generated in the field the development of fungicide resistance in several fungal populations around the world, leading to a decrease in their efficacy (Cheval et al. 2017; Heick et al. 2018). This resistance development could be facilitated by the high fitness degree of *Z. tritici*, resulting very likely from its active sexual reproduction and genetic recombination in the field (Siah et al. 2018a). Hence, looking for disease control alternatives such as the use of elicitors, also referred to as resistance inducers, is strongly encouraged in order to promote sustainable agriculture and healthy food.

Elicitors are agents that confer improved protection to plants further pathogen or pest attacks by triggering host plant immunity. The mode of action of these compounds differs from that of traditional fungicides because they do not target directly the bio-aggressor through antifungal activity, but they inhibit its development indirectly *via* the elicitation of plant defense reactions (Siah et al. 2018b). The concept of elicitor dates back to the 1970s, when microbial molecules able to induce in the plant the production of phytoalexins, secondary metabolites with antimicrobial activity, were identified (Keen et al. 1972). The subsequent use of such molecules in practice by the early 1980s led to the emergence of the concept of resistance inducers (Kuc 1982). Elicitors can be released during plant-microbe interactions, and their recognition by the plant is ensured by pattern recognition receptors (PRRs) occurring in the plant cytoplasmic membrane (Nürnberger et al. 2004). Overall, there are three categories of elicitors, considered according to their origin during plant-microbe interactions: (i) pathogen-associated molecular pattern (PAMP) from pathogenic microorganisms, (ii) microbe-associated molecular patterns (MAMPs) from non-pathogenic microorganisms, both considered as exogenous elicitors, and (iii) damage-associated molecular pattern (DAMP) from the plant itself, corresponding to endogenous elicitors (Siah et al. 2018b). Most of commercial elicitors are compounds that mimic such molecules and their application on the plant can activate several defense

mechanisms, including ion fluxes across the plasma membrane, reactive oxygen species (ROS) metabolism, pathogenesis related (PR)-protein and phytoalexin syntheses, and phenylpropanoid and octadecanoid pathways (Henry 2013; Garcion *et al.* 2014). Such defense reactions are effective against a wide range of crop enemies, including viruses, bacteria, fungi, oomycetes, nematodes, and herbivores (Siah *et al.* 2018b).

Elicitors can be of natural or synthetic origin. Natural elicitors include living microorganisms, plant extracts, microbial cell-wall extracts, microbial metabolites, minerals, and ions, while synthetic elicitors include mainly structural or functional analogues of plant hormones (Tayeh *et al.* 2014). One of major limitation for the development of natural elicitors is the availability of resources (raw material) required for the production of quantities of products sufficient for the treatment of large crop surfaces. Food industry by-products could be an environmentally friendly bio-resource for the conception of plant protection compounds, including elicitors. For instance, extracts from grape marc, which is a winemaking by-product, have been demonstrated to induce defense reactions in tobacco, *Arabidopsis*, and tomato (Goupil *et al.* 2012; Benouaret *et al.* 2013). By-products from sugar beet agro-industry, available in great quantities (Heno *et al.* 2017), can also provide biomolecules with high biological activity, but they have never been explored for their potential as a bio-resource for the development of plant protection products. During the process of sugar beet transformation, several by-products are released, including molasses, which represent the syrup (raw juice) obtained from sugar beet roots after sucrose extraction (Tomaszewska *et al.* 2018). Molasses contains around 30% of amino acids, including glutamine and glutamic acid, which represent more than 50% of them (Hippchen *et al.* 1978). Partial decomposition or cyclisation of glutamine leads to the formation of pyroglutamic acid (PGA), also known as pidolic acid or as “the forgotten amino acid” (Harland *et al.* 2008). PGA represents an affordable raw material, deprived of toxicity and consisting of interesting functionalizable units (lactam and carboxylic acid groups), allowing the creation of new bio-sourced molecules. PGA is considered as a physiological moisturizer, and is cited in all cosmetology manuals thanks to its predominant presence in natural moisturizing factors. Numerous proteins carrying PGA at the N-terminus, such as PR proteins, are known for their implication in plant defense reactions (Schilling *et al.* 2007). Nevertheless, the feature of PGA residue for these proteins is not clear.

PGA is a constrained analogue of γ -aminobutyric acid (GABA), a non-proteinogenic amino acid synthesized from L-glutamate in a reaction catalyzed by glutamate decarboxylase (Bown and Shelp 1997). β -aminobutyric acid (BABA), an isomer GABA, is one of the most studied

elicitors and has been shown to induce plant resistance against a wide range of pathogens and pests (Siah et al. 2018b). It is known to possess great potential as a priming agent of defense reactions that are controlled by salicylic acid-dependent and -independent signaling pathways (Ton et al. 2005). Regarding PGA, this molecule and its derivatives have never been explored for their activity of plant protection. On the other hand, there is a lack of discovery for the identification of new elicitors; and regarding *Z. tritici*, only two elicitors (Vacciplant[®], a laminarin extract from the brown algae *Laminaria digitata* marketed by Arysta Lifescience, and Bion[®], Acibenzolar-S-méthyl, a functional analogue of salicylic acid marketed by Syngenta), are available in the market for use against this pathogen. The objective of the present study was thus to identify new elicitors bio-sourced from PGA using green chemistry principles, for the control of *Z. tritici*. After an identification of a molecule (M1, obtained from PGA) with a significant protection efficacy towards the pathogen, a set of 28 other molecules (M2 to M29, functionalized from M1) were obtained and assessed again for their protection efficacy against the parasite. A structure-activity relationship analysis was then undertaken in order to highlight the chemical groups of the molecule responsible for the activity. Furthermore, two molecules with the highest protection efficacy levels (M1 and M2), as well as GABA, were selected and characterized for their modes of action within the plant in order to elucidate defense pathways involved in the observed induced resistance.

Materials and methods

Conception of the molecules

Starting materials used for the conception of the molecules, including L-pyroglutamic acid and 2-oxo-1,3-thiazolidin-4-carboxylic acid (M28), were commercially available and were used without further purification. Melting points were measured on a MPA 100 OptiMelt[®] apparatus and are uncorrected. NMR spectra were acquired at 400 MHz for ¹H NMR and 100 MHz for ¹³C NMR on a Varian MR 400 spectrometer. Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to CDCl₃ (7.26 ppm; 77.1 ppm). Splitting patterns are designed as: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; quint, quintuplet; m, multiplet and sym m, symmetric multiplet. Coupling constants J are reported in hertz (Hz). Thin layer chromatographies were realized on Macherey Nagel silica gel plates with a fluorescent indicator and were visualized with UV-lamp at 254 nm and 366 nm. Column chromatographies were performed using a CombiFlash Rf Companion (Teledyne-Isco System) and RediSep preppacked columns. IR spectra were recorded on a Varian 640-IR FT-IR Spectrometer. Elemental analyses (C, H, N) of new

compounds were determined by “Welience”, Faculté de Sciences Mirande, Université de Bourgogne, Dijon, France. On the other hand, γ -Aminobutyric acid (GABA) used in the present study was commercially available (Sigma-Aldrich, France). Details on the methodology used for the conception of the molecules are presented in supplementary data file.

Plant growth, treatment and inoculation

Grains of the susceptible bread wheat (*Triticum aestivum*) cultivar Alixan (Limagrain, France) were pre-germinated on moist filter paper in Petri dishes (12 x 12 cm) according to Siah *et al.* (2010a), and then transferred into three-liter pots filled with universal loam (Gamm Vert, France). Thirty-six plants (three pots of 12 plants) were used as replicates for each condition, including controls, and all experiments were repeated twice in time. The pots were placed in the greenhouse under semi-controlled conditions at 18 °C ($\pm$ 2 °C) with a day-night cycle of 16/8 h with a supplementary lighting. All molecules (M1 to M29) as well as PGA and GABA were first dissolved in ethanol (1% v/v final concentration) and incubated in a sonicator bath to insure better solubilization, before being mixed with distilled water containing the wetting agent Heliosol® at 0.2% v/v final concentration. For the molecules M1, M2 and GABA, investigated for defense pathways, the wetting agent Heliosol® was replaced by Cantor® at 0.15% v/v final concentration. When the third leaf is fully expanded (fourth leaf is emerging), plants were treated with 5 mM of each molecule using a manual hand sprayer. Two days after treatments, plants were inoculated with *Z. tritici* by spraying a spore suspension at 10^6 spores.mL⁻¹ of the *Z. tritici* pathogenic strain T02596 (isolated in 2014 from northern France), amended with 0.05 % polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20, Sigma Aldrich, USA). Immediately after inoculation, pots were covered with clear polyethylene bags for three days in order to ensure a high hygrometry required for good fungal germination. The disease severity was assessed at 21 days post-inoculation (dpi) only on third leaves by scoring the percentage of diseased leaf area (chlorosis and necrosis) bearing pycnidia.

***In vitro* antifungal activity**

Direct effect of the molecules was assessed in clear and sterile flat-bottomed polystyrene microplates (Iwaki, Asahi techno glass, Japan) with twelve columns of eight wells, according to Siah *et al.* (2010b). Molecules dissolved first in 1% ethanol of final volume were added to the medium at 50°C following autoclaving. Plate wells were each filled with 150 μ L of liquid glucose peptone medium (14.3 g L⁻¹ dextrose (VWR), 7.1 g L⁻¹ bactopectone (Difco

laboratories) and 1.4 g L⁻¹ yeast extract (Merck)) amended with the molecules at 5 mM (final concentration in 200 µL of medium). For each molecule, 16 wells were used, among them, 8 were amended with aliquots of 50 µL suspension containing 2.10⁵ spores mL⁻¹ of the *Z. tritici* strain T02596 and 8 were amended with 50 µL of distilled sterile water. In each microplate, non-inoculated medium without molecules, as well as inoculated medium without molecules, were used as experimental controls. Plates were incubated for 6 days at 20°C in the dark while being shaken at 140 rpm, after which fungal growth was measured using a plate reader (MRX, Dynex technologies) at 405 nm. Since the color of some molecules, including the wetting agents Heliosol® and Cantor®, strongly influenced the optical density, antifungal activity of these compounds was assessed on potato dextrose agar (PDA) medium according to Siah et al. (2010b). The compounds were added to PDA medium at 50 °C after autoclaving at 5 mM for the molecules and at 0.2% and 0.15% for Heliosol® and Cantor®, respectively. Five aliquots of 5 µL of 5.10⁵ spores mL⁻¹ fungal suspension were spotted on the PDA plates and three Petri dishes were used as replicates for each condition. After incubation for 10 days at 20°C in the dark, the colony perpendicular diameters were measured for each spot and compared to spots developed on the control medium.

Epiphytic fungal growth

Fungal growth on leaf surfaces of inoculated plants treated with water alone, water amended with both 1% ethanol and 0.15 % Cantor® or with M1, M2 and GABA molecules was monitored at 1 and 5 dpi using Fluorescence Brightener 28 (Calcofluor, Sigma Aldrich) staining, according to Siah et al. (2010a). Three third-leaf segments (4 cm) were collected from plants of each condition before being stained with a solution of 0.1 % Calcofluor 0.1 M Tris-HCl buffer at pH 8.5 and washed with sterile distilled water. After drying in darkness at laboratory temperature, leaf segments were placed on a glass slide, covered with a cover slip and observed under a microscope with UV illumination (Nikon, Eclipse 80i). The effect of different treatments on hyphal growth was assessed at 1 dpi by determining the percentage of germinated spores, and at 5 dpi by recording four cytological event classes (class 1, non-germinated spore; class 2, geminated spore with minor germ tube; class 3, geminated spore with developed germ tube; class 4, geminated spore with a strongly developed germ tube). Microscopic observations at both 1 and 5 dpi were performed on 100 fungal spores randomly chosen on the leaf segments.

Plant gene expression

The expression of four genes involved in wheat defense mechanisms, including genes encoding for LOX (lipoxygenase), PAL (phenylalanine ammonia-lyase), POX (peroxidase) and PR1 (pathogenesis-related protein 1), was monitored at 2, 3, 4 and 7 days post treatment (dpt) in non-inoculated conditions and at 3, 4 and 7 dpt (corresponding to 1, 2 and 5 dpi) in inoculated conditions, according to Ors *et al.* (2018). ACT (actin) and TUB (β -tubulin) encoding genes were used as housekeeping genes. Leaf samples from plants treated with water alone, water amended with both 1% ethanol and 0.15 % Cantor® or with GABA, M1 and M2 molecules, all inoculated or not with *Z. tritici*, were collected and submitted for RNA extraction using the RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, The Netherlands). Three third leaves from different pots were used as independent biological replicates for each condition. The extraction of total RNA was carried out from 100 mg of plant tissue, and genomic DNA potentially contaminating the samples was removed by treatment with DNase using RNase-Free DNase Set (Quiagen, The Netherlands). The obtained RNA was suspended in 60 μ L of RNase-free water and quantified by measuring the absorbance at 260 nm (Eppendorf AG, BioPhotometer). Reverse transcription of the obtained RNA was performed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol. PCR reactions were undertaken on the subsequent obtained cDNA to amplify the six genes described above. Cycling conditions consisted of a denaturation cycle (95°C for 3:10 min) and an annealing/extension cycle repeated 39 times (30 s at 60°C). Primers efficiencies were calculated for different genes by performing real-time PCR with dilutions series with factor 3 made on cDNA samples from several conditions (Table 1). PCR reactions were performed in duplicates for each sampled third leaf. In non-inoculated conditions, plants non-inoculated and treated with both Cantor® and ethanol were used as control for plants non-inoculated and treated with the molecules. In inoculated conditions, plants non-inoculated and treated with both Cantor® and ethanol were also used as control for plants inoculated and treated with water alone. Plants inoculated and treated with both Cantor® and ethanol were used as control for plants inoculated and treated with the molecules.

Table 1 Primers used in quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) studies

gene	Primer sequences 5'-3'	Accession numbers	Efficacy/template
<i>ACT</i> (actin, housekeeping gene)	AACCTTCAGTTGCCCAGCAA TGTTCCGACCGCTGGCATAAC	AB181991	98.9 %
<i>TUB</i> (beta tubulin, housekeeping gene)	GGAGTACCCTGACCGAATGATG AACGACGGTGTCTGAGACCTTT	U76895	104.3 %
<i>LOX</i> (lipoxygenase)	GGGCACCAAGGAGTACAAGGA GCTCGTGATGGTGTGGATGA	U32428	103.7 %
<i>PAL</i> (phenylalanine ammonia lyase)	CCCCCATTTGGTGTCTCCAT ACTGCGCGAACATCAGCTT	AY005474	102.9 %
<i>POX2</i> (peroxidase)	AGCCACAGCCACAACCAGATA AGAAATGCGAGAGGCAGAACC	X85228	102.3 %
<i>PR1</i> (pathogenesis related)	CATGCACCTTCGTATGCCTAACT TGGCTTATTACGGCATTCTTT	HQ541964	105 %

Data analyses

Comparisons between percentage of disease severity, *in planta* spore germination at 1 dpi and *in planta* hyphal growth at 5 dpi were carried out with the Tukey test at a significance level of $P = 0.05$ using the XLSTAT software (Addinsoft, France). For gene expression analysis, the genes were considered significantly down- or up-regulated compared to controls when changes in their expression was < 0.5 x or > 2 x, respectively. Values of gene expression were converted to Log2 and represented in the form of a heatmap. Shades of blue represent gene down regulations, while the shades of red represent the up-regulation of the genes.

Results

Obtainment of functionalized elicitors

A panel of 29 molecules, including M1 (derived from PGA that was originating from sugar beet molasses) as well as 28 molecules functionalized from M1, were obtained with a methodology based on green chemistry principles (Figure 1). The molecules were obtained using different chemical modifications, including chain extension, ramification, suppression or saponification, ester extension, saponification or replacement, nitrogen replacement, carbon replacement, bulky unit, vinyllogous, enamine, oxime addition, substituent suppression, ring extension, and chain saponification (Figure 2, Table 2). All modifications (functionalization) were done separately on all positions of the main nucleus of M1 (Figure 2), except position 4, because modifications on this position are costly, time consuming and discordant with the green chemistry principles. The made molecules showed different levels of lipophilic (hydrophobic) patterns, as revealed by Log P values (Table 2). LogP, also known as Log Kow, is a measure

of the differential solubility of chemical compounds in two solvents (octanol/water partition coefficient); the more the log P is high, the more the corresponding molecule is lipophilic.

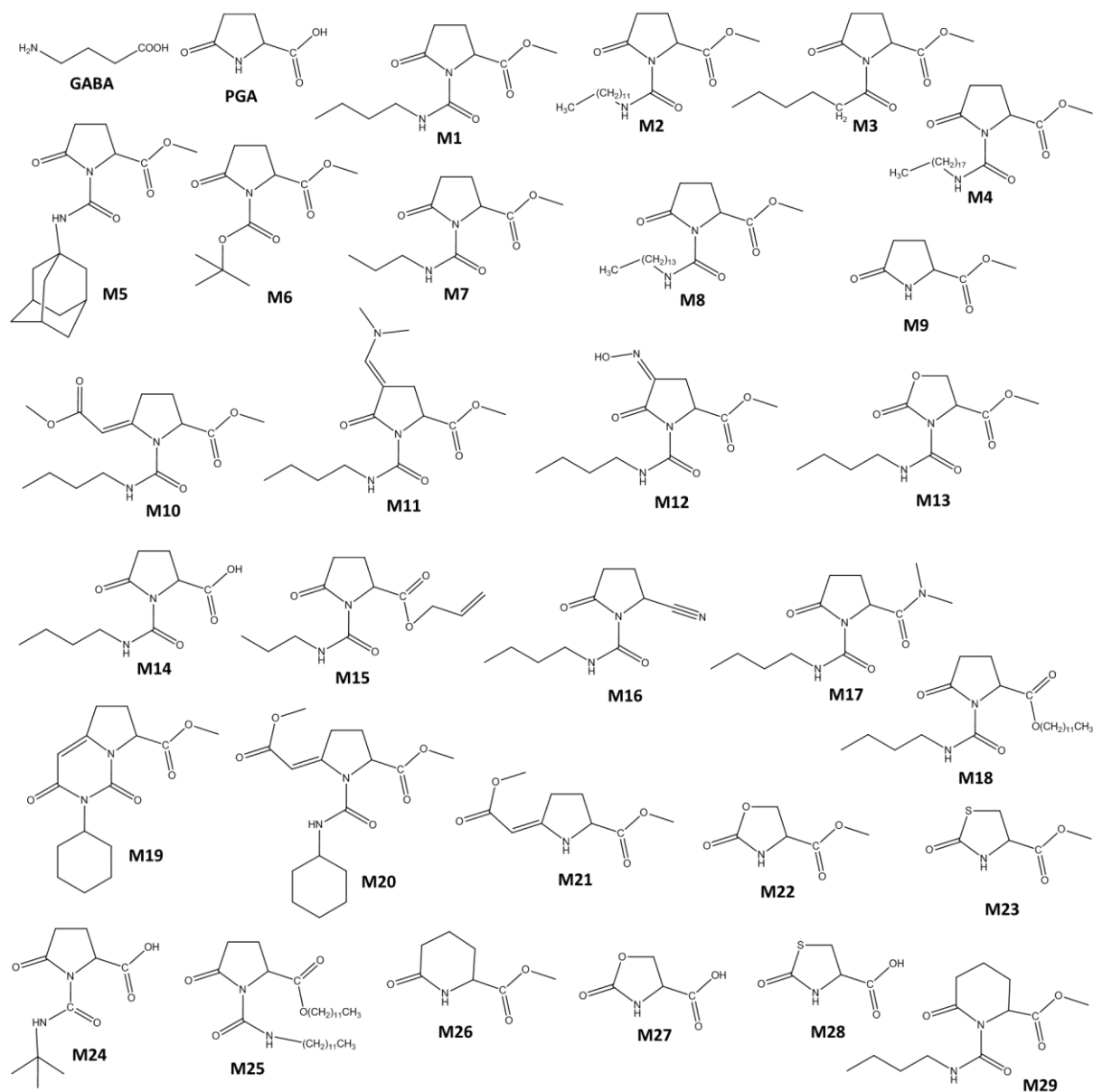


Figure1. Chemical structure of γ -aminobutyric acid (GABA), pyroglutamic acid (PGA), M1 (derived from PGA) and 28 molecules derived from M1.

GABA, M1 and 15 functionalized molecules from M1 protect wheat against *Z. tritici*

GABA, PGA, M1, and 28 molecules functionalized from M1 were tested for their protection efficacy on wheat against *Z. tritici* in semi-controlled conditions (greenhouse). High levels of disease extent were observed on control plants at 21 dpi. Indeed, rates of disease severity

reached 57 % and 55% on inoculated plants treated with water alone or with water supplemented with the wetting agent Heliosol[®], respectively (Table 2). Statistical analyses showed no significant difference among these two controls, indicating that Heliosol[®] did not confer any protection against the pathogen. Likewise, PGA, with 62% of diseased leaf area, did not show any protection against *Z. tritici* (Table 2). However, GABA, M1 and 15 other derived molecules allowed significant disease reductions, ranging from 19% to 63% compared to inoculated non-treated control plants. The thirteen remaining molecules did not display any protection on the corresponding treated plants. M1, M2 and GABA are among the molecules showing the best protective rates against the pathogen (Table 2).

Functionalized molecules did not exhibit any direct antifungal effect

All molecules were assessed *in vitro* for their direct activity towards *Z. tritici*. *In vitro* bioassays performed on microplates and Petri dishes revealed that none of the tested molecules exhibits direct antifungal effect towards *Z. tritici*, since non-significant difference in the rates of fungal growth was observed among treated and non-treated conditions (*data not shown*). Nevertheless, the wetting agent Heliosol[®] completely inhibited the *in vitro* mycelial growth of the fungus at the approved field concentration (0.2%), while the other wetting agent Cantor[®] (used further in the flowing experiments regarding the cytological and molecular investigations) did not show any significant effect on the fungal growth at the approved field concentration (0.15%).

Structure-activity relationship analysis

A structure-activity relationship investigation was performed in order to identify the chemical groups responsible for the activity of the molecule M1. Observations of the protective effects of the molecules (Table 2) and their structural features (summarized in Figure 2 and Table 2) has inferred some regular outlines of structure-activity relationship. Most of the modifications carried out on M1 stabilize, reduce or disappear the activity, except the modification performed in position 1 generating the molecule M2 (carboxylic chain extension to C8) which enhanced the activity from 55% to 63% disease reduction (Table 2, Figure 2). Cyclisation of the carboxylic chain (M5) into a cycle allows the molecule M1 to keep a significant efficacy, while the suppression, shortening or extension of the carboxylic chain, over 12 carbons (molecules M9, M7, M8, and M4), leads to a decrease in the activity. This decline of activity is also observed when the nitrogen group is substituted by a carbon atom in position 1 (M3). A

vinylous addition in position 2 (M10) induces a complete suppression of the activity. All modifications made on position 3, such as the substitution of the carbon by an oxygen, addition of an oxime or an enamine (M13, M12 and M11), lead to a decrease in the activity. Finally, changes made on position 5 confirmed the importance of the methyl ester since saponification, extension, and replacement decreased the activity (M14, M15, and M16) or inhibited it completely (M18). Some modifications were made simultaneously on two or three different positions (Figure 2, Table 2). The molecules modulated on two different positions showed whether a stabilized, reduced (M19, M20, M22, M23 and M24) or completely disappeared activity (M21 and M25). Nevertheless, the molecules modified simultaneously in three different positions (M26, M27, M28 and M29) showed a total disappearance of the activity. In order to examine the effect of the lipophilic properties of the molecules on their activity, a correlative analysis between the logP values of the molecules and their efficacy levels (Table 2) was performed using the Pearson test. Results revealed a lack of correlation between these two parameters ($r = 0.20$, $P\text{-value} = 0.20$), indicating that the lipophilic property did not explain the activity of the molecules.

M1, M2 and GABA confer the best protective rates

As revealed in the *in vitro* bioassay, Heliosol® displays a direct effect on *Z. tritici* development on PDA medium, although this wetting agent did not protect the plants against the disease under greenhouse conditions. Therefore, for the following experiments, Heliosol® was replaced by the other wetting agent Cantor®, deprived of any direct antifungal activity according to the *in vitro* bioassays. Furthermore, an additional experiment in the greenhouse carried out using Cantor® (0.15%) as a wetting agent confirmed that GABA, M1 and M2 significantly reduce disease extent (29%, 27% and 21% of diseased leaf area, respectively) on the plants treated with these molecules, compared to plants treated with water alone (56 % of diseased leaf area) (Figure 3). Disease severity reductions by GABA, M1 and M2 treatments reached 48 %, 52 % and 63 %, respectively. The rank of the molecules according to their protective effect remained unchanged and any discordance was observed compared to the previous assay (Table 2). No significant difference was obtained between the disease extent scored on plants treated with Cantor® (55% of diseased leaf area) and that recorded on control plants treated with water alone (Figure 2).

Table 2. Protection efficacy at 5 mM of γ -aminobutyric acid (GABA), pyroglutamic acid (PGA), M1 (derived from PGA) and 28 molecules functionalized from M1 on bread wheat (cultivar Alixan) against *Zymoseptoria tritici* (strain T02596), and description of the chemical modifications performed on M1 to obtain the functionalized molecules.

Molecule	Modifications compared to M1 ^a	Modified position					Log P ^b	Diseased leaf area (%)	Protection efficacy
		1	2	3	4	5			
Water-treated control								57	0
GABA							-0.64 ± 0.22	31	44
PGA							-2.39 ± 0.27	62	-11
M1		-	-	-	-	-	-0.70 ± 0.62	26	55
M2	C8 chain extension	X	-	-	-	-	+3.55 ± 0.62	21	63
M3	Nitrogen replacement	X	-	-	-	-	+1.71 ± 0.26	34	40
M4	C14 chain extension	X	-	-	-	-	+6.73 ± 0.62	35	39
M5	Bulky unit	X	-	-	-	-	-0.58 ± 0.63	39	31
M6	Chain ramification + Nitrogen replacement	X	-	-	-	-	-0.05 ± 0.60	42	26
M7	C1 chain suppression	X	-	-	-	-	-1.24 ± 0.65	44	23
M8	C10 chain extension	X	-	-	-	-	+4.61 ± 0.62	49	14
M9	Chain suppression	X	-	-	-	-	-1.92 ± 0.28	61	-8
M10	Vinylogous	-	X	-	-	-	+0.70 ± 0.61	56	1
M11	Enamine	-	-	X	-	-	+0.94 ± 0.65	38	33
M12	Oxime addition	-	-	X	-	-	-0.38 ± 0.66	47	17
M13	C replacement	-	-	X	-	-	-0.20 ± 0.65	50	12
M14	Ester saponification	-	-	-	-	X	-1.24 ± 0.62	33	41
M15	C2 ester chain extension	-	-	-	-	X	+0.16 ± 0.63	36	36
M16	Ester replacement	-	-	-	-	X	-1.03 ± 0.62	39	30

M17	Ester replacement	-	-	-	-	X	-1.63 ± 0.63	49	13
M18	C11 ester chain extension	-	-	-	-	X	+5.14 ± 0.62	58	-1
M19	Bulky (1) + vinylogous (2)	X	X	-	-	-	+2.62 ± 0.40	31	44
M20	Bulky (1) + vinylogous (2)	X	X	-	-	-	-1.63 ± 0.63	37	35
M21	Chain suppression (1) + vinylogous (2)	X	X	-	-	-	-0.06 ± 0.29	46	18
M22	Chain suppression (1) + C replacement (3)	X	-	X	-	-	-0.33 ± 0.31	41	28
M23	Chain suppression (1) + C replacement (3)	X	-	X	-	-	-0.65 ± 0.71	46	19
M24	Chain ramification (1) +Ester saponification (5)	X	-	-	-	X	-1.53 ± 0.62	39	31
M25	C8 chain (1) + C11 ester chain extensions (5)	X	-	-	-	X	+9.39 ± 0.62	48	16
M26	Suppression of the substituent (1)+ 1 C ring extension (3 + 4)	X	-	X	X	-	-1.36 ± 0.28	51	11
M27	Chain suppression (1) + C replacement (2) + Saponification (3)	X	-	X	-	X	-0.79 ± 0.30	48	16
M28	Chain suppression (1) + C replacement (2) + Saponification (3)	X	-	X	-	X	-1.11 ± 0.71	63	-12
M29	C1 ring extension (3 + 4)	-	-	X	X	-	-0.14 ± 0.62	57	-1

^a When more than one modification were performed, their positions on M1 are mentioned between brackets

^b Calculated with ACD/Log P software.

Diseased leaf area and protection values highlighted in bold are significantly different from the water-treated control according to the Tukey test at $P = 0.05$.

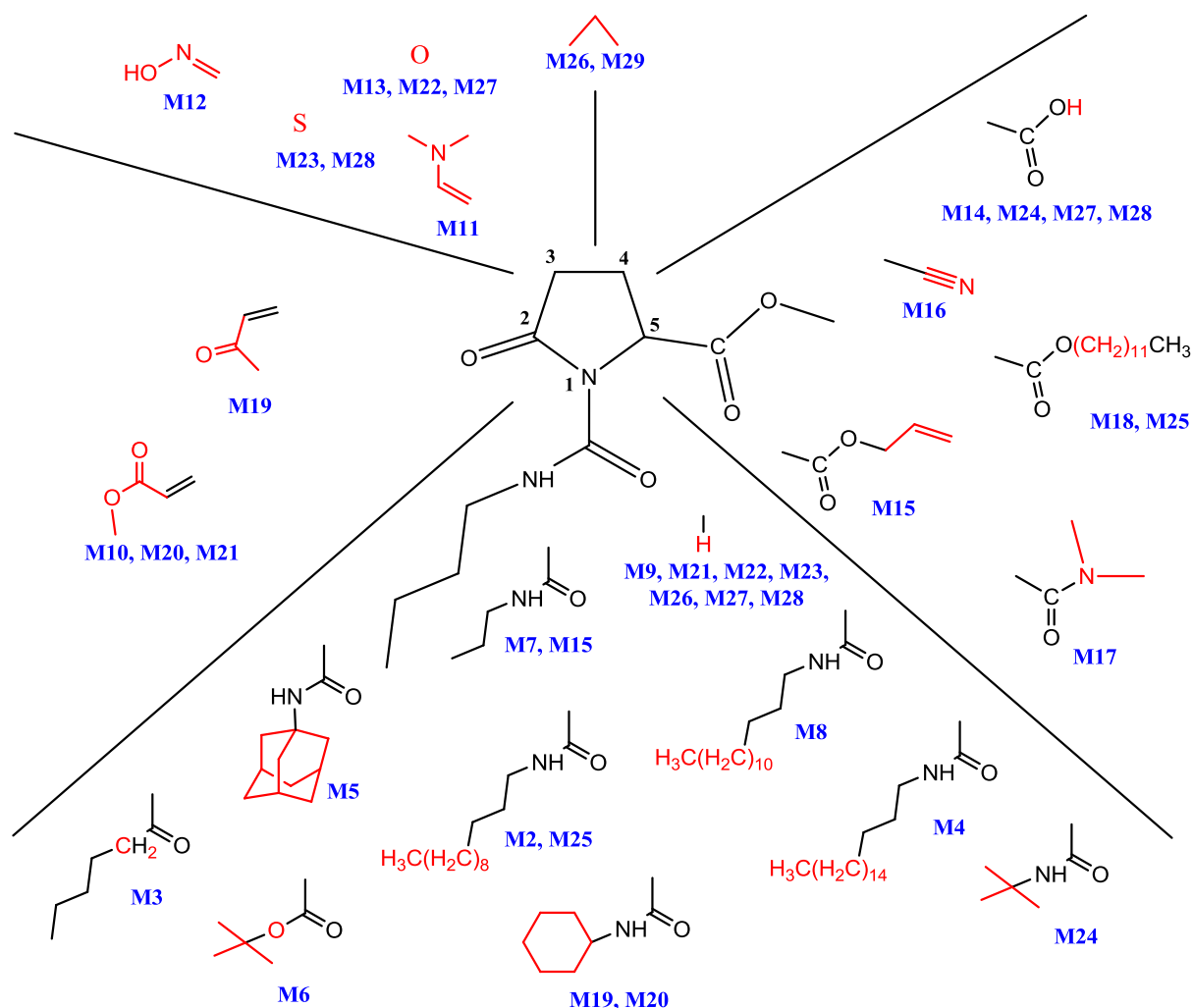


Figure 2. Pharmacophore of the molecule M1, showing the structure modifications performed on the different positions of the main nucleus of M1. All changes were done separately on all positions of the nucleus, except on position 4. Some molecules were modified in several positions simultaneously.

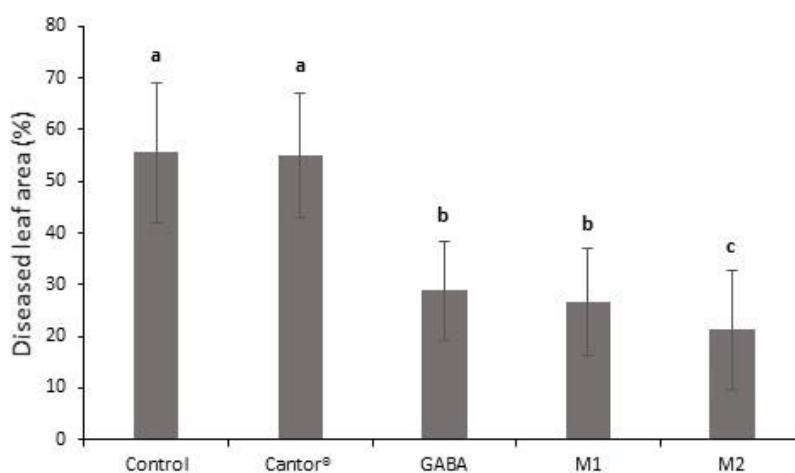


Figure 3. Disease severity on wheat plants (cultivar Alixan) against *Zymoseptoria tritici* (strain T02596) treated with water (control), Cantor® (0.15%), γ -aminobutyric acid (GABA), M1 and M2 molecules at 5 mM. Disease symptoms were recorded 21 days post-inoculation by scoring the percentage of the third

leaf area covered with lesions bearing pycnidia. Means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

M1, M2 and GABA did not affect *in planta* epiphytic growth of *Z. tritici*

In planta bioassays were undertaken in order to evaluate the effect of M1, M2 and GABA, as well as the wetting agent Cantor[®], on the epiphytic hyphal growth of *Z. tritici*. Cytological observations carried out at 1 dpi showed no significant difference among the rates of germinated spores recorded on the control plants inoculated and treated with water alone and on the plants inoculated and treated with Cantor[®] or with GABA, M1 and M2 molecules (Table 3). Likewise, no effect of the treatments with Cantor[®], or with GABA, M1 and M2, on the epiphytic hyphal development of the pathogen was observed at 5 dpi. Indeed, no significant difference was detected among all conditions regarding the different assessed classes of mycelial growth (Figure 4). Overall, fungal germ tubes at 5 dpi were randomly oriented on the leaf surface and the patterns of mycelial growth were similar in both plants inoculated and treated with water alone and plants inoculated and treated with Cantor[®] or with GABA, M1 and M2 (*data not shown*).

Table 3. Rates of germinated spores of *Zymoseptoria tritici* at 1 day after inoculation on wheat plants treated with water (control), Cantor[®] (0.15%), γ -aminobutyric acid (GABA), M1 and M2 molecules at 5 mM.

Treatments	Rate of germinated spores (%)
Control	74 b
Cantor [®]	82 ab
GABA	83 ab
M1	87 a
M2	82 ab

Means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

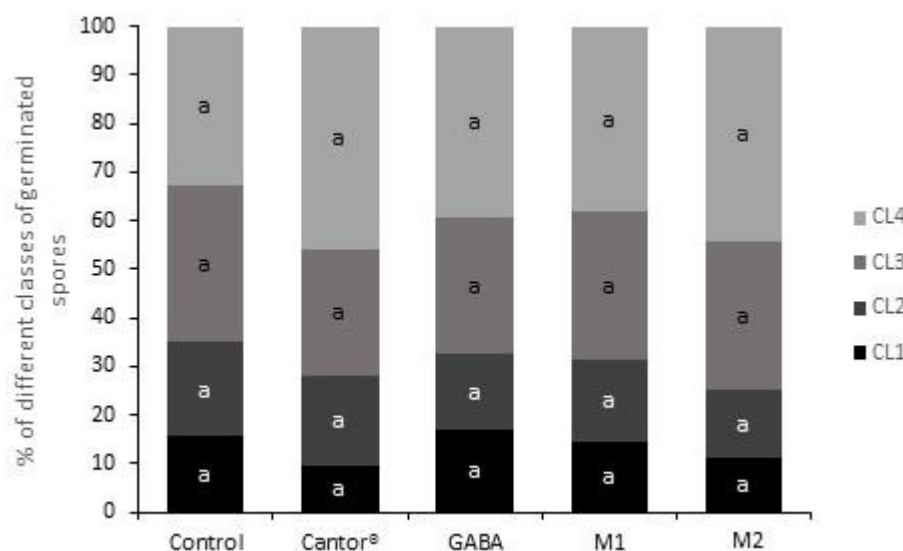


Figure 4. *In planta* effect of γ -aminobutyric acid (GABA), M1, M2 and Cantor® treatments on the epiphytic hyphal growth of *Zymoseptoria tritici* (strain T02596) on the wheat leaves (cultivar Alixan), compared to the water-treated control. Four different classes of Calcofluor-stained germinated spores were assessed five days post-inoculation (class 1, non-germinated spores; Class 2, germinated spores with small germ tube; class 3, germinated spores with developed germ tube; class 4, germinated spores with a strongly developed germ tube). Within each class, bars with common letters are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

M1, M2 and GABA induce defense-related mechanisms in wheat

The expression level of four genes involved in host defense reactions (*LOX*, *PAL*, *POX2*, and *PR1*) were assessed during the early stages of treatment as well as infection in order to evaluate the elicitation and priming effects of M1, M2 and GABA on wheat plants against *Z. tritici*.

In non-infectious conditions, gene expression profiles in plants non-inoculated and treated with M1, M2 and GABA were compared to plants non-inoculated and treated with water amended with 1% ethanol and 0.15% Cantor® (Fig. 5A). *LOX* gene was induced by 2 dpt by all the three molecules, with induction levels of 15-, 13- and 2- folds for plants treated with GABA, M1 and M2, respectively. GABA-treated plants were the only ones to show a slight up-regulation of 2-fold at 3 dpt, while GABA and M1 treated plants exhibited an induction of 19- and 4-folds at 7 dpt, respectively. A down regulation of the *LOX* gene was observed at 4 dpt on both M1- and M2-treated plants. Regarding *PAL* gene, up regulations of about 3-fold were observed at 7 dpt in plants treated with the three molecules. The expression of this gene was down regulated at 4 dpt in plants treated with M2. Concerning *POX2*, an up-regulation of this gene was recorded at 2, 3 and 4 dpt in plants treated with the three molecules, with induction levels varying between 2- and 18- folds. The highest expression level was obtained for M2 at 2dpt. At 7 dpt, an

induction of *POX2* was observed only in plants treated with M1, while at the same date, a down regulation of this gene was observed in plants treated with GABA. *PR1* gene showed high induction levels, especially at 2 dpt, in plants treated with the three molecules, with a most important induction in GABA-treated plants. Up-regulations of *PR1* gene expression in GABA-treated plants ranged from 18- to 347-folds; the highest value (347-fold) was recorded at 2 dpt. In M1-treated plants, *PR1* gene was induced at 2 and 7 dpt (by 179- and 3-folds, respectively), while a down-regulation of this gene was observed at 3 dpt on the same plants. In M2-treated plants, up-regulations of *PR1* at 2 and 3 dpt (by 37- and 4- folds, respectively) were noticed, while down regulations of this gene were observed in the same plants at 3 and 7 dpt.

In infectious conditions, the specific effect of inoculation on wheat plants was assessed in order to highlight the way by which the fungus alone influences the expression of targeted genes. Plants inoculated and treated with Cantor[®] were compared to plants that have received the same treatment but non-inoculated (Figure 5B). An up-regulation of *LOX* gene expression at 3 and 7 dpt (corresponding to 1 and 5 dpi, respectively) was observed, while a down regulation of this gene was recorded at 4 dpt (2 dpi). *PAL* gene expression was unchanged compared to non-inoculated plants throughout the whole time course. By contrast, both *POX2* and *PR1* gene expressions were up-regulated at all studied dates. In order to investigate the priming effect of the molecules, plants inoculated and treated with the three molecules were compared to plants inoculated and treated with water amended with 1% ethanol and 0.15% Cantor[®] (Figure 5C). *LOX* gene expression was induced at 3 dpt (1 dpi) by 2-, 6- and 10- folds, and at 4 dpt (2 dpi) by 3-, 6- and 2-folds in plants treated with GABA, M1 and M2, respectively. However, down-regulations of this gene were observed at 7dpt (5 dpi) in plants treated with GABA and M2. Regarding *PAL*, at 7 dpt (5 dpi), this gene was induced in plants treated with GABA and down-regulated in plants treated with M1. For *POX2* gene, few modifications of expression were observed compared to the control. Indeed, only an induction of *POX2* gene expression (6-fold) was noticed at 7dpt (5 dpi) in plants treated with M1, while down-regulations of this gene were recorded at 3 dpt (1 dpi) in plants treated with GABA and M2. M1-treated plants showed an up-regulation at 7dpt (5 dpi) and a down-regulation at 4 dpt (2 dpi), while M2-treated plants exhibited down-regulations of *POX2* gene expression at 3 (1 dpi) and 7 dpt (5 dpi).

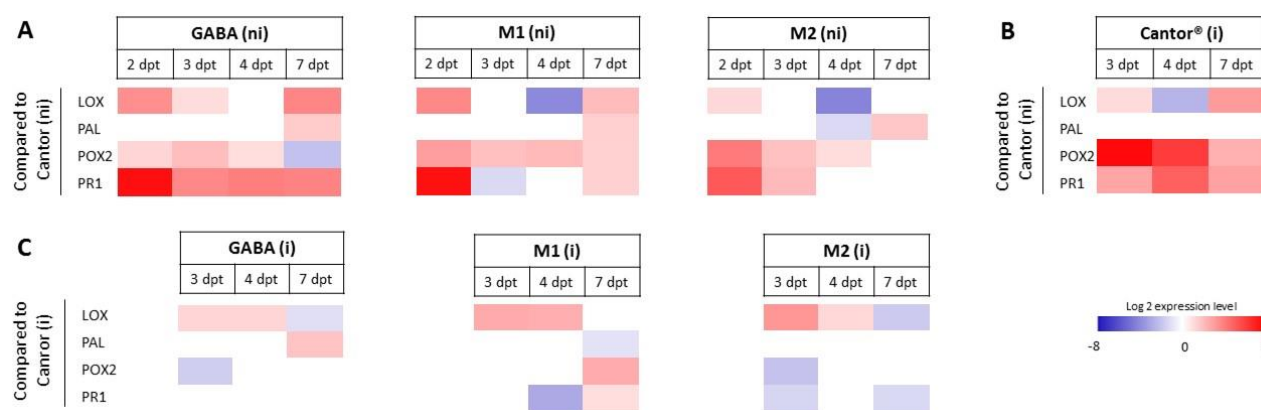


Figure 5. Relative expression of four selected defense-related genes in wheat leaves (cultivar Alixan) treated or not with γ -aminobutyric acid GABA, M1 and M2 and inoculated or not with *Zymoseptoria tritici* (strain T02596). (A) non-infectious conditions (ni) where GABA, M1 and M2-treated and non-inoculated plants are compared Cantor[®]-treated and non-inoculated plants; (B) Cantor[®]-treated and inoculated plants compared to Cantor[®]-treated and non-inoculated control plants; (C) GABA-, M-1 and M2-treated and inoculated plants compared to Cantor[®]-treated and inoculated control plants. The color scale represents the Log2 values of different relative gene expressions. White color indicates no change in the gene expression level when compared to the control plants. Over-expression (> 2x) is highlighted with shades of red, while down-expression (< 0.5x) is presented with shades of blue.

Discussion

The present study allowed us to discover new elicitors bio-sourced from sugar beet byproducts that induce resistance in bread wheat against *Z. tritici*, the major pathogen on this crop. Among the 31 studied molecules, GABA, M1 and 15 molecules functionalized from M1 displayed significant protection levels on wheat without any direct antifungal affect towards the pathogen, suggesting that the protection efficacy coffered by these molecules is due to an elicitation effect rather than to a direct activity. Few previous reports have already showed the ability of elicitors to protect wheat against *Z. tritici*. For instance, surfactin, a cyclic lipopeptide from the bacterial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499, was shown to confer protection in wheat towards *Z. tritici* (70% disease reduction) by activating both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent defense pathways (Le mire *et al.* 2018). Two commercial elicitors (Vacciplant[®], marketed by Arysta Lifescience and Bion[®], marketed by Syngenta) are registered for the control of *Z. tritici*, but only Bion[®] was already demonstrated to protect wheat against this pathogen, with up to 69 % disease reduction (Le mire *et al.* 2018). On the other hand, cultivar-elicitor interactions were highlighted in wheat against *Z. tritici*, since protection efficacies conferred by three elicitors (ion-, microbial extract-, and polysaccharide-based products) against *Z. tritici* differentiated strongly among three wheat cultivars (Alixan, Premio, and Altigo) varying in their resistance levels to the pathogen (Ors *et al.* 2013). Our results complete these findings and provide new

family of bio-sourced elicitors conferring resistance in wheat against *Z. tritici*. GABA has never been explored before for its protection efficacy on wheat against *Z. tritici*, but its ability to provide protection in plants against some pathogens has been investigated in previous work. For instance, a treatment of pear fruit with GABA induced resistance against the postharvest blue mold rot caused by *Penicillium expansum* (Yu et al. 2014). Few studies were also conducted to examine the effect of GABA on reducing abiotic stress on wheat. For instance, exogenous application of GABA reduced damages caused by chilling stress in wheat seedlings (Malekzadeh et al. 2012). Likewise, foliar application of a GABA-based formulation on wheat enhanced grain yield and leaf manganese content associated with an improved tolerance to powdery mildew (Kinnersley, 1998).

Structure-activity relationship study based on changes made on the molecule M1 revealed that all chemical groups of the molecule, at all positions, are important for its resistance induction activity in wheat. Simultaneous modifications carried out at all positions affected the protection efficacy, either by reducing or by completely inhibiting the activity. Likewise, single chemical functionalization resulted in a loss or stability of the protection level, except the modification performed to obtain the molecule M2 (C8 chain extension) which allowed an enhancement of protection efficacy from 55 % (M1) to 63 % (M2) disease severity reduction (Table 2). Interestingly, an extension of the carbonic chain into 14 carbons (M4) did not increase the activity; but rather, led to a decrease in the activity (Table 2), suggesting that a moderate length of the chain (C8 for instance) confer to the molecule an optimal conformation enhancing the activity. Surprisingly, LogP of the molecules were not correlated to the protection efficacy. For instance, the most hydrophobic molecule M25, with a LogP of 9.39, did not confer any protection to wheat towards the pathogen (Table 2). According to Schönherr and Bauer (1996), highly hydrophobic leaf cuticles restrict the penetration of hydrophilic agents inside the leaves. Since wheat leaves are highly hydrophobic (Massinon and Lebeau 2013), it is more likely that hydrophilic molecules used in our study have a low chance to enter inside leaf tissues compared to the hydrophobic (lipophilic) molecules, even if the penetration into the leaves may be insured through leaf stomata as an alternative. However, the use of the wetting agent Heliosol® probably allowed to all molecules, including the hydrophilic ones such as GABA and M1 (with low LogP values of -0.62 and -0.7, respectively), to get into the leaves and to confer significant protection rates (44 and 55 %, respectively). We can thus suggest that the absence of protective activity by the non-active molecules is not due to hydrophilic properties, but more likely to their structure and to the non-recognition of these molecules by the plant, resulting in non-activation

of defense mechanisms. For the lipophilic molecules, their application with the wetting agent has likely improved their penetration, consequently their activity.

Regarding Heliosol[®], although this wetting agent did not show alone any protection *in planta* in the greenhouse, laboratory assays showed that it displays *in vitro* direct antifungal effect. Such difference between *in vitro* and *in planta* assays could be the result of a high concentration of the product being in contact with the fungus in *in vitro* conditions when compared to *in planta* conditions. The lack of protection *in planta* could also be due to a bio-degradation of Heliosol[®] by light, temperature or its possible evaporation, making the *in planta* concentration in contact with the fungus at the leaf surface (inoculated two days later) much lower than the *in vitro* concentration. In order to guarantee an absence of direct effect from the wetting agent, Cantor[®] was chosen for further experiments since no direct activity was recorded *in vitro* and no protective effect was conferred *in planta* by this wetting agent when applied alone. Interestingly, the protection efficacies obtained with GABA, M1 and M2 amended with either Heliosol[®] or Cantor[®] were overall similar (Table 2, Figure 3), confirming the non-contribution of the direct activity of Heliosol[®] to the protection efficacy of the molecules and suggesting that the biological activity of the molecules don't vary depending on the used wetting agents.

In-depth characterization of M1, M2 and GABA allowed a better understanding of the mode of action of these molecules. Histopathological observations confirmed the absence of direct effect of these molecules as well as Cantor[®] on both spore germination and fungal hyphal growth on leaf surfaces (Table 3, Figure 4), supporting the finding that the activity of these molecules is strictly due to plant defense induction. Gene expression monitoring confirmed this result and revealed that the three molecules trigger defense responses in wheat against *Z. tritici*. Overall, the expression levels induced by the molecules in non-infectious conditions (Figure 5A) were higher than in infectious conditions (Figure 5C), suggesting that the resistance induced in wheat by the three molecules relies mainly on elicitation activity. Such a result indicate that the mode of action of GABA (as well as M1 and M2) differ from that of its isomer BABA known as a priming agent of defense reactions (Ton et al. 2005). On the other hand, gene inductions in infectious conditions without treatments (Figure 5B) was much higher than in infectious conditions in presence of treatments by the molecules (Figure 5C), reporting that the ability of the fungus alone to activate wheat defenses is stronger than that of the molecules. An induction of wheat-defense related genes by *Z. tritici* in absence of treatments, including *LOX*, *PAL*, *POX2* and *PR1* genes studied in the present study, were previously reported, with expression patterns that vary depending on the resistance level of host cultivars and the time point during

the early stages of fungal infection (Ray et al. 2003; Shetty et al. 2009, Rudd et al. 2015; Ors et al. 2018).

Regarding genes induced by the molecules, similarities were found among the three molecules, although few differences in the expression level of some genes at some time points were observed in both non-infectious and infectious conditions (Figures 5A and 5C). Overall, expression levels of *LOX* gene were higher than *PAL* gene in plants treated with all molecules. *LOX* activity acts upstream of the octadecanoid pathway, by catalysing the dioxygenation of polyunsaturated fatty acid, leading to the downstream biosynthesis of jasmonic acid (Creelman and Mullet 1997). *PAL* activity is involved in the upstream of phenylpropanoid pathway, catalysing the non-oxidative deamination of phenylalanine to trans-cinnamate, a precursor required for the downstream biosynthesis of phenolic compound-based phenylpropanoids such as flavonoids, phytoalexins, lignins, and salicylic acid (La Camera et al. 2004; Vogt 2010). Both jasmonic and salicylic acids are essential signals involved in plant defense responses. Based on our findings, the mode of action of M1, M2 and GABA molecules seems to rely more on jasmonic acid-rather than on salicylic acid-related pathway. On the other hand, the three molecules elicit with a strong intensity the expression of *PR1* gene. *PR1* is a PR protein with a non-elucidated function, while most of other PR-proteins are known to be antimicrobials having the role of arresting pathogen invasion (Sudisha et al. 2012). Up-regulations of *PR1* gene have already been reported in wheat plants infected with *Z. tritici* (Ray et al. 2003; Ors et al. 2018). Concerning *POX2*, marked expression amounts of this gene were also observed in plants treated with the three molecules. *POX* activity is involved in ROS metabolism and use hydrogen peroxide (H_2O_2) as a substrate during defense responses (O'Brien et al. 2012). The accumulation of H_2O_2 has been shown to inhibit colonization by *Z. tritici* in resistant cultivars (Shetty et al. 2007). Our result showing an induction of *POX2* gene suggests and accumulation of H_2O_2 in wheat plants treated with the three molecules; it is likely that the plants then induced *POX* activity to reduce the rates of H_2O_2 , since this compound of oxidative stress could display a toxicity to the plant when produced at high concentrations. *POX* gene expression has been associated to innate resistance in wheat against *Z. tritici*. Indeed, Shetty et al. (2003) reported that resistant wheat cultivars accumulate *POX* transcripts and had an important *POX* activity compared to susceptible cultivars when inoculated with *Z. tritici*.

In conclusion, the present study reports new elicitors bio-sourced from sugar beet byproducts, as well as GABA, that induce resistance in wheat against *Z. tritici*. These molecules confer protection rates of up to 63 % disease severity reduction, without any direct antifungal effect

towards the pathogen, indicating that the activity of the molecules results exclusively from plant defense elicitation. Structure-activity relationship study revealed the involvement of all chemical groups (especially the carbonic chain), at all positions, in the activity of the molecule M1 used for functionalization. Gene expression assay confirmed the ability of M1, M2 and GABA to trigger defense reactions in wheat, thus confirming the eliciting properties of these molecules. However, further experiments are required to decipher the defense pathways activated by these molecules in wheat against *Z. tritici*. Moreover, although PGA, which served as a mother molecule to produce the elicitors highlighted in the present study, is a non-toxic and non-ecotoxic compound, a verification of the absence of toxicity and eco-toxicity of the functionalized molecules is required for any future application in plant protection.

Acknowledgements

This research was conducted in the framework of the Optistim project, founded by the “Matériaux Verts Fonctionnels” program, Yncréa Hauts-de-France, and the Alibiotech project, founded by the European Union, the French State and the French Region Hauts-de-France.

References

- Benouaret R, Goujon E, Goupil P (2013) Plant defence inducer properties of the grape marc extract. IOBC- WP RS Bulletin 89:95-97
- Bown AW, Shelp BJ (1997) The Metabolism and Functions of [gamma]-Aminobutyric Acid. *Plant Physiol* 115:1–5
- Cheval P, Siah A, Bomble M, et al (2017) Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. *Crop Protection* 92:131–133. Doi:10.1016/j.cropro.2016.10.017
- Fones H, Gurr S (2015) The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet Biol* 79:3–7. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.004
- Garcion C, Lamotte O, Cacas JL, Métraux JP (2014) Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: Walters DR, Newton AC, Lyon GD (eds) *Induced resistance for plant defence: A sustainable approach to crop protection*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 106–136
- Goupil P, Benouaret R, Charrier O, et al (2012) Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicology* 21:1541–1549. Doi: 10.1007/s10646-012-0908-1
- Harland JI, Jones CK, Hufford C (2007) *Co-Products - Sugar Beet* - Blackwell Publishing Ltd; chapter 17: 443-363

- Heick TM, Justesen AF, Jørgensen LN (2017) Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region - a status. *Eur J Plant Pathol* 149:669–682. Doi: 10.1007/s10658-017-1216-7
- Heno S, Viou L, Khan MFR (2018) Sugar Beet Production in France. *Sugar Tech* 20:392–395. Doi: 10.1007/s12355-017-0575-x
- Henry G (2013) Study of the induced systemic resistance of plants: molecular aspects of the interaction between plant cells and amphiphilic elicitors produced by non-pathogenic rhizobacteria. Gembloux Agro-Bio Tech, Gembloux, Belgique
- Hippchen H, Schneider H-G, Schwingeler R (1978) Process for obtaining amino acids from the raw juices of sugar manufacture
- Keen N, Partridge, Zaki A (1972) Pathogen-Produced Elicitor of a Chemical Defense Mechanism in Soybeans Monogenically Resistant to *Phytophthora Megasperma* Var *Sojae*. *Phytopathology* 62:768–768
- Kinnersley A M. (1998) Bioactivity of AuxiGro™ Plant Metabolic Primer, a formulation containing GABA and glutamic acid. In: Proc. 25th Ann. Mtg. Plant Growth Regulation Soc. of America. pp. 89–94
- Kuc J (1982) Induced Immunity to Plant Disease | BioScience. *BioScience* 32:854–860 . Doi: <https://doi.org/10.2307/1309008>
- La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, et al (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev* 198:267–284
- Le Mire G, Siah A, Brisset M-N, et al (2018) Surfactin Protects Wheat against *Zymoseptoria tritici* and Activates Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses. *Agriculture* 8:1–14
- Malekzadeh P, Khara J, Haidari R (2012) Effect of exogenous Gama-aminobutyric acid on physiological tolerance of wheat seedlings exposed to chilling stress. *Iranian Journal of Plant Physiology*. 3: 611– 617.
- Massinon M, Lebeau F (2013) Review of physicochemical processes involved in agrochemical spray retention. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement = Biotechnology, Agronomy, Society and Environment [=BASE]*
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198:249–266
- O'Brien JA, Daudi A, Finch P, et al (2012) A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured *Arabidopsis* cells functions in MAMP-elicited defense. *Plant Physiol* 158:2013–2027. Doi: 10.1104/pp.111.190140
- Ors ME, Siah A, Randoux B, et al (2013) Cultivar-dependent efficacy and mode of action of plant resistance inducers in wheat against *Septoria tritici* leaf blotch. *IOBC-WPRS Bull* 89:333–338

- Ors ME (2018) Cultivar-dependent partial resistance and associated defence mechanisms in wheat against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 67:561–572. Doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.12760>
- Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol* 53:741–754. Doi: 10.1023/B:PLAN.0000019120.74610.52
- Rudd JJ, Kanyuka K, Hassani-Pak K, et al (2015) Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiol* 167:1158–1185. Doi: 10.1104/pp.114.255927
- Schilling S, Stenzel I, von Bohlen A, et al (2007) Isolation and characterization of the glutaminyl cyclases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*: implications for physiological functions. *Biol Chem* 388:145–153. Doi: 10.1515/BC.2007.016
- Shetty NP, Jensen JD, Knudsen A, et al (2009) Effects of beta-1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *J Exp Bot* 60:4287–4300. Doi: 10.1093/jxb/erp269
- Shetty NP, Kristensen BK, Newman M-A, et al (2003) Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:333–346. Doi: 10.1016/S0885-5765(03)00079-1
- Shetty NP, Mehrabi R, Lütken H, et al (2007) Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytol* 174:637–647. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02026.x
- Schönherr J, Bauer P (1996) Effects of temperature, surfactants and other adjuvants on rates of uptake of organic compounds. In: Kerstiens G, ed. *Plant cuticles – an integrated functional approach*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers; 134–154.
- Siah A, Bomble M, Tisserant B, et al (2018a) Genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in northern France at region, field, plant and leaf layer scales. *Phytopathology*. Doi: 10.1094/PHYTO-09-17-0322-R
- Siah A, Deweer C, Morand E, et al (2010) Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection* 29:737–743. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.012>
- Siah A, Deweer C, Duyme F, et al (2010a) 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. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02303.x
- Siah A, Magnin-Robert M, Randoux B, et al (2018b) Natural Agents Inducing Plant Resistance Against Pests and Diseases. In: *Natural Antimicrobial Agents*. Springer, Cham, pp 121–159
- Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, et al (2012) Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. In: *Plant Defence: Biological Control*. Springer, Dordrecht, pp 379–403

Tayeh C, Randoux B, Vincent D, et al (2014) Exogenous trehalose induces defenses in wheat before and during a biotic stress caused by powdery mildew. *Phytopathology* 104:293–305 . Doi: 10.1094/PHYTO-07-13-0191-R

Tomaszewska J, Bieliński D, Binczarski M, et al (2018) Products of sugar beet processing as raw materials for chemicals and biodegradable polymers. *RSC Adv* 8:3161–3177. Doi: 10.1039/C7RA12782K

Ton J, Jakab G, Toquin V, et al (2005) Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:987–999 . Doi: 10.1105/tpc.104.029728

Torriani SFF, Melichar JPE, Mills C, et al (2015) *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet Biol* 79:8–12. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.010

Vogt T (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* 3:2–20. Doi: 10.1093/mp/ssp106

Article 3

Des dérivés conjugués de l'acide salicylique et de l'acide pyroglutamique protègent le blé contre *Zymoseptoria tritici*

L'acide salicylique (SA) et ses analogues sont bien connus pour leur capacité à induire des réactions de résistance chez les plantes contre une large gamme d'agents pathogènes. A l'inverse, l'acide pyroglutamique (PGA), un analogue cyclique de l'acide γ -aminobutyrique, n'a jamais été étudié sur des pathosystèmes impliquant des plantes. Notre étude vise à tester l'effet protecteur de ces deux molécules et de cinq dérivés issus de leur conjugaison sur le pathosystème blé-*Z. tritici*. Des traitements à la dose de 5 mM ont été réalisés par pulvérisations foliaires sur des plantules du cultivar de blé sensible (Alixan), 48 h avant inoculation avec la souche T02596 de *Z. tritici*.

Les meilleurs niveaux de protection, de 33 à 49 % en conditions semi-contrôlées, ont été observés avec 4 des 5 dérivés conjugués. Ces niveaux de protection sont supérieurs à ceux retrouvés chez les plantes traitées uniquement avec le SA (25 %) ou le PGA (absence de protection significative). Les tests d'effet direct sur le champignon des différents composés (SA, PGA et conjugués) ont été réalisés *in vitro* et ont montré un effet antifongique, mais à des concentrations beaucoup plus importantes, soit plus de 400 mg/L pour le SA et plus de 1 g/L pour le PGA et les autres dérivés. Ces résultats suggèrent que les effets protecteurs observés seraient liés majoritairement à une stimulation des réactions de défense de la plante plutôt qu'à un effet direct de ces composés sur le champignon. Des expériences complémentaires seraient requises afin de caractériser les réactions de défense induites par ces composés et responsables des protections obtenues contre la maladie.

Salicylic acid and pyroglutamic acid conjugated derivatives confer protection to bread wheat against *Zymoseptoria tritici*

Samara Mejri,^a Ali Siah,^a Cristina-Maria Abuhaie,^{b,c,d} Patrice Halama,^a Maryline Magnin-Robert,^e Béatrice Randoux,^e Philippe Reignault,^e Benoît Rigo,^{b,c} and Alina Ghinet^{b,c,d,*}

^a Institut Supérieur d'Agriculture (ISA), Yncréa Hauts-de-France, EA 7394-ICV Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

^b Inserm U995, LIRIC, Université de Lille, CHRU de Lille, Faculté de médecine - Pôle recherche, Place Verdun, F-59045 Lille Cedex, France

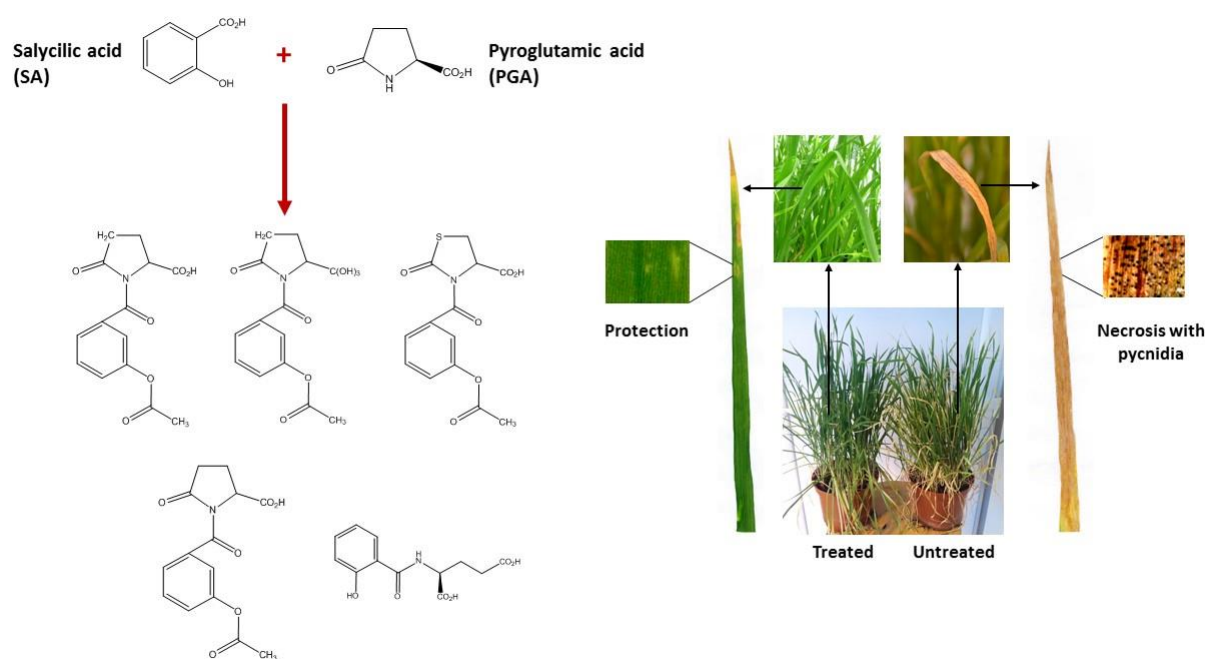
^c Hautes Etudes d'Ingénieur (HEI), Yncréa Hauts-de-France, UCLille, Laboratoire de chimie durable et santé, 13 rue de Toul, F-59046 Lille, France

^d 'Al. I. Cuza' University of Iasi, Faculty of Chemistry, Bd. Carol I, nr. 11, 700506 Iasi, Romania

^e Univ. Littoral Côte d'Opale, UCEIV-EA 4492, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, SFR Condorcet FR CNRS 3417, F-62228, Calais cedex, France

Abstract

To promote sustainable agriculture and healthy food, researches towards new generation of eco-friendly phytosanitary compounds are more than encouraged. The plant hormone salicylic acid (SA) is known for its ability to induce resistance in plants against a wide range of pathogens, while pyroglutamic acid (PGA), a constrained analogue of γ -aminobutyric acid, has never been studied in a context of plant protection. The present study investigated for the first time the protection efficacy of these two molecules and five conjugated derivatives on wheat against *Zymoseptoria tritici*, the main pathogen on this crop. SA and four among the derivatives showed significant disease severity reductions (up to 49%), while PGA and one derivative conferred no protection. *In vitro* assays revealed that some molecules, including SA, display a slight direct antifungal activity, while others, such as PGA, show no effect. This finding suggests that, especially for molecules without any direct activity, the mode of action relies mainly on the induction of plant resistance. Further investigations are needed to identify defense pathways involved in plant resistance mechanisms elicited or primed by the molecules.



Introduction

Zymoseptoria tritici is a fungal pathogen responsible for Septoria tritici blotch (STB), the most frequently occurring and damaging disease on bread wheat in Europe and all over the world.^{1,2} Disease control relies mainly on the use of conventional fungicides, but such products are currently controversial because of their potential impacts on both the environment and human health. Moreover, *Z. tritici* possesses a high adaptive potential, allowing it to frequently develop resistance to fungicides and overcome host plant resistance.^{3,4} Hence, looking for biocontrol products such as biofungicides and elicitors (*i.e.* plant resistance inducers) is more than ever encouraged⁵ in order to insure a more sustainable agriculture and a better food quality.

Salicylic acid, (SA), which corresponds to 2-hydroxybenzoic acid (compound **1**, Figure 1) is a phenolic compound produced by plants, involved in numerous physiological processes such as signalization, stomatal closure, seed germination, flowering, and senescence.⁶ SA is known as a phytohormone triggering plant immunity responses and its endogenous accumulation is required for the expression of the systemic acquired resistance (SAR).⁷ SAR is triggered from the elicitation site, and long distance signals allow it to occur in spatially distant organs and to confer a broad and long lasting protection. Several studies demonstrated that exogenous application of SA induces the expression of pathogenesis-related (PR) proteins-encoding genes and the accumulation of reactive oxygen species (ROS).⁸ SA was shown to confer immunity towards a wide range of biotrophic and hemibiotrophic fungi as well as other phytopathogenic organisms such as bacteria, viruses and insects (Glazebrook, 2005; Vlot *et al.*, 2009).^{9,10}

Although SA is an effective inducer of plant defense, its rapid glycosylation often leads to its reduced efficacy.⁸ In addition, Molinari & Loffredo (2006)¹¹ reported that SA was not very efficient on root diseases caused by nematodes, and assigned this to a low absorption by the plant. Moreover, the phytotoxicity of SA observed on monocotyledons^{12,13} and dicotyledons^{14,15,16} has impaired its development as an exogenous resistance inducer. Hence, the interest of researchers then focused on other compounds structurally related to SA, with lower phytotoxicity, greater stability and ability to induce resistance. There are more than 39 different derivatives structurally related to SA and which have been shown to possess the ability to induce resistance.¹⁷ The SA analogue most frequently used as a synthetic resistance inducer was the benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid *S*-methyl ester (BTH), this compound has been shown to possess biological activity on a wide range of plants against biotic stresses.¹⁸ BTH was developed commercially under different trade names (BION® in Europe and Actigard® in the United States).¹⁹ Other derivatives, such as probenazole (3-allyloxy-1,2-

benzothiazole-1,1-oxide; PBZ) and heptanoyl salicylic acid (HSA), were also reported to induce resistances against rice blast and wheat powdery mildew, respectively.^{20,21} Tayeh *et al.*, (2013)²¹ showed that HSA was more efficient than SA in protecting wheat against the biotrophic fungus *Blumeria graminis f.sp. tritici* (Bgt), by inducing plant resistance mechanisms earlier than SA and with a higher intensity.

An interesting approach to obtain prodrugs of SA with better eliciting properties and probably a higher bioavailability was to link the acid group of SA with γ -aminobutyric acid (GABA) or its analogues. Indeed, GABA is a non-proteinogenic amino acid which was initially known as the main inhibitory neurotransmitter in humans and animals,²² before its characterization as a compound involved in abiotic and biotic stress signals in plants.^{23,24} Some studies demonstrated that exogenous treatment of plants or fruits with GABA induced resistance against pathogenic necrotrophic fungi such as *Penicillium expansum* in pear fruit, *Alternaria alternata* in tomato fruit and *Botrytis cinerea* in tomato leaves.^{25,26,27}

Pyroglutamic acid (PGA) (compound **2**, Figure 1) is a constrained analogue of GABA and to the best of our knowledge, this acid has never been studied in the context of plant protection. Numerous proteins carrying PGA at the N-terminus are known for their function in the plant defense reactions, such as the class of PR proteins.²⁸ Nevertheless, the feature of PGA residue for these proteins is not clear. PGA, also known as pidolic acid and as “the forgotten amino acid”, is considered as a physiological moisturizer, and is cited in all cosmetology manuals thanks to its predominant presence in the natural moisturizing factors (NMF). PGA is frequently associated with sodium or potassium which confer humectant properties while acting on the intracellular and extracellular water flow. The function of “physiological transporter” was attributed to PGA without asking if it does not have any additional biological role to explain its presence at high concentrations at the cutaneous level.²⁹ PGA is also considered as a waste from the food industry, and more specifically from sugar extraction. Indeed, it is mainly obtained at a large scale by cyclization of the glutamine issued from sugar beet molasses. PGA is thus an affordable raw material, without any toxicity and possessing important functionalizable units (lactam and carboxylic acid groups), therefore allowing access and creation of new structures. In the current work, we focused on the evaluation of an unprecedented prodrug between SA and PGA to increase the induced resistance of bread wheat against *Z. tritici*. In addition, several derivatives of reference molecules (compounds **3-6**, Figure 1) have been designed, synthesized and evaluated on the same pathosystem.

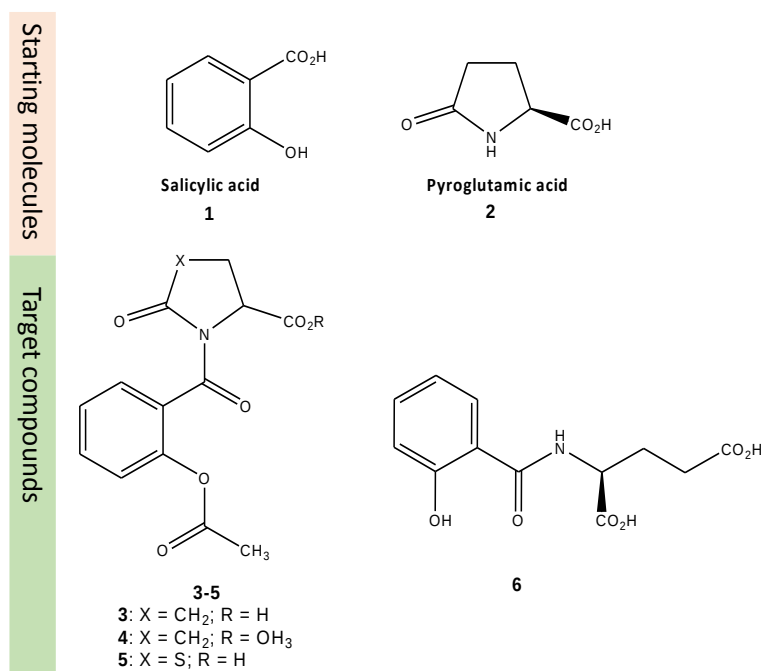


Figure 1. Structure of salicylic acid, SA (**1**), pyroglutamic acid, PGA (**2**) and SA-conjugated target derivatives (**3-6**).

Materials and methods

Experimental section

General Remarks. Starting materials are commercially available and were used without further purification. Melting points were measured on a MPA 100 OptiMelt® apparatus and were uncorrected. NMR spectra were acquired at 400 MHz for ¹H NMR and 100 MHz for ¹³C NMR on a Varian 400 MHz Premium Shielded® spectrometer. Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to CDCl₃ (7.26 ppm; 77.1 ppm). Splitting patterns are designed as: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; quint, quintuplet; m, multiplet and sym m, symmetric multiplet. Coupling constants *J* are reported in hertz (Hz). Thin layer chromatographies were realized on Macherey Nagel silica gel plates with a fluorescent indicator and were visualized with UV-lamp at 254 nm and 366 nm. Column chromatographies were performed using a CombiFlash Rf Companion (Teledyne-Isco System) and RediSep prepacked columns. IR spectra were recorded on a Varian 640-IR FT-IR Spectrometer. Elemental analyses (C, H, N) of new compounds were determined by “Pôle Chimie Moléculaire”, Faculté des Sciences Mirande, Université de Bourgogne, Dijon, France.

Plant growth, treatment and inoculation

Screening experiments were conducted under semi-controlled conditions in the greenhouse at 18 °C ($\pm$ 2 °C) with a day-night cycle of 16/8 h. Grains of the susceptible bread wheat cultivar Alixan (Limagrain) were pre-germinated according to Siah *et al.* (2010a),³⁰ and germinated grains were placed into three-liter pots filled with universal loam (Gamm Vert, France). Three pots of 12 grains were used as replicates for each condition, and two independent repetitions were conducted. Solutions of SA, PGA and derived molecules **3-7** were used as foliar treatments three weeks post-sowing (third leaf fully expanded). All molecules were first dissolved in 1% (v/v) of ethanol, then diluted in distilled water containing 0.2% (v/v) Heliosol® (Helioterpen, France) as a wetting agent. Each pot received 30 mL of a 5 mM treatment solution using a manual hand sprayer. Forty eight hours after treatments, plants were inoculated with 30 mL of spore suspension (10^6 spores/mL of distilled water) amended with 0.05% polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20, Sigma Aldrich, USA). After inoculation, each pot was covered with a clear polyethylene bag for 72 hours in order to ensure a water-saturated atmosphere allowing good fungal germination. The *Z. tritici* strain T02596 isolated in 2014 from Northern France was used to prepare spore suspension. This later was produced on potato dextrose agar medium (PDA), according to Siah *et al.* (2010a).³⁰ Twenty one days post-inoculation (dpi), the disease severity was scored by evaluating the percentage of the third leaf area covered by lesions (chlorosis or necrosis) bearing pycnidia.

In vitro antifungal assay

Direct antifungal effect of molecules **1** to **7** was assessed on PDA medium as described by Siah *et al.* (2010b).³¹ Petri dishes were filled with medium amended with the corresponding molecule at 50°C following autoclaving. Five concentrations obtained by serial dilutions (5, 1.67, 0.55, 0.18 and 0.06 mM) were tested in order to calculate half-maximal *inhibitory* concentration (IC₅₀) for each molecule; the highest concentration being the same concentration used for the treatments in the greenhouse (5 mM). An aliquot of 5 µL containing $5 \cdot 10^5$ spores.mL⁻¹ of the *Z. tritici* strain T02596 was spotted on each Petri dish. Four replicates were used for each condition. Both media without any molecule and with ethanol were used as experimental controls. Petri dishes were incubated for eight days at 20 °C in the dark. Colony perpendicular diameters were measured for each spot and compared to spots developed on control media. Heliosol® was also evaluated for its direct antifungal activity using the field-approved concentration recommended by the manufacturer (0.2%), used in the greenhouse.

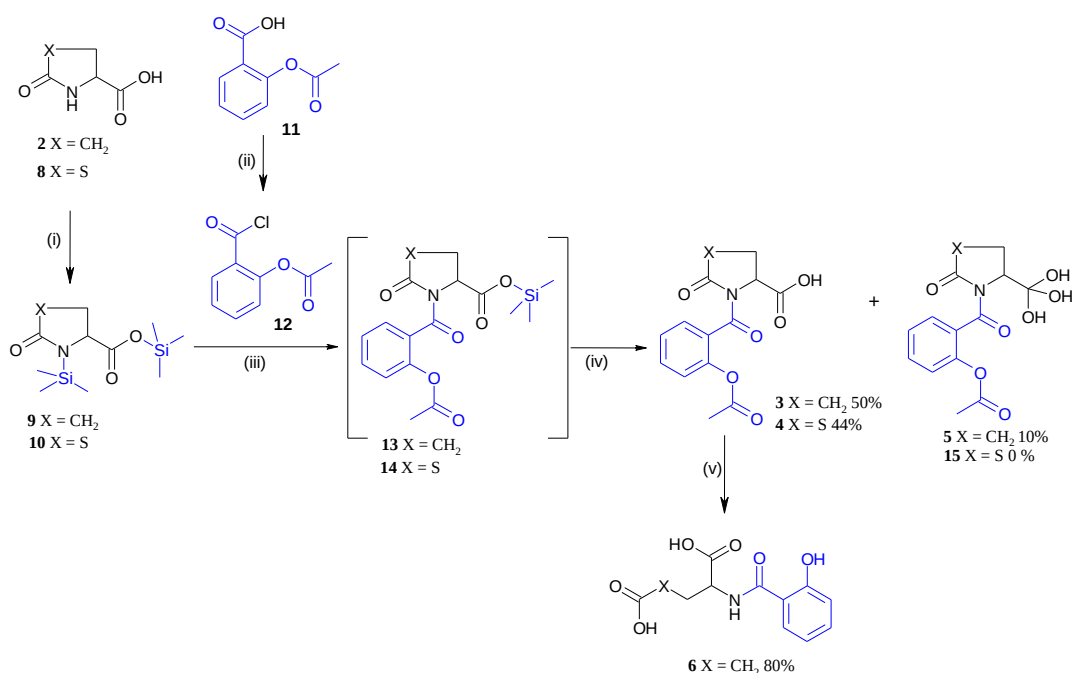
Statistical analyses

Statistical analysis of protection assays was carried out using the Tukey test at a significance level of $P = 0.05$, with the XLSTAT software (Addinsoft, France). For *in vitro* assay, IC_{50} value of each molecule was determined from the corresponding dose-response curve, using the GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, Inc., USA).

Results

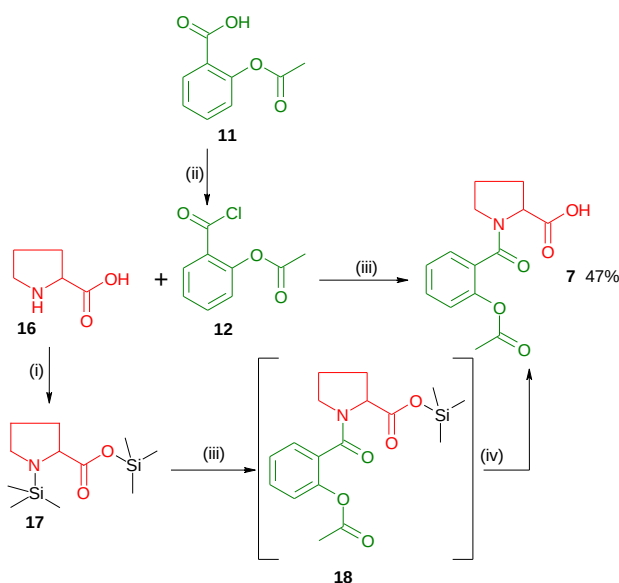
Design and chemical synthesis of target molecules

The synthetic strategy started with the activation of the carboxylic acid of acetylsalicylic acid (**11**) by conversion to acetylsalicylic acid chloride (**12**) using thionyl chloride ($SOCl_2$) in the presence of a catalytic amount of dimethylformamide (DMF) (Scheme 1). In order to obtain the conjugated structure between SA (**1**) and PGA (**2**), acid chloride (**12**) was furthermore treated with silylated derivative (**9**) obtained from PGA (**2**) upon refluxing in hexamethyldisilazane in presence of catalytic amount of saccharin. The same synthetic pathway was used to obtain the conjugated structure of SA (**1**) and 2-oxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid (**8**) (compound **4**, Scheme 1). This product was synthesized in order to evaluate the importance of the pyrrolidin-2-one unit of heterocycle (**3**) on wheat protection and thus enrich structure-activity relationships of the series. PGA (**2**) was commercially available while 2-oxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid (**8**) was synthesized from reaction between L-cysteine and phenyl chloroformate in toluene, by adapting a reported procedure.³² Hybrid compounds **3** and **4** have been thus afforded in 50 and 44% yield respectively (Scheme 1) by methanol treatment of silylated esters **13** and **14** obtained *in situ*, not isolated. In the case of carboxylic acid (**3**), the corresponding ortho acid (**5**) was also achieved in 10% yield; however, the same hydration analogue was not observed in the synthesis of thiazolidinone (**4**). Finally, the ring opening of the lactam ring of **3** permitted the formation of diacid (**6**) and the loss of the acetyl protecting group of the phenol unit in good 80% yield as the unique reaction product (Scheme 1). Diacid **6**, a SA-glutamic acid conjugate, has previously been described as prodrug of SA, utilizing hydrolysis in rabbit intestinal microorganisms.³³



Scheme 1. Reagents and conditions: (i) HMDS, saccharine cat., reflux, 2-6 h; (ii) SOCl₂, DMF, 70-75 °C, 3 h; (iii) CH₂Cl₂, 60 °C, 24-48 h; (iv) MeOH, then H₂O, rt; (v) MeONa/MeOH, 24 h, reflux.

In order to study the impact of the carbonyl unit in position 2 of heterocyclic ring on biological evaluation, proline derivative **7** has also been designed (Scheme 2). This target compound was obtained starting from L-proline (**16**) using a similar synthetic strategy described in Scheme 2. Proline derivative **7** has been already reported in the literature only in human therapeutic chemistry context and tested for the anti-inflammatory activity.³⁴



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) HMDS, saccharine cat., reflux, 4 h; (ii) SOCl₂, DMF, 70-75 °C, 3 h; (iii) CH₂Cl₂, 60 °C, 24 h; (iv) MeOH, rt.

SA and derivatives protect wheat against *Z. tritici*

SA (1), PGA (2) and derived molecules 3-7 were tested in the greenhouse for their protection efficacy on the wheat cultivar Alixan against *Z. tritici*. High levels of disease were observed on control plants. Indeed, disease symptoms reached 51.4% of the third leaf area in the non-treated inoculated control (Figure 2.). Plants treated with water amended with 1% ethanol and 0.2% Heliosol® (showing 52.8% of diseased leaf area) did not exhibit any difference with the control plants (Figure 2.).

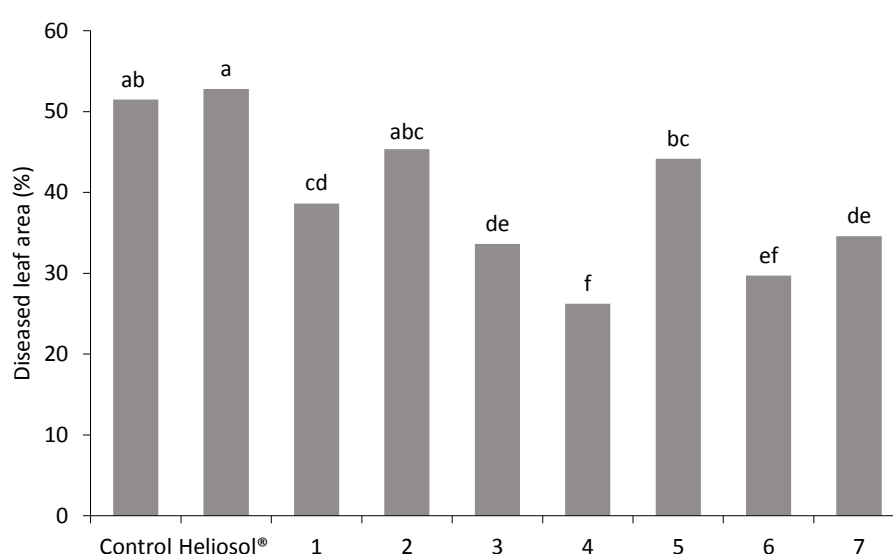


Figure 2. Disease severity level on wheat plants (cultivar Alixan) treated or not with 5mM of SA (1), PGA (2) and derived molecules 3-7, at 21 days after inoculation with the *Zymoseptoria tritici* strain T02596. Heliosol® used as adjuvant was also tested as an independent treatment. Means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

Disease scoring at 21 dpi revealed significant protection levels conferred by SA (1) (25% disease reduction) and to various extents by four among the five derived tested molecules (3, 4, 6 and 7), while no significant protections were conferred by PGA (2) and ortho acid (5) (Table 1). The highest protection level was obtained with molecule 4 (49% disease reduction).

SA (1), PGA (2), derived molecules 3-7 and the adjuvant Heliosol®, were evaluated for their direct effect against *Z. tritici* using the spotting test on solid PDA medium. The mean value of perpendicular diameters of developed colonies in the control was 0.6 mm. Ethanol and PGA (2) did not show any direct effect on fungal growth with all tested concentrations. However,

SA (**1**) and molecules **4** and **5** exhibited significant direct activity on *Z. tritici*, mainly at the highest tested concentration. Calculated IC₅₀ values of SA (**1**) and molecules **4** and **5** were 3.2 mM, 3.6 mM and 3.9 mM, respectively (Table 1), while the other molecules did not display any antifungal effect against the pathogen (IC₅₀ values higher than 5 mM). Heliosol® adjuvant completely inhibited fungal development on PDA medium at the used 0.2% concentration (data not shown). Nevertheless, this adjuvant it did not exhibit any protective effect when tested as a foliar treatment in the greenhouse at the same 0.2% concentration (Figure 2.).

Table 1. Biological activities (disease reduction *in planta* and fungal inhibition *in vitro*) of salicylic acid (SA) **1**, pyroglutamic acid (PGA) **2** and corresponding derivatives **3-7** against *Zymoseptoria tritici*.

Molecule	1 (SA)	2 (PGA)	3	4	5	6	7
<i>In planta</i> protection efficacy (%)*	25	12	34	49	14	42	33
<i>In vitro</i> antifungal activity, IC ₅₀ (mM)	3.2	> 5	> 5	3.6	3.9	> 5	> 5

* Rate of disease reduction recorded in the greenhouse at 5mM, calculated by comparing disease extent obtained for each molecule to disease extent highlighted for water-treated inoculated control.

Values in bold are different from the control according to the Tukey test at $P = 0.05$.

Discussion

The increasing concern related to the environmental effect of synthetic pesticide use, and the ability of *Z. tritici* populations to overcome control strategies, make urgent the development of alternative and more sustainable disease management tools such as elicitors and biofungicides. Hence, we assessed here the potential of SA, PGA and new functionalized derivatives **3-7** to protect wheat against *Z. tritici*. The results of greenhouse assays showed that SA and conjugated molecules **3**, **4**, **6** and **7** allowed significant reductions of disease symptoms when compared to water-treated inoculated control. Protections ranged between 25% and 49%. The best protective molecule was thiazolidin-2-one (**4**), which can be considered as prodrug of SA. The prodrug **6** with glutamic acid and SA conjugated moieties was the second most promising compound and exhibited 42% wheat protection. PGA-SA conjugate **3** showed diminished elicitor activity without direct fungicide activity. The importance of the carbonyl unit of the pyrrolidone ring was investigated with compound **7**. Indeed, the suppression of the carbonyl unit did not influence the resulting biological activity level of proline-SA conjugate **7** (compound **3** vs compound **7**, Schemes 1 and 2, Table 1).

We scored significant direct antifungal activities using the *in vitro* bioassays. SA and molecules **4** and **5** inhibited fungal growth at the highest tested concentration (5 mM) and their determined IC₅₀ were about 3.2 mM (0.4 g/L), 3.6 mM (1.1 g/L) and 3.9 Mm (1.1 g/L), respectively (Table 1). These IC₅₀ values are particularly high and highlight a low antifungal activity on *Z. tritici* when compared to other natural compounds tested on the same fungus, such as effusol and mycosubtilin which showed IC₅₀ values of 0.009 and 0.001 g/L, respectively.^{35,36} Previous studies have also showed that SA exhibits direct antifungal activities at lower concentrations. For instance, SA completely inhibited the germination of *Penicillium expansum* conidia at 2.5 mM³⁷ and about 70% of growth on other pathogens such as *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora sp.*^{38,39} The Heliosol® adjuvant, which did not confer any protection of wheat *in planta*, surprisingly displayed a strong inhibitory effect on fungal growth *in vitro*. Such a direct effect can result from a high concentration of the product being in contact with the fungus in *in vitro* conditions. The absence of protection *in planta* may be due to the absorption of the wetting agent by the plant, its degradation by light, temperature or its evaporation, making the concentration in contact with the fungus much lower than the *in vitro* concentration. Further analyses are needed to understand the fate of the wetting agent within the plant.

Based on biological results, the molecules obtained and tested here can be categorized as follows: i) compounds owning a low direct fungicide activity and providing wheat protection (SA and prodrug of SA containing thiazolidin-2-one moiety **4**); ii) products owning a low direct fungicide activity and no plant protection (ortho acid, **5**); iii) molecules without any direct fungicide activity and providing wheat protection (prodrugs of SA containing pyroglutamic, glutamine and proline moiety, **3**, **6**, **7**); and finally iv) inactive compounds with no direct fungicide activity nor protection (PGA). Regarding these results, the protection effect obtained in plants treated with SA and the molecule **4**, may be due to the induction of plant resistance and/or to a direct activity on *Z. tritici* growth, so both effects may have contributed to the disease reduction on wheat plants. On the other hand, we can rule out the possibility that the protection of wheat against *Z. tritici* under greenhouse conditions, in response to the tested molecules (**3**, **6** and **7**), was only due to the induction of plant resistance mechanisms. Regarding plant defense mechanisms induced on bread wheat by SA and derived compounds, Tayeh et al., (2013)²¹ highlighted that protection level conferred by HSA on wheat against *Bgt* is higher than the one reached with SA treatment (95% compared to 50%). This difference has been explained by a possible differential activation of lipid metabolism by the two compounds.²¹ Compared to SA,

HSA resulted in earlier up-regulations of the gene encoding for phospholipase C2 and it specifically affected the expression of the gene encoding for lipid transfer in non-infected conditions. After fungal challenge, HSA induced continuous increases of a (lipoxygenase) LOX-encoding gene expression and of the corresponding LOX activity when compared to SA-sprayed leaves. In our work, protection against *Z. tritici* after SA treatment was lower than the one conferred by the SA derivatives **3**, **4**, **6** and **7**. According to Bektas and Eulgem (2015), the SA response pathway may involve several receptors, and various SA related molecules would probably interfere in different manners.

Our starting hypothesis based on the increase of SA eliciting activity level with prodrugs has thus been confirmed, since compounds **3**, **6** and **7** showed an increased plant protection levels when compared to parent SA. Further analyses are needed to identify defense pathways involved in the resistance induced in wheat against *Z. tritici* in order to (i) decipher mechanisms explaining the different level of wheat protection observed between SA derivatives and the parent SA and (ii) understand similarities between the resistance pathways enhanced towards biotrophic and hemibiotrophic fungi. Improvements in the studied series of molecules would be of particular interest in order to develop a new generation of potent wheat elicitors with better efficiency, low toxicity and upgraded absorbance. In order to optimize the biological activity of the molecules, it will be necessary to test various concentrations, formulations, cadencies of application, and to perform field experimentations.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting information

The Supporting Information is available free of charge on the ...

Synthetic procedures and NMR Spectra (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding author

*(A.G.) E-mail: alina.ghinet@yncrea.fr. Phone: (+33) 328384858.

Acknowledgments

The authors warmly thank the “Fondation de la Catho de Lille, France”, the “Matériaux Verts Fonctionnels” program, Yncréa Hauts-de-France for their financial support of this work (S.M.’s

PhD and C.-M. A.'s post-doc scholarships). This work has been carried out in the framework of Alibiotech project founded by the European Union, the French State and the French Region Hauts-de-France.

References

- (1) Fones, H.; Gurr, S. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* **2015**, 79, 3-7.
- (2) Torriani, S. F. F.; Melichar, J. P. E.; Mills, C.; Pain, N.; Sierotzki, H.; Courbot, M. *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet. Biol.* **2015**, 79, 8-12.
- (3) Fraaije, B. A.; Cools, H. J.; Fountaine, J.; Lovell, D. J.; Motteram, J.; West, J. S.; Lucas, J. A. Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **2005**, 95, 933-941.
- (4) Palmer, C. L.; Skinner, W. *Mycosphaerella graminicola*: Latent infection, crop devastation and genomics. *Mol. Plant Pathol.* **2002**, 3, 63-70.
- (5) Lemire, G.; Nguyen, M. L.; Fassotte, B.; Du Jardin, P.; Verheggen, F.; Delaplace, P.; Jijakli, M. H. Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. A review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2016**, 20, 299-313.
- (6) Yusuf, M.; Hayat, S.; Alyemeni, M. N.; Fariduddin, Q.; Ahmad, A. Salicylic Acid: Physiological Roles in Plants in SALICYLIC ACID. Springer, Dordrecht. **2013**, 15-30.
- (7) Gaffney, T.; Friedrich, L.; Vernooij, B.; Negrotto, D.; Nye, G.; Uknes, S.; Ward, E.; Kessmann, H.; Ryals, J. Requirement of salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. 1993, 261, 754-6
- (8) Faize, L.; Faize, M. Functional analogs of salicylic acid and their use in crop protection. *Agronomy*. 2018, 8, 5
- (9) Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005, 43, 205–227
- (10) Vlot, A. C.; Dempsey, D. M. A.; Klessig, D. F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2009, 47, 177–206
- (11) Molinari, S.; Loffredo, E. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2006**, 68, 69-78.
- (12) Pancheva, T.V.; Popova, L.; Uzunova, A.N. Effects of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *J Plant Physiol.* **1996**, 149:57-63.
- (13) Uzunova, A.N. and Popova, L. Effect of salicylic acid on leaf anatomy and chloroplast ultrastructure of barley plants. *Photosynthetica*. **2000**, 38(2) 243-250
- (14) Mauch, F.; Mauch-Mani, B.; Gaille, C.; Kull, B.; Haas, D.; Reimann, C. Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J*, **2001**, 25: 67–77
- (15) War, A.R.; Paulraj, M.G.; War, M.Y.; Ignacimuthu S. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietum* L.). *Plant Signal Behav.* **2011**, 6:1787-1792.

- (16) Durango, D.; Pulgarin, N.; Echeverri, F.; Escobar G.; Quiñones, W. Effect of Salicylic Acid and Structurally Related Compounds in the Accumulation of Phytoalexins in Cotyledons of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Molecules*. **2013**, 18, 10609-10628
- (17) Reignault, Ph.; Walters, D. Topical application of inducers for disease control. In, Walters D., Newton A., Lyon G., editors. (eds), *Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection*. Blackwell Publishing, Ames, **2007**, 179–200.
- (18) Lyon G. Agents that can elicit induced resistance. In, Walters D., Newton A., Lyon G., editors. (eds), *Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection*. Blackwell Publishing, Ames, **2007**, 9–23.
- (19) Bektas, Y.; Eulgem, T. Synthetic plant defense elicitors. *Front Plant Sci*. **2015**, 26; 804
- (20) Iwai, T.; Seo, S.; Mitsuhashi, I.; Ohashi, Y. Probenazole-Induced Accumulation of Salicylic Acid Confers Resistance to *Magnaporthe grisea* in Adult Rice Plants. *Plant Cell Physiol*. **2007**, 48, 915-924.
- (21) Tayeh, C.; Randoux, B.; Bourdon, N.; Reignault, P. Lipid metabolism is differentially modulated by salicylic acid and heptanoyl salicylic acid during the induction of resistance in wheat against powdery mildew. *J. Plant Physiol*. **2013**, 170, 1620-1629.
- (22) Li, K.; Xu, E. The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. *Neurosci. Bull*. **2008**, 24, 195-200.
- (23) Shelp, B. J.; Bozzo, G. G.; Trobacher, C. P.; Zarei, A.; Deyman, K. L.; Brikis, C. J. Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Sci*. 2012, 193, 130-135.
- (24) Saito, T.; Matsukura, C.; Sugiyama, M.; Watahiki, A.; Ohshima, I.; Iijima, Y.; Konishi, C.; Fujii, T.; Inai, S.; Fukuda, N.; Nishimura, S.; Ezura, H. Screening for γ -aminobutyric acid (GABA)-rich tomato varieties. *J. Japan. Soc. Hort. Sci*. **2008**, 77, 242-250.
- (25) Yu, C.; Zeng, L.; Sheng, K.; Chen, F.; Zhou, T.; Zheng, X.; Yu, T. γ -Aminobutyric acid induces resistance against *Penicillium expansum* by priming of defense responses in pear fruit. *Food Chem*. **2015**, 159, 29-37.
- (26) Yang, J.; Sun, C.; Zhang, Y.; Fu, D.; Zheng, X.; Yu, T. Induced resistance in tomato fruit by γ -aminobutyric acid for the control of alternaria rot caused by *Alternaria alternata*. *Food Chem*. **2016**, 221, 1014-1016.
- (27) Seifi, H. S. ; Curvers K., De Vleeschauwer, D. ; Delaere, I. ; Aziz, A. ; Höfte, M.. Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-deficient sitiens mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. *New Phytol*. **2013**, 199, 490–504.
- (28) Schilling, S.; Stenzel, I.; von Bohlen, A.; Wermann, M.; Schulz, K.; Demuth, H.-U.; Wasternack, C. Isolation and characterization of the glutamyl cyclases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*: implications for physiological functions. *Biol. Chem*. **2007**, 388, 145-153.
- (29) L'observatoire des cosmétiques, <http://www.observatoiredescosmetiques.com/actualite/ingredients/le-pca-ou-acide-l-pyrrolidone-carboxylique-partie-1-2892> (consulted on 06/07/2017).
- (30) Siah, A.; Deweer, C.; Duyme, F.; Sanssené, J.; Durand, R.; Halama, P.; Reignault, P. Correlation of in planta endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathol*. **2010a**, 59, 661-670.

- (31) Siah A.; Deweer C.; Morand E.; Reignault P.; Halama P. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Prot.*, 2010b, 29, 737-743.
- (32) Seki, M.; Hatsuda, M.; Mori, Y.; Yoshida, S.-I.; Yamada, S.-I.; Shimizu, T. A Practical Synthesis of (+)-Biotin from L-Cysteine. *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 6102-6110.
- (33) Nakamura, J.; Asai, K.; Nishida, K.; Sasaki, H. A novel prodrug of salicylic acid, salicylic acid-glutamic acid conjugate utilizing hydrolysis in rabbit intestinal microorganisms. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40, 2164-2168.
- (34) Khalikov, Sh. Kh.; Kodirov, M.; Alieva, S. V. Synthesis and anti-inflammatory activity of acetylsalicylamino acids and peptides. *Chem. Nat. Comp.* 2006, 42, 204-207.
- (35) Sahli, R. ; Rivière, C. ; Siah, A. ; Smaoui, A. ; Samaillie, J. ; Hennebelle, T. ; Roumy, V. ; Ksouri, R. ; Halama, P. ; Sahpaz, S. Biocontrol activity of effusol from *Juncus maritimus* extremophile plant against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, 1-9.
- (36) Mejri, S.; Siah, A.; Coutte, F.; Magnin-Robert, M.; Randoux, B.; Tisserant, B.; Krier, F.; Jacques, P.; Reignault, P.; Halama, P. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, 1–12.
- (37) da Rocha Neto, A. C.; Maraschin, M.; Di Piero, R. M. Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 215, 64-70
- (38) El-Mohamedy, R.S.R.; Abdel-Kader, M.M.; Abd-El-Kareem, F.; El-Mougy N.S. Essential oils, inorganic acids and potassium salts as control measures against the growth of tomato root rot pathogens *in vitro*. *J. Agric. Technol.* 2013, 9, 1507-1520.
- (39) Panahirad, S.; Nahandi, F.Z.; Safaralizadeh, R.; Alizadeh-Salteh, S. Postharvest control of *Rhizopus stolonifer* in peach (*Prunus persica* L. Batsch) fruits using salicylic acid. *J. Food Saf.* 2012, 32, 502-507.

Article 4

Les lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* protègent le blé contre *Zymoseptoria tritici*

Nous avons étudié l'effet de trois lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* (mycosubtiline, M; surfactine, S; fengycine, F) ainsi que deux mélanges (M+S et M+S+F) sur le pathosystème blé-*Zymoseptoria tritici*. Les traitements ont été réalisés sur deux cultivars sensibles de blé (Alixan et Dinosor), 48h avant inoculation avec deux souches pathogènes (T02596 et T01193, respectivement). Les meilleurs niveaux de protection ont été obtenus avec les traitements contenant la mycosubtiline seule ou en mélange. S et F ont aussi permis d'obtenir des niveaux de protection significatifs par rapport au témoin non traité inoculé bien que les protections soient inférieures à celles conférées par M. Les tests *in vitro* et *in planta* ont montré que les formulations contenant M inhibent la croissance fongique. Ces résultats confirment que l'efficacité observée *in planta* est due principalement à l'effet antifongique de M. S et F n'ont montré aucun effet direct sur le champignon, ce qui suggère qu'ils agissent comme stimulateurs des défenses des plantes plutôt que par une action directe. Cette étude a mis en évidence (i) l'efficacité de différents lipopeptides à protéger le blé contre *Z. tritici* et (ii) leurs modes d'action distincts et dépendant des molécules.

Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*

Samara Mejri¹, Ali Siah¹, François Coutte², Maryline Magnin-Robert³, Béatrice Randoux³, Benoit Tisserant³, François Krier², Philippe Jacques^{2,4}, Philippe Reignault³, Patrice Halama^{1*}

¹ ISA, EA 7394-ICV Institut Charles Viollette, SFR Condorcet FR CNRS 3417, F-59000 Lille, France

² Université de Lille, EA 7394-ICV Institut Charles Viollette, SFR Condorcet FR CNRS 3417, F-59000 Lille, France

³ Univ. Littoral Côte d'Opale, UCEIV-EA 4492, SFR Condorcet FR CNRS 3417, CS 80699, F-62228, Calais cedex, France

⁴ Microbial Processes and Interactions, TERRA Research Centre, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, Passage des Déportés, 2, 5030, Gembloux, Belgium

*Corresponding author : Patrice Halama (patrice.halama@yncrea.fr), +33 (0)3 28 38 46 20

Abstract

Innovation towards eco-friendly plant protection products compatible with sustainable agriculture and healthy food is today strongly encouraged. Here, we assessed the biocontrol activity of three cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* (mycosubtilin, M; surfactin, S; fengycin, F), and two mixtures (M+S and M+S+F) on wheat against *Zymoseptoria tritici*, the main pathogen on this crop. Foliar application of these biomolecules at a 100 mg L⁻¹ concentration on the wheat cultivars Dinosor and Alixan, two days before fungal challenge inoculation, provided significant reductions of disease severity. The best protection levels were recorded with the M-containing formulations (up to 82 % disease reduction with M+S on Dinosor), while S and F treatments resulted in lower but significant disease reductions. *In vitro* and *in planta* investigations revealed that M-based formulations inhibit fungal growth, with half-maximal inhibitory concentrations of 1.4 mg L⁻¹ for both M and M+S and 4.5 mg L⁻¹ for M+S+F, thus revealing that the observed efficacy of these products may rely mainly on antifungal property. By contrast, S and F had no direct activity on the pathogen, hence suggesting that these lipopeptides act on wheat against *Z. tritici* as resistance inducers rather than as biofungicides. This study highlighted the efficacy of several lipopeptides from *B. subtilis* to biocontrol *Z. tritici* through likely distinct and biomolecule-dependent modes of action.

Key words Wheat, *Zymoseptoria tritici*, Biocontrol, *Bacillus subtilis*, Lipopeptides, Mycosubtilin

Introduction

Septoria tritici blotch (STB) caused by *Zymoseptoria tritici* formerly known as *Mycosphaerella graminicola* is currently the most damaging foliar disease on wheat crops worldwide, especially in regions with suitable climate conditions such as Western Europe (Jorgensen et al. 2014). Severe disease epidemics can reduce wheat yields by more than 50% (Ponomarenko et al. 2011). Because of its economic importance, experimental amenability and growing interest within scientist and agronomist communities, *Z. tritici* has been considered as a model for the order Dothideales (Kema et al. 2008) and was recently ranked among the top ten fungal pathogens in the area of molecular plant pathology (Dean et al. 2012). *Z. tritici* is a hemibiotrophic fungus characterized by a symptomless period of about two weeks (Palmer and Skinner 2002; Fones and Gurr 2015), during which fungal hyphae grow between leaf mesophyll cells without inducing any host necrosis, followed by a short necrotrophic phase of only one week associated with an increase in fungal biomass, production of cell-wall degrading enzymes, necrosis development, and pycnidium formation (Kema et al. 1996; Siah et al. 2010a). Since host resistance against *Z. tritici* is not fully effective in most wheat cultivars, disease control relies mainly of the use of conventional fungicides. In Europe, farmers spend every year around 1.3 billion Euros on synthetic fungicides to protect wheat against diseases, mainly STB (Torriani et al. 2015). However, the use of these products is increasingly controversial because of their potential negative impacts on both the environment and human health. In addition, the durability of chemical and genetic control strategies is regularly compromised in the field since *Z. tritici* frequently develops resistance to fungicides and circumvents host resistance (Cowger et al. 2000; Cheval et al. 2017). This is due to its high biological fitness degree resulting very likely from its frequent sexual reproduction and genetic recombination in the field (Siah et al. 2010b, 2013; El Chartouni et al. 2011).

The development of environment-friendly and less hazardous phytosanitary products is currently encouraged, especially in Europe, where several national action plans aiming at reducing the use of synthetic conventional fungicides in agriculture were set up (Ravensberg et al. 2015). The use of biocontrol agents, also referred as biofungicides, to control plant pests and diseases is a promising alternative approach for plant protection. Today, biocontrol products hold just 5 % of the worldwide crop protection market (approximately \$3 billion in value), but this segment of the industry is growing and it is projected to increase by 8.84% annually, reaching more than 7 % of the total crop protection market by 2025 (more than \$4.5 billion in value) (Olson 2015). Various types of biocontrol agents, including beneficial microbes and their

metabolites, plant and microbial cell-wall extracts, even minerals and ions, have been reported to impair attacks by plant bio-aggressors (Siah et al. 2017). Among beneficial microbes, *Bacillus* spp., one of the commonly isolated endophytic bacteria, have received considerable attention since several species of this genera confer several positive effects to the plant such as promotion of plant growth and/or enhancement of protection against abiotic and biotic stresses (Pérez-Montano et al. 2014). Biocontrol effect of *Bacillus* species against pathogen attacks is mainly attributed to the production of cyclic lipopeptides, which are amphiphilic molecules consisting of a short peptide chain linked to a lipid tail (Ongena and Jacques 2008; Raaijmakers et al. 2010). Some *Bacillus* species, such as *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens*, may dedicate up to 8% of their genetic equipment to the synthesis of a wide array of antimicrobial compounds, including lipopeptides (Chen et al. 2009; Rückert et al. 2011). Bacterial lipopeptides are synthesized by multi-enzymatic proteins called non-ribosomal peptide synthetases, which confers considerable structural diversity to the molecules and results in the production of linear, branched or cyclic low toxic compounds (Strieker et al. 2010; Deravel et al. 2014). According to their amino acid sequence, cyclic lipopeptides are divided into three families: iturins (mycosubtilin, iturin A, and bacillomycin), surfactin and fengycin (Xun-Chao et al. 2013; Guo et al. 2014). Members of the iturin family are heptapeptides with a β -amino fatty acid, while members of the fengycin family, including the related plipastatin, are decapeptides with a β -hydroxy fatty acid (Romero et al. 2007; Jacques 2011). The surfactin family consists of heptapeptides containing a β -hydroxy fatty acid. Cyclic lipopeptides display a broad biological activity against several phytopathogens through direct antagonistic effect and/or the induction of plant immunity system (Ongena and Jacques 2008; Deravel et al. 2014; Farace et al. 2015; Chandler et al. 2015). Members of iturin and fengycin families are mainly known for their antifungal properties, while molecules from surfactin family are powerful biosurfactants also able to induce systemic resistance in plant (Touré et al. 2004; Ongena and Jacques 2008). Although bacterial cyclic lipopeptides have already been tested on a broad spectrum of pathogens, they have never been assessed against *Z. tritici*, despite the economic and environmental importance of this pathogen. In addition, no biocontrol active substance is available to date in Europe as plant protection product against *Z. tritici*, except laminarin (Vacciplant®, Goëmar, France), which is a low-molecular-weight polysaccharide registered as plant resistance inducer toward this pathogen. The aim of the present study was thus to investigate for the first time biocontrol activity on wheat against *Z. tritici* of mycosubtilin, surfactin and fengycin lipopeptides produced by the *B. subtilis* strains BBG125, BBG131 and Bs2504, respectively, and two mixtures of them (mycosubtilin + surfactin and mycosubtilin +

surfactin + fengycin). Furthermore, the mode of action of these lipopeptides was examined by assessing their direct activity toward *Z. tritici* using both *in vitro* and *in planta* bioassays.

Materials and methods

Lipopeptide production, purification and analysis

The different lipopeptides used in this study were produced and purified using three different strains of *B. subtilis* (Table 1), according to Coutte et al. (2013). All lipopeptides, including surfactin, fengycin and mycosubtilin, were produced using a specific corresponding strain. These lipopeptides produced by separate strains were then used to reconstitute lipopeptide mixtures (Table 1).

Table 1 Different lipopeptides used in this study and their producing *Bacillus subtilis* strains

Lipopeptide(s)	<i>B. subtilis</i> strain	Reference
mycosubtilin	BBG125	Béchet et al. 2013
surfactin	BBG131	Coutte et al. 2010a
fengycin	Bs2504	Ongena et al. 2007
mycosubtilin + surfactin	Mix (50:50 w/w)	
mycosubtilin + surfactin + fengycin	Mix (33:33:33 w/w/w)	

Mix: lipopeptides were first produced by monoproducer strains and then purified and mixed together

After the production and purification process, the different lipopeptides fractions were lyophilized and the purity of the powder was determined using reversed phase high-performance liquid chromatography RP-HPLC according to Coutte et al. (2010b) and Béchet et al. (2013) in comparison to external standards of these biomolecules supplied by Lipofabrik (Villeneuve d'Acsq, France) and Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Lipopeptide powders were dissolved in 0.1 % dimethyl sulfoxide (DMSO) by taking into account the purity of every lipopeptide. For all further bioassays, equivalent volumes of DMSO (0.1 %) were added to control treatments. The characterization of lipopeptide powders was carried out using HPLC-mass spectrometry (HPLC-MS), according to Hamley et al. (2013).

Plant growth, treatment and inoculation

Grains of the susceptible wheat cultivars Dinosor (Unisigma, Froissy, France) and Alixan (Limagrain, Saint-Beauzire, France) were pre-germinated in Petri dishes (12 x 12 cm) on moist filter paper, according to Siah et al. (2010a). Germinated grains were placed into three-liter pots filled with universal loam (Gamm Vert, France). Six pots of 12 grains were used as replicates for each condition. The pots were placed in the greenhouse at $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ with a day-night cycle of 16/8 h using supplementary illumination. After three weeks (third leaves from the base of plants fully expanded), plants of each pot were treated with 30 mL at 100 mg L^{-1} of each lipopeptide or mixture solution amended with 0.05 % polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20, Sigma Aldrich, USA) surfactant, using a manual hand sprayer. Plants treated with epoxiconazole (triazole) at 100 mg L^{-1} (Opus[®], BASF Agro SAS, France) were used as a fungicide reference control. Two days after treatments, plants of each pot were inoculated using a manual hand sprayer with 30 mL spore suspension (10^6 spores mL^{-1}) supplemented with 0.05 % Tween 20. Dinosor and Alixan cultivars were inoculated with the *Z. tritici* strains T01193 and T02596, isolated in 2009 and 2014 from Northern France, respectively. These two strains were chosen because they showed in preliminary experiments a high level of virulence on each corresponding cultivar. Spore suspensions were produced on potato dextrose agar medium (PDA), according to Siah et al. (2010a). Both inoculated and non-inoculated control plants were pretreated with sterile distilled water containing Tween 20 surfactant alone. Immediately after inoculation, each pot was covered with a clear polyethylene bag for three days in order to ensure a water-saturated atmosphere compatible with good fungal germination. The disease severity was scored at 21 days post-inoculation (dpi) by assessing the percentage of the third leaf area covered by lesions (chlorosis or necrosis) bearing or not pycnidia.

In vitro antifungal assay

Direct activity of the lipopeptides was assessed using the strain T01193 in clear and sterile flat-bottomed polystyrene 96-well-plates (Iwaki, Asahi techno glass, Japan), according to Siah et al. (2010c). Lipopeptides and mixtures were added to the medium at 50°C following autoclaving. Plate wells were each filled with 150 μL of liquid glucose peptone medium (14.3 g L^{-1} dextrose (VWR), 7.1 g L^{-1} bacto-peptone (Difco laboratories) and 1.4 g L^{-1} yeast extract (Merck)) amended with lipopeptides at 100, 33.3, 11.1, 3.7, 1.2, 0.4, 0.14, 0.05, 0.015 and 0.005 mg L^{-1} (final concentrations in 200 μL of medium). Aliquots of 50 μL containing 2.10^5 spores

mL⁻¹ (Siah et al. 2010c) of the *Z. tritici* strain T01193 were added to each plate well. Eight wells were used as replicates for each condition. In each microplate, non-inoculated medium without lipopeptide, as well as inoculated medium without lipopeptide, were used as experimental controls. Two synthetic fungicides, bixafen (pyrazole-carboxamide) and epoxiconazole (triazole) (Sigma Aldrich, France), were included in the assay as fungicide references. Plates were incubated for six days at 20°C in the dark while being shaken at 140 rpm, after which fungal growth was measured using a plate reader (MRX, Dynex technologies) at 405 nm.

***In planta* cytological assay**

Monitoring of spore germination and hyphal growth of the strain T02596 on the leaf surface of Alixan cultivar was performed using Fluorescence Brightener 28 (Calcofluor, Sigma Aldrich), according to Siah et al. (2010a) with few modifications. Briefly, wheat leaf segments (4 cm) were harvested 1 and 5 dpi from control and plants sprayed or not with different lipopeptides and then immersed for 5 min in a solution of 0.1 % (w/v) Calcofluor, 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.5. Three third-leaf segments from different plants and different pots were used as replicates for each condition. Leaf segments were then washed for 1 min with sterile distilled water. After drying in darkness at laboratory temperature, they were placed on a glass slide, covered with a cover slip and observed microscopically (Nikon, Eclipse 80i) under ultraviolet (UV) illumination. Pictures were taken with digital camera (DXM1200C) using image capture software (NIS-ELEMENTS BR). The percentage of germinated spores was calculated at 1 dpi on 100 different fungal spores on each leaf segment. The effect of lipopeptides on fungal hyphal growth was assessed at 5 dpi. Five classes of fungal growth events were recorded from 100 fungal spores on each leaf segment (class 1, non-germinated spore; class 2, germinated spore with small germ tube; class 3, germinated spore with developed germ tube; class 4, germinated spore with a strongly developed germ tube; class 5, germinated spore giving a strong hyphal growth).

Statistical analyses

Comparisons between rates of disease severity, *in planta* spore germination and *in planta* hyphal growth were carried out with the Tukey test at a significance level of $P = 0.05$ using the XLSTAT software (Addinsoft, France). For *in vitro* assay, a half maximal inhibitory concentration

IC₅₀ value was calculated from dose-response curve of each lipopeptide, mixture, or fungicide reference using the GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, Inc., USA). Correlation between protection efficacies found on the cultivar Dinosor inoculated with the strain T01193 (percentages of disease severity reduction compared to the non-treated inoculated control plants), and IC₅₀ values obtained *in vitro* for tested lipopeptides or mixtures using the strain T01193, were assessed with the principal component analysis (PCA) based on the Pearson test, using the XLSTAT software. All experiments were repeated twice in two independent assays, except the *in planta* hyphal growth bioassay which was performed in one biological experiment.

Results

Lipopeptide characterization

HPLC-MS analysis was carried-out on the different samples of lipopeptides used in this study (Fig. 1). Results showed that surfactin is composed of different isoforms with fatty acid chain length from C₁₂ to C₁₆ carbons ($[M^+H]^+ : 994.64 = C_{12}$; $[M^+H]^+ : 1008.66 = C_{13}$; $[M^+H]^+ : 1022.67$ and $[M^+Na]^+ : 1044.66 = C_{14}$; $[M^+H]^+ : 1036.69$ and $[M^+Na]^+ : 1058.67 = C_{15}$). Mycosubtilin is composed of different isoforms with fatty acid chain from C₁₅ to C₁₈ carbons ($[M^+H]^+ : 1057.57 = C_{15}$; $[M^+H]^+ : 1071.58 = C_{16}$; $[M^+H]^+ : 1085.60 = C_{17}$; $[M^+H]^+ : 1099.61 = C_{18}$). Fengycin is composed of different isoforms of fengycin A and B with saturated fatty acid chain from C₁₄ to C₁₈ carbons ($[M^+H]^+ : 1435.79 = A-C_{14}$; $[M^+H]^+ : 1449.79 = A-C_{15}$; $[M^+H]^+ : 1463.81 = A-C_{16}$; $[M^+H]^+ : 1477.83 = A-C_{17}/B-C_{15}$; $[M^+H]^+ : 1491.84 = A-C_{17}/B-C_{16}$; $[M^+H]^+ : 1505.84 = B-C_{17}$). Fengycin contains also isoforms of fengycin A and B with unsaturated fatty acid chain with one double bound from C₁₄ to C₁₈ carbons ($[M^+H]^+ : 1433.79 = A-C_{14}$; $[M^+H]^+ : 1447.81 = A-C_{15}$; $[M^+H]^+ : 1461.82 = A-C_{16}$; $[M^+H]^+ : 1475.84 = A-C_{17}/B-C_{15}$; $[M^+H]^+ : 1489.85 = A-C_{17}/B-C_{16}$). These findings are in accordance with previously published analysis of the lipopeptides isoforms produced by these *B. subtilis* strains (Hamley *et al.* 2013; Béchet *et al.* 2013).

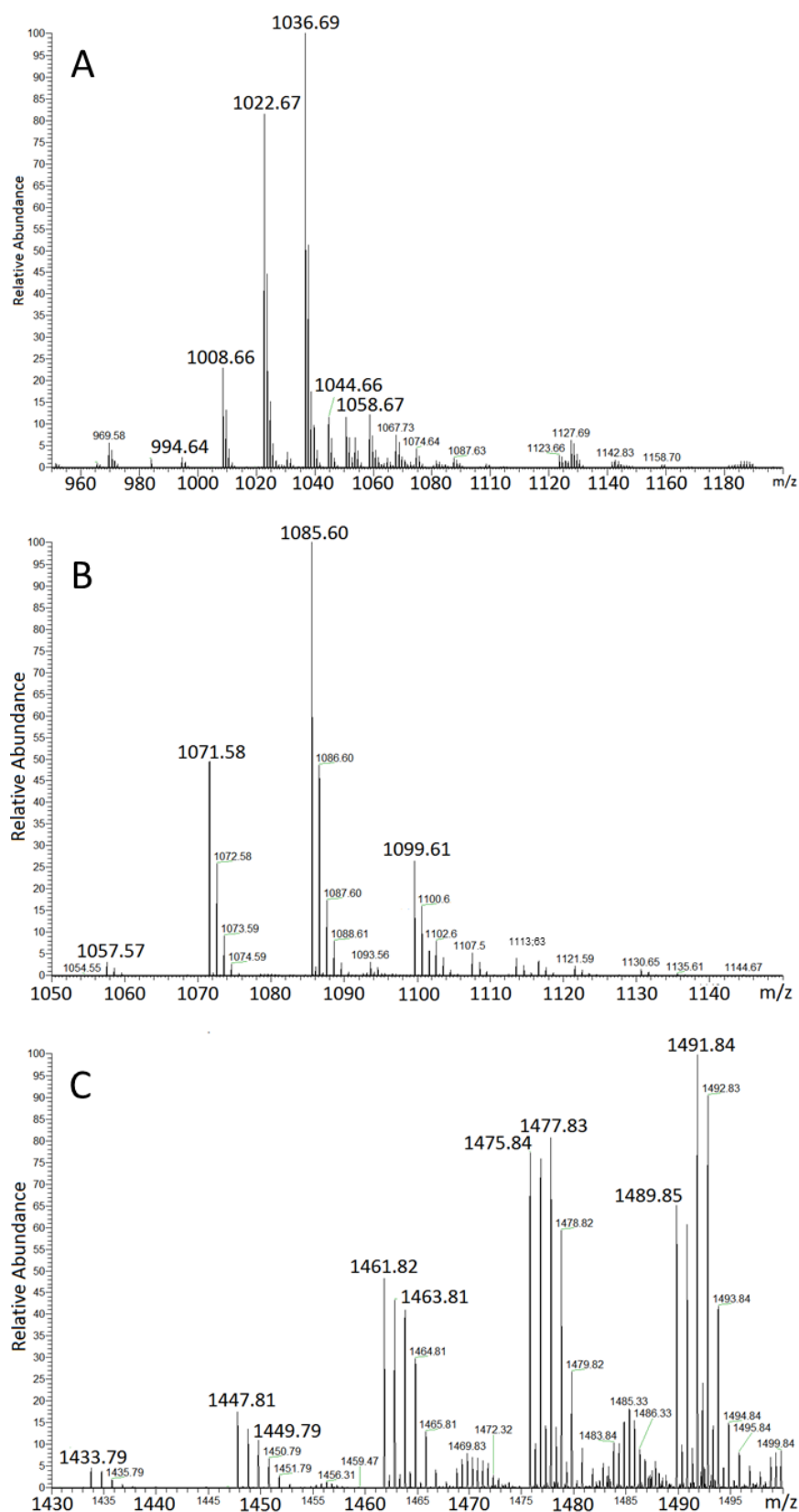


Fig. 1 HPLC-MS analysis of the lipopeptides powder produced and purified from the *Bacillus subtilis* strains BBG131 for surfactin (A); BBG125 for mycosubtilin (B) and Bs2504 for fengycin (C). Peak at $[M+H]^+$: 1505.84 was also observed in the total spectrum of the fengycin analysis, but was voluntarily not presented in this figure in order to improve its quality.

B. subtilis* lipopeptides confer protection to wheat against *Z. tritici

Three *B. subtilis* lipopeptides (mycosubtilin, surfactin and fengycin) and two mixtures (mycosubtilin + surfactin and mycosubtilin + surfactin + fengycin) were tested in the greenhouse for their protection efficacy on two wheat cultivars (Dinosor and Alixan) against *Z. tritici*. High disease levels (chlorosis and necrosis bearing or not pycnidia) were observed on control plants from both cultivars, although those from Alixan inoculated with the strain T02596 showed overall a slightly higher level of symptoms (57.4 %) when compared to those from Dinosor inoculated with the strain T01193 (50.8 %) (Fig. 2).

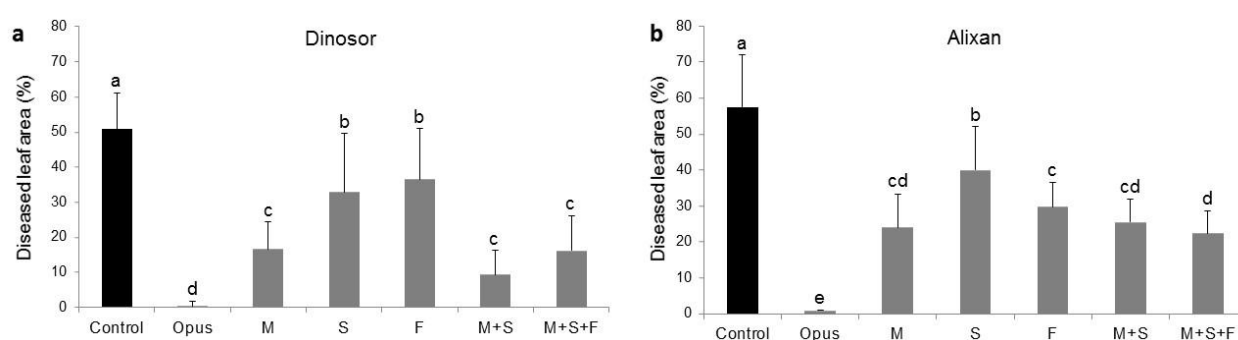


Fig.2 Disease severity level on wheat plants of the Dinosor (a) and Alixan (b) cultivars treated or not with different *Bacillus subtilis* lipopeptides 48 h before challenge inoculation with the *Zymoseptoria tritici* strains T01193 and T02596, respectively. Disease symptoms were recorded 21 days post-inoculation by scoring the percentage of the third leaf area covered with lesions bearing or not pycnidia. Within each cultivar, means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$. M, mycosubtilin; S, surfactin; F, fengycin; M+S, mycosubtilin + surfactin; M+S+F, mycosubtilin + surfactin + fengycin.

Disease scoring at 21 dpi revealed significant protection level by all tested lipopeptides or mixtures (Fig. 2 and 3). Disease reductions conferred by lipopeptides vary depending on the molecule or mixture and the cultivar used (Fig. 2). Disease amounts of lipopeptides-treated plants ranged from 9.4 % to 46.3 % on Dinosor and from 22.4 % to 40.0 % on Alixan. Interestingly, the highest disease reductions were obtained with treatments containing mycosubtilin, alone or in mixture with the other lipopeptides, on both cultivars (Fig. 2 and 3, Table 2).

Table 2 Protection efficacy of *Bacillus subtilis* lipopeptides at 100 mg.L⁻¹ on the two wheat cultivars Dinosor and Alixan inoculated with the *Zymoseptoria tritici* strains T01193 and T02596, respectively.
* Percentage of disease reduction compared to the non-treated inoculated control of each cultivar.

Lipopeptide(s)	*Protection on Dinosor	*Protection on Alixan
mycosubtilin	67 %	58 %
surfactin	35 %	30 %
fengycin	28 %	48 %
mycosubtilin + surfactin	82 %	56 %
mycosubtilin + surfactin + fengycin	68 %	61 %

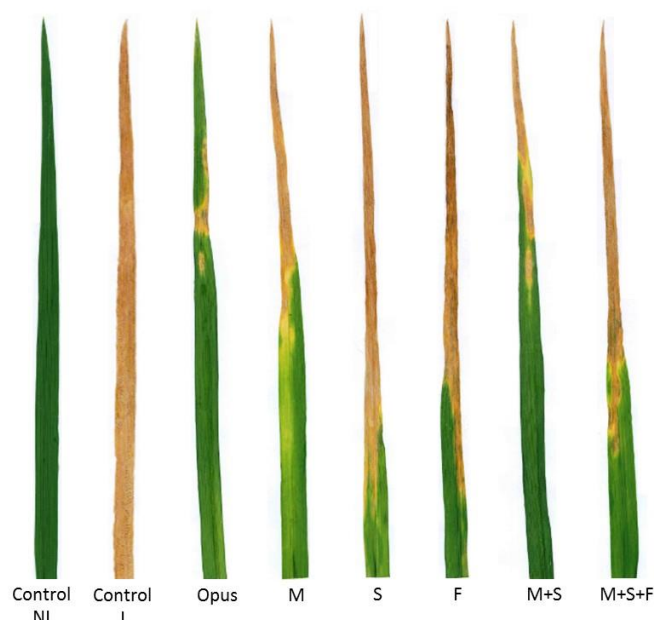


Fig. 3 Representative leaves of the Dinosor wheat cultivar treated or not with different *Bacillus subtilis* lipopeptides and the Opus (epoxiconazole) reference fungicide 48 h before challenge inoculation with the *Zymoseptoria tritici* strain T01193. M, mycosubtilin; S, surfactin; F, fengycin; M+S, mycosubtilin + surfactin; M+S+F, mycosubtilin + surfactin + fengycin. NI, non-inoculated; I, inoculated.

Mycosubtilin-based treatments exhibited higher protections on Dinosor (up to 82 % disease reduction with the mycosubtilin + surfactin mixture) compared to Alixan (up to 61 % disease reduction with the mycosubtilin + surfactin + fengycin mixture) (Table 2). Surfactin and Fengycin alone also induced significant protection efficacies, but they did not exceed 35 % on Dinosor and 48 % on Alixan.

Mycosubtilin-based formulations display an *in vitro* antifungal effect against *Z. tritici*

All lipopeptides and mixtures, as well as the two reference fungicides epoxiconazole and bixafen, were evaluated for their direct activity against *Z. tritici* using 96-well plate assay. A dose-response curve was determined for each compound tested; it presents the optical density averages obtained with different concentrations (Fig. 4). As expected, both fungicide references inhibited fungal growth by low concentrations, although bixafen was the most active one in fungal growth inhibition compared to epoxiconazole. The effect of lipopeptides on fungal growth varies depending on the product and the concentration. Mycosubtilin alone or M-containing mixtures were the most active lipopeptides, which completely inhibited fungal growth at the concentration 3.7 mg L⁻¹ for mycosubtilin and mycosubtilin + surfactin, and at the concentration 11.1 mg L⁻¹ for mycosubtilin + surfactin + fengycin. Interestingly, surfactin and fengycin did not show any antifungal effect when tested separately. On the other hand, surfactin increased fungal growth at the highest concentration 100 mg L⁻¹ (Fig. 4).

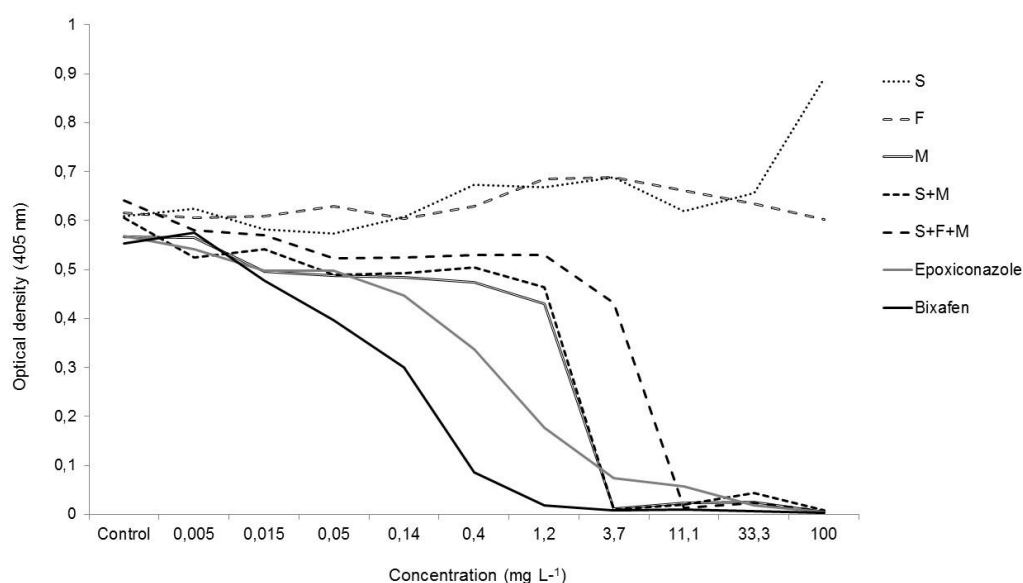


Fig. 4 *In vitro* dose-response curves obtained with different *Bacillus subtilis* lipopeptides and the bixafen and epoxiconazole reference fungicides using the *Zymoseptoria tritici* strain T01193. S, surfactin; M, mycosubtilin; F, fengycin; M+S, mycosubtilin + surfactin; M+S+F, mycosubtilin + surfactin + fengycin.

From the dose-response curves, IC₅₀ values were determined for each compound (Table 3). Both fungicide references showed low IC₅₀ values. Mycosubtilin-based formulations showed slightly higher but still low IC₅₀ values, up to 1.4 mg L⁻¹ when tested alone or in mixture with surfactin. This value was 2.33- and 14-fold higher than those of epoxiconazole and bixafen,

respectively. The mixture Mycosubtilin + surfactin + fengycin displayed relatively higher IC_{50} value, while surfactin and fengycin tested separately showed each a IC_{50} value higher than 100 $mg\ L^{-1}$ (Table 3).

Table 3 *In vitro* half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values obtained with *Bacillus subtilis* lipopeptides using the *Zymoseptoria tritici* strain T01193.

Lipopeptide(s) or reference fungicide	IC_{50} ($mg\ L^{-1}$)
mycosubtilin	1.4
surfactin	>100
fengycin	>100
mycosubtilin + surfactin	1.4
mycosubtilin + surfactin + fengycin	4.5
Epoxiconazole	0.6
Bixafen	0.1

Myco-subtilin-based formulations reduce *Z. tritici* hyphal growth on the leaf surface

Hyphal growth of *Z. tritici* on the leaf surface of wheat plants treated or not with different lipopeptides was revealed using Calcofluor. Microscopic observations revealed that fungal spores formed germ tubes from their ends (Fig. 5). At 1 dpi, 58.8 % of spores germinated in non-treated and inoculated control plants (Table 4).

Both surfactin and fengycin did not significantly reduce the rate of germinated spores. All treatments containing mycosubtilin significantly reduced the rates of germinated spores (Table 4), thus agreeing *in vitro* results. The highest reduction was obtained with mycosubtilin alone with only 19.6 % of germinated spores, corresponding to 67 % reduction when compared to control plants (Table 4).

Table 4 Rates of germinated spores at 1 day after inoculation in plants of the cultivar Alixan treated or not with *Bacillus subtilis* lipopeptides at 100 $mg\ L^{-1}$ and inoculated with the *Zymoseptoria tritici* strain T02596.

Lipopeptide(s)	Rate of germinated spores (%)
Control	58.8 a
mycosubtilin	19.7 b
surfactin	68.7 a
fengycin	60.9 a
mycosubtilin + surfactin	32.0 b

mycosubtilin + surfactin + fengycin 32.2 b

Means tagged with the same letter are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$.

At 5 dpi, fungal germ tubes were often branched and oriented randomly on the leaf surface without specific orientation towards stomata and no possible chemotropism or thigmotropism could be noticed. Fungal hyphal growth displayed different patterns on wheat leaves treated or not with the lipopeptides (Fig. 5). On control plants, only 13.7 % of spores did not germinate and 72 % of spores formed developed or strongly developed germ tubes (classes 3, 4 and 5). Treatments with formulations containing mycosubtilin strongly and significantly reduced fungal growth on the leaf surface, with more than 30 % (35.2 %, 31.6 % and 35.1 % for mycosubtilin, mycosubtilin + surfactin and mycosubtilin + surfactin + fengycin, respectively) of spores remained non-germinated on leaves treated with mycosubtilin-based formulations (Fig. 5). Drastic reductions of hyphal growth were also observed, with only 8.4 %, 15.4 % and 11.3 % of germ-tubes belonging to the 4 and 5 classes in plants treated with mycosubtilin, mycosubtilin + surfactin and mycosubtilin + surfactin + fengycin, respectively, when compared to control plants (46.7 %) (Fig. 5). In addition, treatments with mycosubtilin-based formulations significantly increased the rates of germinated spores with small germ tube (class 2). The other lipopeptides (surfactin and fengycin) did not show marked effect on the hyphal growth of *Z. tritici* on the leaf surface when compared to control plants.

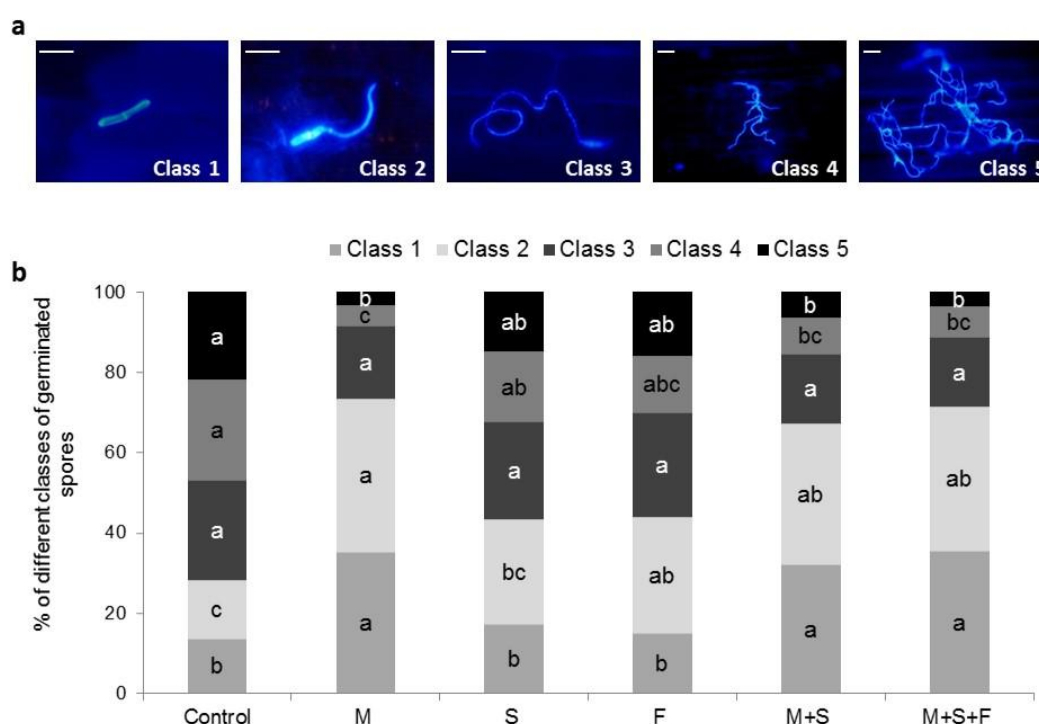


Fig. 5 Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on hyphal growth of the *Zymoseptoria tritici* strain T02596 on leaves of the wheat cultivar Alixan pretreated or not with different lipopeptides. Five

different classes of Calcofluor-stained germinated spores were assessed five days post-inoculation from 100 different spores on each leaf segment for each condition. Class 1, non germinated spore; class 2, geminated spore with small germ tube; class 3, geminated spore with developed germ tube; class 4, geminated spore with a strongly developed germ tube; class 5, germinated spore giving a strong hyphal growth. M, mycosubtilin; S, surfactin; F, fengycin; M+S, mycosubtilin + surfactin; M+S+F, mycosubtilin + surfactin + fengycin. Within each class, bars with common letters are not significantly different using the Tukey test at $P = 0.05$. Scale bar = 10 μm .

Correlation between protection efficacy and *in vitro* antifungal activity

Correlative analysis using PCA revealed strong negative correlation ($r = 0.99$) between the protection efficacy levels highlighted on the cultivar Dinosor inoculated with the strain T01193 and the IC_{50} values recorded *in vitro* using this strain (Fig. 6).

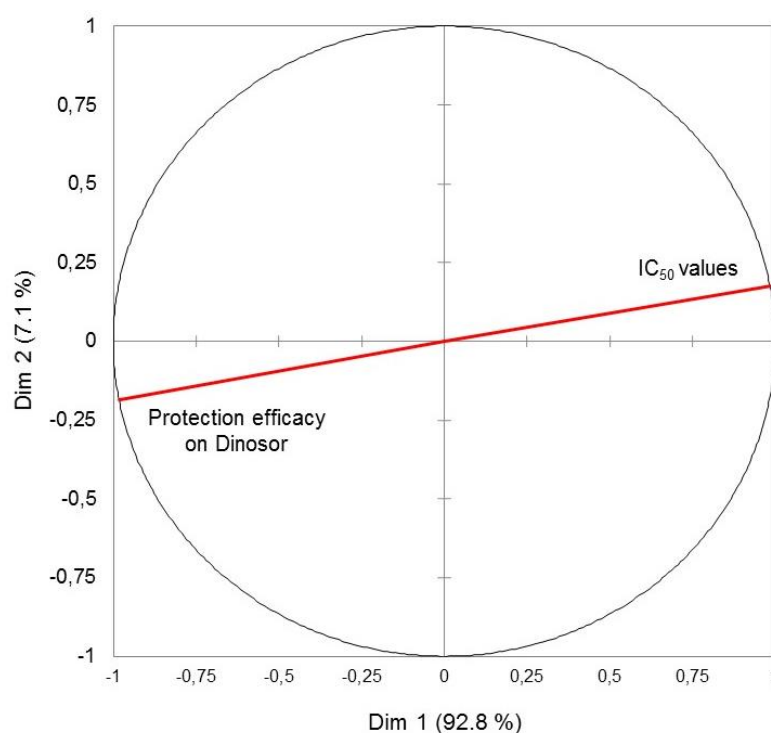


Fig. 6 Principal component analysis (PCA) to assess correlation between protection efficacies obtained with *Bacillus subtilis* lipopeptides on the cultivar Dinosor inoculated with the *Zymoseptoria tritici* strain T01193 (percentages of disease severity reduction compared to the non-treated inoculated control plants) and IC_{50} values found *in vitro* for the lipopeptides using this strain.

Discussion

Z. tritici control strategies rely mainly on chemical fungicide applications, and to a lower extent on adequate cultural practices and the use of partially-resistant cultivars (Goudemand et al. 2013). However, the current controversy on the wide use of conventional pesticides and the

frequent adaptation of fungal population either to applied fungicides (Goudemand et al. 2013) or host resistance, make urgent the finding of new alternative control strategies compatible with sustainable agriculture and healthy food. Here, we investigated the use of lipopeptides from *B. subtilis* as natural control products on wheat against *Z. tritici*, since such compounds were demonstrated to be much less ecotoxic when compared to chemical fungicides (Deravel et al. 2014). Our results revealed that all tested lipopeptides or mixtures displayed significant disease reduction on the two used cultivars. The best protection levels were obtained with the treatments containing mycosubtilin alone or in mixture with surfactin or with both surfactin and fengycin (up to 82 % disease reduction with the mixture mycosubtilin + surfactin on Dinosor), although these efficacies were lower than those found with the Opus® reference fungicide. This protective effect of mycosubtilin is likely due to its antifungal activity highlighted *in vitro* and confirmed *in planta*. Indeed, a strong negative correlation was detected between IC₅₀ values and protection efficacies scored on the cultivar Dinosor, indicating that the more the lipopeptide or mixture possesses a direct antifungal effect, the more the biomolecule confers protection against *Z. tritici*, regardless the cultivar. Nevertheless, a contribution of plant resistance induction effect to lipopeptide efficacy cannot be excluded, at least for surfactin and fengycin, for which significant disease reductions were observed without any direct antifungal effect against the pathogen under tested conditions. Mycosubtilin, as other lipopeptides from iturin family, has been shown to confer protection against a broad range of plant pathogens. For instance, treatment of tomato seedlings with a *B. subtilis* mutant strain overproducing mycosubtilin allowed a significant protection against *Pythium aphanidermatum* when compared to wild-type strain (Leclère et al. 2005). Besides, supernatant from this mutant strain containing high amounts of mycosubtilin showed *in vitro* antagonistic activity against several phytopathogenic fungi, including *P. aphanidermatum*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*, with growth inhibition zones significantly larger than those induced by the wild-type supernatant (Leclère et al. 2005). When applied on lettuce, purified mycosubtilin from *B. subtilis* at 100 mg L⁻¹ strongly reduced the incidence of downy mildew caused by *Bremia lactucae*, by resulting in about seven times less diseased plantlets compared to the control samples (Deravel et al. 2014). Interestingly, Farace et al. (2015) demonstrated in grapevine, for the first time, that mycosubtilin has not only a direct activity on spore germination, but also triggers plant defense mechanisms and long-lasting enhanced tolerance to *B. cinerea*. Other iturins have also been reported to be effective against plant pathogens, either *via* direct antifungal activity, such as iturin A from *B. amyloliquefaciens* against *Rhizoctonia solani* (Yu et al. 2002), iturin A and bacillomycin from *B. subtilis* against *Podosphaera fusca* (Romero et

al. 2007) and iturin A from *B. subtilis* against *Colletotrichum gloeosporioides* (Kim *et al.* 2010), or through the induction of plant resistance such as iturins from *B. amyloliquefaciens* on strawberry against *C. gloeosporioides* (Yamamoto *et al.* 2015) and on cotton against *Verticillium dahlia* (Han *et al.* 2015).

Similar levels of protection were obtained with mycosubtilin alone at 100 mg L⁻¹ or when tested in mixture with surfactin (50:50 mg L⁻¹) or with surfactin + fengycin (33:33:33 mg L⁻¹) (Fig. 2). Likewise, mixing mycosubtilin with surfactin at 50:50 mg L⁻¹ conferred on lettuce the same effect against *B. lactucae* as mycosubtilin alone at 100 mg L⁻¹, while surfactin did not impact *B. lactucae* development and did not reduce disease severity, thus suggesting that the presence of surfactin can improve the biological activities of mycosubtilin (Deravel *et al.* 2014). Two hypotheses were launched to explain the increased performance of mycosubtilin when it is mixed with surfactin (same performance with a lower concentration), since surfactin is not antifungal *per se* (Deravel *et al.* 2014). First, surfactant property of surfactin can enhance foliar penetration, foliar retention, and coverage, as reported for common organic surfactants used in crop protection (Stock and Holloway 1993). Second, synergy between surfactin and mycosubtilin could be due to the formation of mixed micelles, since bioactive single lipopeptides such as surfactin and mycosubtilin may interact together by forming mixed and potentially active or even more active micelles (Jauregi *et al.* 2013; Deravel *et al.* 2014). However, these hypotheses should be confirmed by further analyses.

Surfactin and fengycin tested separately significantly reduced disease severity on both wheat cultivars, despite an absence of direct antifungal effect by these biomolecules in both *in vitro* and *in planta* assays under tested conditions (Fig. 2, 4 and 5). These findings suggest that these lipopeptides confer protection to wheat against *Z. tritici* via the elicitation or priming of plant defense responses rather than by direct antagonism or combined effect (direct and indirect) as previously reported on grapevine for mycosubtilin (Farace *et al.* 2015). Surfactin and fengycin interact with lipid layers of the plasma membrane and modify cell membrane permeability and structure leading to a cascade of molecular events within the plant cells activating a response of defense (Ongena *et al.* 2007; Henri *et al.* 2011). Hence, these two molecules play a key role in the induction of plant immunity driven by beneficial microorganisms, such as induced systemic resistance (ISR) (Raaijmakers *et al.* 2010). For instance, Farace *et al.* (2015) found that purified surfactin from *B. subtilis* activates salicylic acid-based defense pathway in grapevine leaves against *B. cinerea*, without any direct antifungal activity against the pathogen. By contrast, they found that plipastatin, belonging to the fengycin family, conferred a low

protection efficacy which was assigned to direct antibiosis effect rather than to elicitation properties. In bean, purified *B. subtilis* fengycins and surfactins, applied as soil drenching, provided a significant protective effect against *B. cinerea* and activated similar ISR response to that induced by living cells of the used producing *B. subtilis* strain, thus concluding for the first time that fengycins and surfactins are a novel class of compounds from non-pathogenic bacteria that can be perceived by plant cells as signals to initiate defense mechanisms (Ongena et al. 2007). Likewise, surfactin from *B. amyloliquefaciens* triggered ISR on strawberry plants, resulting in the reduction of the severity of anthracnose disease caused by *C. gloeosporioides* (Yamamoto et al. 2015). Addition of surfactin, but not fengycin or iturin, to tobacco cell suspensions, induced a battery of plant defense-related events, including extracellular medium alkalization coupled with ion fluxes, reactive oxygen species production, stimulation of phenylalanine ammonia-lyase and lipoxygenase activities and modification of the pattern of phenolics produced by elicited cells (Jourdan et al. 2009). Interestingly, surfactin and fengycin conferred significant protections in rice against *R. solani* and triggered the expression of several defense genes in rice cell-suspension cultures, while mycosubtilin did not give any protection, suggesting the involvement of both fengycin and surfactin in mediating induced resistance in rice against *R. solani* (Chandler et al. 2015).

Conclusion

The present study demonstrated the potential of lipopeptides from *B. subtilis* to be used as biocontrol agents on wheat against *Z. tritici*. Mycosubtilin, alone or in mixture with surfactin or with both surfactin and fengycin, provided the highest protection levels (up to 82 % and 61 % disease reduction on the cultivars Dinosor and Alixan, respectively). These strong efficacies may result mainly from the significant biofungicide activity of this biomolecule highlighted both *in vitro* and *in planta*, thus corroborating previous results on other pathosystems (e.g. Deravel et al. 2014). Nevertheless, the protection efficacy of mycosubtilin as well as mycosubtilin-containing mixtures was lower than that found for the Opus[®] reference fungicide. Therefore, the efficacy of mycosubtilin or its mixtures could be improved with formulation by using adapted adjuvants allowing better lipopeptide foliar application. Fengycin and surfactin showed also significant levels of protection, but to a lower extent compared to mycosubtilin. According to the antifungal assay, the mode of action of these two molecules relies on the induction of plant resistance mechanisms rather than on direct activity. Further investigations are needed to confirm this hypothesis and to identify defense pathways involved in such

resistance. Such investigations will also be performed with mycosubtilin for which combined direct and indirect (elicitation or priming) activity is suspected.

Acknowledgements

We thank Corentin Duthoo for his technical help during this study and Dr Gabrielle Chataigné for the HPLC-MS analysis. This research was conducted in the framework of the projects NewBioPest supported by the Hauts-de-France council (France) and both BioProtect and BioScreen supported by INTERREG V SMARTBIOCONTROL (European Union).

References

- Béchet M, Castéra-Guy J, Guez J-S, et al (2013) Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. *Bioresour Technol* 145:264–270. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.123
- Chandler S, Van Hese N, Coutte F, et al (2015) Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol Mol Plant Path* 91:20–30. Doi: 10.1016/j.pmpp.2015.05.010
- Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, et al (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol* 140:27–37. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.10.011
- Cheval P, Siah A, Bomble M, et al (2017). Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. *Crop Prot* 92:131–133. Doi:10.1016/j.cropro.2016.10.017
- Cools HJ, Fraaije BA (2008) Are azole fungicides losing ground against *Septoria* wheat disease? Resistance mechanisms in *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag Sci* 64:681–68. Doi: 10.1002/ps.1568
- Coutte F, Leclère V, Béchet M, et al (2010a). Effect of pps disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *J Appl Microbiol* 109:480–491. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04683.x
- Coutte F, Lecouturier D, Ait Yahia S, et al (2010b) Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:499–507. Doi: 10.1007/s00253-010-2504-8
- Coutte F, Lecouturier D, Leclère V, et al (2013) New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor. *Process Biochem* 48:25–32. Doi: 10.1016/j.procbio.2012.10.005
- Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC (2000) Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathol* 49:445–451. Doi: 10.1046/j.1365-3059.2000.00472.x
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, et al (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:414–430. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

- Deravel J, Lemi re S, Coutte F, et al (2014) Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6255–6264. Doi: 10.1007/s00253-014-5663-1
- El Chartouni L, Tisserant B, Siah A, et al (2011) Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia* 103:764–774. Doi: 10.3852/10-184
- Farace G, Fernandez O, Jacquens L, et al (2015) Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Mol Plant Pathol* 16:177–187. Doi: 10.1111/mpp.12170
- Fones H, Gurr S (2015) The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet Biol* 79:3–7. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.004
- Goodwin SB, M'Barek SB, Dhillon B, et al (2011) Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLOS Genetics* 7:e1002070. Doi: 10.1371/journal.pgen.1002070
- Goudemand E, Laurent V, Duchalais L, et al (2013) Association mapping and meta-analysis: two complementary approaches for the detection of reliable *Septoria tritici* blotch quantitative resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed*. 32:563–584. Doi: 10.1007/s11032-013-9890-4
- Guo Q, Dong W, Li S, et al (2014) Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiol Res* 169:533–540. Doi: 10.1016/j.micres.2013.12.001
- Hamley IW, Dehsorkhi A, Jauregi P, et al (2013) Self-assembly of three bacterially-derived bioactive lipopeptides. *Soft Matter* 9:9572–9578
- Han Q, Wu F, Wang X, et al (2015) The bacterial lipopeptide iturins induce *Verticillium dahliae* cell death by affecting fungal signalling pathways and mediate plant defence responses involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Environ Microbiol* 17:1166–1188. Doi: 10.1111/1462-2920.12538
- Henry G, Deleu M, Jourdan E, et al (2011) The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cell Microbio* 13:1824–1837. Doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01664.x
- Jacques P (2011) Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp.. In: Soberon-Chavez G (ed) *Biosurfactants microbiology monographs*, vol 20. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 57–91
- Jauregi P, Coutte F, Catiau L, et al (2013) Micelle size characterization of lipopeptides produced by *B. subtilis* and their recovery by the two-step ultrafiltration process. *Sep Purif Technol* 104:175–182. Doi: 10.1016/j.seppur.2012.11.017
- Jørgensen LN, Hovm ller MS, Hansen JG, et al (2014) IPM strategies and their dilemmas including an introduction to www.eurowheat.org. *J Integr Agric* 13:265–281. Doi: 10.1016/S2095-3119(13)60646-2
- Jourdan E, Henry G, Duby F, et al (2009) Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe Interact* 22:456–468. Doi: 10.1094/MPMI-22-4-0456.
- Kema GHJ, Yu DZ, Rijkenberg FHJ, Shaw MW, Baayen RP (1996) Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopath* 86: 777–786. Doi: 10.1094/Phyto-86-777

- Kema GHJ, Van der Lee TAJ, Mendes O, et al (2008) Large-scale gene discovery in the Septoria Tritici Blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* with a focus on *in planta* expression. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1249–1260. Doi: 10.1094/MPMI-21-9-1249
- Kim PI, Ryu J, Kim YH, et al (2010) Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol* 20:138-145. Doi: 10.4014/jmb.0905.05007.
- Leclère V, Béchet M, Adam A, et al (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl Environ Microbiol* 71:4577–4584. Doi: 10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005
- Olson S (2015) An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management* 26:203–206. Doi: 10.1564/v26_oct_04
- Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16:115–125. Doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009
- Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol* 9:1084–1090. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x
- Palmer C-L, Skinner W (2002) *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. *Molecular Plant Pathology* 3:63–70. Doi: 10.1046/j.1464-6722.2002.00100.x
- Perez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, et al (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol Res* 169:325-336. Doi: 10.1016/j.micres.2013.09.011
- Ponomarenko A, Goodwin SB, Kema GH (2011) Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor*. Doi:10.1094/PHI-I-2011-0407-01
- Raaijmakers JM, De Bruijn I, Nybroe O, Ongena M (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34:1037–1062. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x
- Ravensberg W, (2015) Crop protection in 2030: towards a natural, efficient, safe and sustainable approach. *International Symposium Swansea University* 7-9 September 2015.
- Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, et al (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:430–440. Doi: 10.1094/MPMI-20-4-0430
- Rückert C, Blom J, Chen X, et al (2011). Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7(T) reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J Biotechnol* 20:78-85. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.01.006
- Siah A, Deweer C, Duyme F, et al (2010a) Correlation of *in planta* endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathol* 59:661–670. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02303.x
- Siah A, Tisserant B, El Chartouni L, et al (2010b). Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal Biol* 114:980-990. Doi: 10.1016/j.funbio.2010.09.008. Epub 2010 Sep 29.
- Siah A, Deweer C, Morand E, et al (2010c) Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Prot* 29:737–743. Doi: 10.1016/j.cropro.2010.02.012

- Siah A, Reignault P, Halama P (2013) Genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola* isolates from a single field. *Commun Agric Appl Biol Sci* 78: 437-442.
- Siah A, Randoux B, Magnin-Robert M, et al (2017). Natural agents inducing plant resistance against diseases. In *Natural Antimicrobial Agents, Sustainable Development and Biodiversity series*. Edited by Mérillon J.M. and Rivière C. Springer (*in press*).
- Stock D, Holloway PJ (1993) Possible mechanisms for surfactant induced foliar uptake of agrochemicals. *Pest Manag Sci* 38:165–177. Doi: 10.1002/ps.2780380211
- Strieker M, Tanovi  A, Marahiel MA (2010) Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol* 20:234–240. Doi: 10.1016/j.sbi.2010.01.0
- Torriani SFF, Melichar JPE, Mills C, et al (2015) *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet Biol* 79:8–12. Doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.010
- Tour  Y, Ongena M, Jacques P, et al (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol* 96:1151-1160. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x
- Xun-Chao C, Hui L, Ya-Rong X, et al (2013) Study of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 and its antifungal cyclic lipopeptides. *J Appl Bio. Biotechnol* doi: 10.7324/JABB.2013.1101
- Yamamoto S, Shiraishi S, Suzuki S (2015) Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? *Lett Appl Microbiol* 60:325-336. Doi: 10.1111/lam.12382
- Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, et al (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol Biochem* 34:955-963. Doi: 10.1016/S0038-0717(02)00027-5

IV. Conclusions et perspectives

Conclusions

La lutte contre *Z. tritici* repose sur l'application des fongicides conventionnels, et dans une moindre mesure sur l'utilisation de cultivars partiellement résistants. Toutefois, les effets potentiels de l'utilisation excessive des pesticides sur l'environnement et la santé humaine, ainsi que l'adaptation fréquente du champignon aux fongicides appliqués et aux résistances de l'hôte, impliquent une urgence à trouver de nouvelles alternatives pour son contrôle. Ces alternatives, qui doivent être compatibles avec une agriculture durable, une alimentation saine et une production de qualité et en quantité, sont peu nombreuses sur le pathosystème blé-*Z. tritici*.

L'objectif majeur de la thèse était donc d'identifier ou de créer des SDP bio-sourcés afin de répondre à la demande du marché agricole en produits de protection des plantes efficaces, compatibles avec une agriculture durable et innovante. Nous avons également évalué l'efficacité de certaines molécules ou produits connus déjà comme SDP ou comme biofongicides et n'ayant jamais été testés sur le pathosystème blé-*Z. tritici*.

La saccharine, connue pour ses propriétés élicitrices des défenses naturelles de plusieurs plantes, a été testée pour la première fois sur le blé et a montré des taux de protection marquants contre *Z. tritici*. Le niveau de protection obtenu (77 %) est due exclusivement à un effet éliciteur, confirmé par l'absence d'activité antifongique directe, *in vitro* et *in planta*. Ces propriétés élicitrices de la saccharine ont été démontrées auparavant sur le haricot contre la rouille (Boyle et Walters, 2005a; Srivastava et al., 2011) et l'orge contre l'oïdium (Boyle et Walters, 2005b). Chez l'orge, une potentialisation due à l'application de la saccharine a été également mise en évidence par Walters et al., (2009). Dans notre travail, l'étude de l'évolution de l'expression de quatre gènes étudiés (*LOX*, *PAL*, *POX2* et *PR1*) connus pour leur implication dans les réactions de défenses a été réalisée à différentes dates post traitement en conditions inoculée ou non inoculée. L'expression relative de ces gènes a montré que le gène *LOX* semble être le plus impliqué dans la protection observée dans la mesure où il a été fortement surexprimé aux différentes dates en conditions inoculée et non inoculée. Le gène *PAL* testé dans cette étude ne semble pas être impliqué dans la protection observée, étant donné qu'aucune modification de son expression n'a eu lieu aux différentes dates étudiées et aux différentes conditions inoculée et non inoculée, sauf à 4 jours post-traitement (jpt) correspondant à 2 jours post-inoculation (2 jpi) où une légère surexpression a été observée. Les gènes *POX2* et *PR1* avaient quant à eux deux profils d'expression similaires en condition non inoculée, où on a observé une répression de l'expression à 2 jpt, suivie par une surexpression aux jours suivants. En conditions inocuées, les plantes traitées avec la saccharine n'ont montré aucune différence d'expression

du gène *POX2* en les comparant aux témoins, tandis qu'une surexpression de *PR1* a été observée à 4 et 7 jpt.

On peut conclure à partir des résultats obtenus dans le cadre de ce travail que la résistance observée est liée en partie au gène *LOX* dépendant de la voie de l'acide jasmonique. L'acide jasmonique est généralement caractéristique des réactions systémiques induites (ISR) en réponse à des champignons pathogènes nécrotrophes mais également en réponse à des microorganismes non-pathogènes (Browse, 2009; Van der Ent et *al.*, 2009). L'acide jasmonique joue également un rôle important dans la croissance et la sénescence de la plante. L'étude d'autres gènes impliqués dans les réponses de défenses est nécessaire afin de mieux comprendre les voies impliquées dans cette résistance induite chez le blé par la sacharine.

Dans le cadre du projet Optistim, 31 molécules ont été testées pour leur efficacité à protéger le blé contre la septoriose. Ces molécules sont l'acide γ -aminobutyrique (GABA), le PGA, la molécule M1 issue du PGA ainsi que 28 molécules fonctionnalisées à partir de M1. Sur l'ensemble des composés testés, le GABA, la M1 et 18 molécules étaient capables de réduire la sévérité de la maladie de façon significative ($P < 0.05$), et les protections étaient comprises entre 19 % et 63 % en comparaison avec le témoin non traité inoculé. Etant donné que les biotests *in vitro* ont confirmé l'absence d'effet fongicide direct des différentes molécules, nous avons pu conclure que la protection était due à une stimulation des défenses naturelles de la plante. L'étude de la relation structure activité nous a permis d'identifier l'importance des différents groupements chimiques situés aux niveau des différentes positions du noyau central de la molécule M1. Les différentes fonctionnalisations effectuées au niveau de ces positions ont entraîné, suivant les cas, une baisse ou une suppression totale de l'activité. Seule la molécule M2 était plus efficace que la molécule mère M1.

Au départ, lors de la préparation des différentes molécules pour le traitement, notre choix d'adjuvant s'est porté sur l'Heliosol[®] qui est un mélange d'alcools terpéniques et qui est utilisé en agriculture biologique. Bien que la notation visuelle a confirmé que cet adjuvant n'a pas conféré de protection contre la septoriose, les tests *in vitro* ont montré, quant à eux, une forte activité directe, entraînant une inhibition totale du développement du champignon, ce qui nous a amené à choisir le Cantor[®] comme adjuvant pour les tests suivants.

Nous avons effectué des analyses plus poussées sur les trois meilleures molécules, à savoir le GABA, la molécule M1 ainsi que la molécule M2. Ces trois molécules ont donc été testées à nouveau en serre en utilisant le nouvel adjuvant Cantor[®] et les résultats ont montré des taux de protection similaires à ceux obtenus dans l'essai avec l'Heliosol[®] (48 %, 52 % et 63 %

respectivement). Les observations microscopiques effectuées sur les 3^{èmes} feuilles des plantes traitées avec le Cantor[®], le GABA, la M1 et la M2 et inoculées ainsi que les témoins non traités inoculés ont confirmé l'absence de tout effet direct sur le développement mycélien, supportant donc l'hypothèse que la protection observée est exclusivement due à l'élicitation des défenses de la plante.

L'étude de l'expression relative des gènes (*LOX*, *PAL*, *POX2* et *PR1*) a montré l'activation et l'implication de certaines voies de défenses par rapport à d'autres. En effet, en conditions non inoculées, les différentes molécules ont induit l'expression du gène *LOX* à 2 jpt, du gène *PAL* à 7 jpt, du gène *POX2* à 2, 3 et 4 jpt ainsi que du gène *PR1* à 2 jpt. En conditions inoculées, nous avons observé une induction de l'expression du gène *LOX* à 3 et 4 jpt correspondant à 1 et 2 jpi. Nous avons également observé un effet priming pour ce gène dû à l'application des molécules M1 et M2 aux deux dates (1 et 2 jpi) ainsi qu'à l'application du GABA à 2 jpi. Cependant, des analyses complémentaires sont requises afin de mieux identifier les voies de défense activées et cerner l'ensemble des mécanismes impliqués.

Toujours dans le cadre du projet Optistim, nous avons testé l'acide salicylique (SA), le PGA ainsi que cinq molécules « filles », « pré-élicitrices » ou comme nous les avons qualifiées dans le papier 3 de « prodrugs » (molécules 1-5), ces dernières ont été obtenues en conjuguant le SA au PGA. Les travaux présentés sont les résultats d'un screening effectué en serre et d'un test *in vitro*. Les résultats nous ont permis d'identifier des molécules « filles » dont certaines se sont avérées plus protectrices et moins fongicides que les molécules mères. Sur la base des résultats biologiques obtenus, les molécules testées ont pu être classées en quatre catégories :

- i) Les molécules avec une faible activité fongicide directe et permettant une protection intéressante du blé (SA) et les molécules filles contenant un groupement thiazolidin-2-one (molécule 4);
- ii) Les molécules possédant une faible activité fongicide directe et ne procurant aucune protection phytosanitaire (acide ortho, molécule 5);
- iii) Les molécules sans activité fongicide directe et assurant la protection du blé (les molécules filles contenant une fraction PGA, glutamine et proline, molécules 3, 6, 7);
- iv) Les molécules inactives ne possédant, ni activité fongicide directe, ni capacité à assurer une protection de la plante (PGA).

Etant donné que ces résultats n'ont pas été approfondis, des analyses complémentaires sont requises afin d'identifier les molécules dotées de propriétés strictement SDP ou de propriétés à la fois SDP et biofongicide, et de caractériser les voies de défense potentielles impliquées dans la protection conférée par ces molécules.

D'autres travaux ont porté sur l'efficacité de trois lipopeptides cycliques (mycosubtiline (M), surfactine (S) et fengycine (F)) synthétisés par *B. subtilis* comme produits de biocontrôle sur le blé contre *Z. tritici*. Ces lipopeptides seuls ou en mélange (S+F, S+M et S+F+M) ont été appliqués comme traitement foliaire préventif sur deux variétés de blé tendre (Dinosor et Alixan) inoculées avec deux souches virulentes de *Z. tritici* (T01193 et T02596, respectivement) et ont permis de réduire significativement les symptômes de la maladie par rapport au témoin non traité inoculé. Les meilleurs taux de protection ont été obtenus avec la mycosubtiline seule ou en mélange et les tests *in vitro* et *in planta* ont montré que ces protections sont dues principalement à une activité antifongique directe de ce lipopeptide. La surfactine ainsi que la fengycine, tous deux dépourvus d'activité directe, ont permis également de protéger significativement le blé contre *Z. tritici*, mais de manière moins intéressante que la mycosubtiline. Les mélanges S+M (50:50 w/w) et S+F+M (33:33:33 w/w) étaient aussi efficaces que M toute seule sur les deux variétés et vis-à-vis des deux souches ; ce résultat peut être expliqué par un cumul de l'effet antifongique de la mycosubtiline avec l'effet surfactant de la surfactine ou avec l'effet éliciteur ou potentialisateur conféré par la surfactine et la fengycine, et probablement par la mycosubtiline aussi. Lemire et *al.*, (2018) ont mis en évidence l'effet éliciteur de la surfactine produite par *Bacillus amyloliquefaciens* permettant la protection de la variété de blé tendre Avatar contre *Z. tritici*. Les auteurs ont identifié que son mode d'action dépendait à la fois de la voie de l'acide salicylique et de celle de l'acide jasmonique. Etant donné que les modes d'action d'un éliciteur donné dépendent pour une même espèce du cultivar utilisé (Walters et *al.*, 2011 ; Ors et *al.*, 2013), des tests supplémentaires sont requis afin de confirmer les résultats obtenus et de soutenir ou non nos hypothèses concernant les modes d'action des lipopeptides étudiés.

Perspectives

Nous avons testé dans le cadre de cette thèse des produits provenant de différentes origines (biomasse industrielle, micro-organismes vivants et produit de synthèse) et nous avons pu identifier de nouvelles molécules dotées d'un pouvoir éliciteur, biofongicide ou combinant une double activité (élicitrice et biofongicide). Bien que ces résultats soient innovants et constituent un début prometteur pour la recherche de méthodes alternatives de lutte contre *Z. tritici*,

plusieurs questions ont été soulevées et sont restées sans réponses, nécessitant d'être reprises. Nous les citons donc ici comme perspectives indispensables pour la confirmation des résultats que nous avons obtenus et pour la continuité des travaux.

Lorsqu'on parle de SDP, on évoque des molécules dépourvues de phytotoxicité répertoriée, n'ayant pas ou très peu de toxicité environnementale, et facilement biodégradables (Benhamou et Rey, 2012). Dans le cadre de nos travaux, nous avons mis en évidence le pouvoir éliciteur ou biofongicide des molécules testées. Cependant, nous n'avons pas vérifié les paramètres liés à la phytotoxicité, à la toxicité et à la biodégradation de ces molécules. Bien que ces composés ne semblaient pas impacter les plantes traitées en les comparant visuellement aux plantes témoins non traitées, nous ne pouvons pas confirmer l'absence totale de phytotoxicité. Il est donc important d'effectuer des expériences supplémentaires sur des plantes traitées non inoculées afin d'identifier et de suivre tout effet engendré par les traitements. A titre d'exemple, il serait intéressant de suivre l'évolution de la biomasse végétale, la vigueur et le tallage des plantes à différentes dates post traitement. Il faudrait également voir les effets de ces traitements à des stades plus tardifs du développement de la plante, en comparant des paramètres tels que l'épiaison et le remplissage des grains à ceux des plantes témoins non traitées. Cependant, il pourrait y avoir une confusion entre l'effet de la phytotoxicité et le coût énergétique que ces molécules pourraient entraîner chez les plantes traitées. Ces plantes qui mobiliseront une partie de leur énergie pour activer la résistance induite pourraient être limitées dans leur développement et *in fine* présenter un rendement plus faible par rapport à leur potentiel. Ainsi, si on identifie un impact sur les différents paramètres de croissance de la plante, il faudra trouver les bons moyens de distinguer l'effet phytotoxique de celui du coût énergétique, tout en sachant que la phytotoxicité de certaines molécules élicitrices peut être considérée comme un coût énergétique (réaction d'hypersensibilité exagérée de la part de la plante) (Heil, 2014). Il serait également intéressant de suivre le devenir de la molécule à l'intérieur des tissus de la plante, afin de savoir à quel niveau cette molécule est perçue et reconnue (niveau membranaire ou cytoplasmique). La question de la toxicité en santé humaine peut également être posée notamment pour les molécules fonctionnalisées. Des études de toxicité pourraient être menées afin de vérifier l'innocuité de ces produits. De même, un marquage des différents groupements constituant la molécule quand cela est possible pourrait nous permettre de suivre sa dégradation et de savoir s'il existe des risques de retrouver une partie ou la totalité de ces molécules dans le produit agricole final destiné à la consommation.

Les feuilles du blé sont connues pour leur forte hydrophobie (Massinon and Lebeau 2013), ainsi toute molécule appliquée dans une solution aqueuse a des chances limitées pour adhérer à la surface foliaire. Dans le cadre de nos travaux, nous avons opté pour l'utilisation d'un adjuvant dans le but d'améliorer l'adhésion et la pénétration des molécules testées au niveau des feuilles du blé. Nous avons donc testé dans un premier temps l'adjuvant Heliosol® utilisé en agriculture biologique et qui n'a procuré aucune protection du blé contre *Z. tritici*. Cependant, un effet direct important a été observé pour cet adjuvant *in vitro*. En effet, l'Heliosol® a complètement inhibé le développement du champignon ce qui nous a amené à le remplacer par Cantor® pour lequel nous avons démontré l'absence de toute activité directe *in vitro* et *in planta*. Toutefois, on ne sait pas s'il existe des interactions entre les molécules et les adjuvants testés. Des analyses sont donc requises afin d'identifier si ces interactions existent réellement et si l'adjuvant serait capable de diminuer ou au contraire de booster l'activité de la molécule élicitrice appliquée.

Un autre point important nécessite d'être étudié. En effet, nous avons traité les plantes au stade 3 feuilles (4^{ème} feuilles sortantes), la notation de la sévérité de la maladie, les observations microscopiques ainsi que l'étude de l'expression relative des gènes ont été faites uniquement sur les 3^{èmes} feuilles. Les résultats obtenus et présentés dans les papiers 1 et 2 confirment la présence d'une stimulation des défenses de la plante prouvée par des niveaux d'expression de gènes différents de ceux des témoins. Toutefois, nous ne pouvons pas affirmer si la protection observée est due à une résistance systémique induite ou à une résistance locale acquise. Des travaux supplémentaires, au niveau des étages foliaires supérieurs qui se sont développés postérieurement au traitement et à l'inoculation, pourraient nous apporter plus d'informations quant à la nature de cette résistance, son étendue spatiale et temporelle. Autrement dit, ces analyses nous permettront de savoir si le « signal d'alarme », si on peut le qualifier ainsi, se transmet vers les nouveaux organes développés après l'application de l'éliciteur en vue de les protéger, et si oui, pendant combien de temps.

Dans les études d'expression de gènes, nous nous sommes limités à des dates allant de 1 à 7 jours post traitement et de 1 à 5 jours post inoculation. En condition infectieuse, ces dates se situent durant la phase de latence du champignon. Il serait donc intéressant d'explorer les voies de défense étudiées, ainsi que d'autres à des dates postérieures, notamment aux alentours du switch entre la phase biotrophe et la phase nécrotrophe du champignon où ces voies pourraient être exprimées différemment.

Il serait également pertinent de tester d'autres méthodes d'application des éliciteurs que nous avons évalués dans ce travail et voir si ces applications pourraient optimiser la protection. A

titre d'exemple, la saccharine appliquée en traitement racinaire était beaucoup plus efficace qu'en traitement foliaire chez le haricot contre la rouille (Srivastava et *al.*, 2011). Un traitement des semences avant le semis pourrait être exploré ; et dans le cas où une élicitation ou un priming sont mis en place, cela permettrait de supprimer l'application au champ et aurait un impact moins important sur le plan économique (temps de travail pour l'agriculteur) et sur le plan environnemental (consommation de carburant).

Parmi les freins majeurs qui s'opposent à l'homologation de nouveaux SDP, on retrouve souvent la discordance entre les résultats obtenus au laboratoire qui sont souvent prometteurs et les résultats observés au champs où le produit perd une grande partie, si ce n'est la totalité, de son efficacité. En effet, en conditions contrôlées ou semi-contrôlées la minutie attribuée à la préparation des molécules, à l'homogénéité des traitements, au stade de leur application et aux conditions environnantes (lumière supplémentaire, absence de pluie et donc de lessivage des molécules, etc.), font que les quantités pulvérisées sont potentiellement proches de celles qui sont assimilées par les plantes, ce qui est différent de ce que l'on peut observer au champ avec une pulvérisation mécanique à ciel ouvert où il serait indispensable d'augmenter les doses. De même, dans le cas des essais sous conditions de laboratoire, bien que l'inoculum virulent est sélectionné et bien que la germination des spores est favorisée (en couvrant les plantes avec des sacs polystyrènes pour garantir l'humidité idéale), on constate que le pathogène reste confiné aux étages foliaires les plus bas de la plante (pas de propagation à cause de l'absence du phénomène de *splashing*). De même, sa reproduction sexuée est absente, étant donné qu'une seule souche est utilisée. Au champ, il n'en est pas de même ; on constate une dynamique de la propagation de la maladie vers les étages foliaires supérieurs et une diversité génétique du pathogène. Il serait donc important d'effectuer des tests au champ afin de pouvoir confirmer ou non l'efficacité des différentes molécules vis-à-vis de la maladie ciblée.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, plusieurs molécules ont été testées, et chaque criblage en serre était chronophage dans la mesure où chaque essai nécessitait un minimum de 7 semaines. Étant donné que le nombre de molécules testées à chaque fois risque d'être important, il serait intéressant de trouver une alternative afin de réaliser ces tests de criblage à haut-débit. Un criblage de l'efficacité des molécules potentiellement élicitrices sur cultures cellulaires pourrait faire gagner du temps et permettrait de réaliser un screening d'un plus grand nombre de molécules. Toutefois, la fiabilité de cette méthode basée sur les cultures cellulaires doit tout d'abord être validée en utilisant des molécules SDP de référence.

Enfin, la résistance contre *Z. tritici* est fortement liée au génotype du blé. Dans un contexte d'induction de résistance, la protection dépend également de la nature du SDP utilisé. Dans ce travail, nous avons testé des SDP différents, mais uniquement sur le cultivar Alixan. Il serait donc indispensable de réaliser des tests en utilisant les mêmes SDP mais sur plusieurs cultivars de blé, afin de confirmer leur efficacité de protection sur un large panel de génotypes.

Pour conclure, les produits de biocontrôle représentent le futur de l'agriculture et peuvent constituer une alternative concrète aux fongicides conventionnels. Si les molécules de biocontrôle sont issues de coproduits provenant des industries agricoles ou agroalimentaires, ceci permettrait de faire d'une pierre deux coups, en répondant simultanément à certains enjeux environnementaux à savoir la valorisation des coproduits souvent abondants et la réduction voire la substitution des intrants phytosanitaires conventionnels, tout en réalisant des économies sur le coût de fabrication de ces molécules, qui est souvent un frein à leur utilisation.

V. Annexes

Annexe 1. Matériels et méthodes

Matériel végétal et fongique

Deux variétés sensibles de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) ont été utilisées dans cette étude, la variété Dinosor (Unisigma) et la variété Alixan (Limagrain). Ces deux variétés ont été inoculées avec les souches pathogènes de *Zymoseptoria tritici* T01193 et T02596 respectivement.

Mise en culture et croissance des plantes

Les semences de blé sont pré-germées dans des boîtes de Pétri (12 X 12 cm) sur du papier filtre imbibé d'eau distillée. Les boîtes sont tout d'abord incubées à l'obscurité pendant 24h à 20°C, puis placées à 4° pendant 48h et finalement pendant 24h à 20°C. Les graines germées sont ensuite repiquées dans des pots en plastique avec 12 graines/pot. Les pots sont placés dans la serre en conditions semi-contrôlées avec un éclairage supplémentaire permettant une photopériode de 16h/8h et une température de 18°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

Traitement et inoculation des plantes et quantification des symptômes

Trois semaines post semi, les plantules de blé arrivées au stade 3-4 feuilles sont traitées avec les molécules. Chaque pot reçoit 30ml de traitement à l'aide d'un pulvérisateur manuel. 48h après l'application des produits, les plantes sont inoculées par une suspension de spores à 10^6 spores/ml. Afin de favoriser l'adhésion du traitement sur les feuilles nous avons choisi d'utiliser un adjuvant et pour assurer l'adhésion du champignon lors de l'inoculation, 0,05% de Tween 20 (Sigma Aldrich) ont été ajoutés à la suspension sporale.

Suite à l'inoculation et afin de favoriser la germination des spores et l'installation de l'infection, chaque pot est couvert par un sac en polystyrène transparent pendant 72 heures post inoculation. Le pourcentage des symptômes présentant des pycnides sur la 3^{ème} feuille de chaque plante est estimé au 21^{ème} jour post inoculation.

Analyses histopathologiques

La germination des spores, la croissance du champignon ainsi que la pénétration du champignon dans les tissus foliaires sont évalués en utilisant le calcofluor. La colonisation du mésophylle, est quant à elle déterminée par coloration du champignon au bleu de Trypan. Ces observations cytologiques sont réalisées sur des segments foliaires de 2cm coupées sur la 3^{ème} feuille de plantes ayant subi les différents traitements.

Révélation du champignon au calcofluor

Les fragments foliaires sont immergés pendant 5min dans une solution de Calcofluor (Brightener 28, Sigma) à 0,1% (w/v) préalablement solubilisé dans un tampon Tris-HCL à 0,1M (pH 8,5). Ce marqueur fluorescent révèle le champignon par fixation de la chitine composé majeur des parois cellulaires fongiques. Les feuilles sont ensuite rincées à l'eau distillée pendant 2 min, puis séchées et placées entre lames et lamelles pour une observation sous UV au

microscope à épifluorescence (Nikon, eclipse 80i). Des photographies sont prises à l'aide d'une caméra (Digital camera, DXM1200C) et d'un logiciel de capture d'image (NIS elements BR).

Coloration du champignon au bleu Trypan

Les segments foliaires sont décolorés dans un premier temps dans une solution de décoloration (éthanol/acide acétique glaciale, 3 :1, v/v) pendant une nuit. La solution de décoloration est changée une fois. Après décoloration complète, les segments foliaires sont réhydratés pendant 4h dans de l'eau distillée avant de les fixer dans une solution de lactoglycérol (acide lactique/glycérol/eau distillée, 1 :1 :1, v/v/v).

La coloration du champignon est réalisée en déposant 3 gouttes d'une solution de lactoglycérol bleu Trypan à 0,1% sur chaque segment foliaire préalablement déposé sur une lame de microscope. Les segments foliaires sont placés sur une plaque chauffante à 70°C pendant 2h afin de permettre la pénétration du colorant à l'intérieur des segments foliaires pour colorer le mycélium du champignon à l'intérieur des tissus. Après rinçage à l'eau distillée, les segments sont hydratés à nouveau dans la solution de lactoglycérol puis placés entre lame et lamelles et observés au microscope (Nikon, eclipse 80i) sous lumière blanche. Les photographies sont prises à l'aide d'une caméra (Digital camera, DXM1200C) et d'un logiciel de capture d'images (NIS elements BR).

Extraction de l'ARN en utilisant le *RNeasy Mini Kit* (protocole du fournisseur avec modifications)

Tampon d'extraction utilisé RLT

Ajouter 10 µl de β-mercaptoéthanol pour 1 ml de tampon RLT (tampon peut être conservé à température ambiante pendant plus d'un mois)

Rajouter 4 volumes d'éthanol (96-100%) au tampon RPE pour les rinçages.

DNase I, RNase-Free (lyophilisée) dissoute dans 550 µl RNase-Free Water en faisant attention à la poudre de l'enzyme et par la suite on la met dans un tube eppendorf de 1,5 ml (il s'agit de l'enzyme pure qu'il faut diluer par la suite par le buffer RDD). Il faut 10µl de Dnase+70µl tampon RDD/echantillon

Etapes d'extraction:

- Broyage de maximum 100 mg de feuilles à l'azote liquide dans un mortier et ajout de 450 µl de tampon RLT (récupérer le broyat liquide dans un tube eppendorf)
- Bain marie à 57°C pendant 2 min
- Transfert du lysat dans la colonne violette placée dans un tube de collection de 2ml. Centrifugation pendant 2 min à vitesse maximale.
- Transfert du surnageant du tube de collection dans un nouveau tube eppendorf et rajouter la moitié du volume en éthanol (96-100%) et mélanger avec la pipette.
- Transfert de l'échantillon dans la colonne rose puis centrifugation pendant 15sec (1min) à ≥ 8000 G ($\geq 10,000$ rpm) et jeter l'élution.

- Ajout de 350 µl tampon RW1 à la colonne et centrifuger pendant 15sec (1min) à $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) et jeter l'élution.
- Ajout de 80 µl de l'enzyme (DNase buffer) et laisser agir 20 min
- Ajout de 350 µl tampon RW1 à la colonne et centrifuger pendant 15sec (1min) à $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) et jeter l'élution.
- Ajout de 500 µl tampon RPE à la colonne et centrifuger pendant 15sec (1min) à $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) et jeter l'élution.
- Ajout de 500 µl tampon RPE à la colonne et centrifuger pendant 15sec (1min) à $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) et jeter l'élution.
- Ajout de 200 µl tampon RPE à la colonne et centrifuger pendant 15sec (1min) à $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) et jeter l'élution.
- Ajout de 200 µl tampon RPE à la colonne et centrifuger pendant 2 min à $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) et jeter l'élution.
- Placer la colonne rose dans un nouveau tube de collecte et centrifuger pendant 1 min à vitesse maximale pour sécher la membrane (optionnel)
- Placer la colonne rose dans un nouveau tube eppendorf (1.5ml) et ajouter 30 µl d'eau RNase-free (attendre 1 min) puis centrifuger et rajouter 30 µl d'eau RNase-free et centrifuger à nouveau à $\geq 8000 \times g$.
- Jeter les colonnes roses et récupérer les tubes qui contiennent l'ARN extrait.
- Doser la quantité totale d'ARN et stocker à (-80°) (5 µl de l'échantillon + 65 µl eau distillée stérile)

Dosage de l'activité Peroxydase (Mitchell et al., 1994)

- **Solutions mères :**
 KH_2PO_4 1M : 100ml : 13,609 g + H_2O 100 ml
 K_2HPO_4 1M : 100ml : 17,418 g + H_2O 100 ml
ABTS 5mM (10x): à garder à l'obscurité
 274 mg dans 100ml d' H_2O
Acétate de sodium 250 mM pH 4,4 (10x) :
 2,05 g dans 100 ml d' H_2O
 H_2O_2 25mM (100x):
 219 µl d' H_2O_2 35% dans 100 ml d' H_2O
- **Tampon d'extraction : Tampon phosphate 100 mM, pH 7.0 :**
 6,15 ml $\text{K}_2 \text{HPO}_4$
 3,85 ml KH_2PO_4
 H_2O qsp 100 ml
- **Mélange réactionnel (à garder à l'obscurité) :**
 10 ml d'ABTS 5 Mm (500 µl final)
 10 ml d'acétate de sodium 250 mM, pH 4,4 (25 mM final)
 1 ml d' H_2O_2 25 mM (250 µM final)
 H_2O qsp 100 ml
- **Extraction à 4°C**

Peser 100 mg de fragments foliaires, les broyer dans un mortier avec du sable de fontainebleau. Ajouter 1 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 7. Transverser le contenu du mortier dans un eoppendorf de 2ml. Laisser dans la glace.

Centrifuger à 12000 G, 5 minutes, à 4°C.

Dans la cuve spectro, mettre 995 µl du mélange réactionnel, ajouter 5 µl du surnageant, homogénéiser rapidement au Vortex et lire la DO rapidement.

DO mesurée à 412 nm, en autorate car l'activité se mesure en fonction du temps. Dosage sur 5 min, toutes les 30 secondes. Expression en nKat, par mg de protéines.

$\epsilon=32,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Annexe 2. Supporting Information de l'article 2

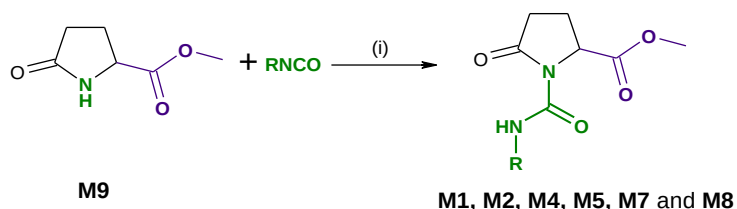
Experimental section

General Remarks. Starting materials were commercially available and were used without further purification. Melting points were measured on a MPA 100 OptiMelt® apparatus and are uncorrected. NMR spectra were acquired at 400 MHz for ^1H NMR and 100 MHz for ^{13}C NMR on a Varian MR 400 spectrometer. Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to CDCl_3 (7.26 ppm; 77.1 ppm). Splitting patterns are designed as: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; quint, quintuplet; m, multiplet and sym m, symmetric multiplet. Coupling constants J are reported in hertz (Hz). Thin layer chromatographies were realized on Macherey Nagel silica gel plates with a fluorescent indicator and were visualized with UV-lamp at 254 nm and 366 nm. Column chromatographies were performed using a CombiFlash Rf Companion (Teledyne-Isco System) and RediSep preppacked columns. IR spectra were recorded on a Varian 640-IR FT-IR Spectrometer. Elemental analyses (C, H, N) of new compounds were determined by “Welience”, Faculté de Sciences Mirande, Université de Bourgogne, Dijon, France.

γ -Aminobutyric acid (GABA), L-pyroglutamic acid and 2-oxo-1,3-thiazolidin-4-carboxylic acid **M28** were commercially available.

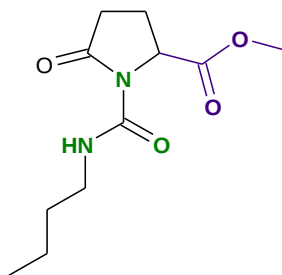
General procedure for the synthesis of acylureas **M1**, **M2**, **M4**, **M5**, **M7** and **M8** (Scheme 1).

Isocyanate (R-NCO) (1-1.2 equiv.) dissolved in toluene was added dropwise with a syringe to a stirred solution of methyl pyroglutamate (**M9**) (1 equiv.) in refluxed toluene (20 mL) (Scheme 1). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24-48 h. After cooling to room temperature, methanol was added to the medium. The mixture was concentrated and purified by flash chromatography (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 $\rightarrow$ *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to afford the pure products.



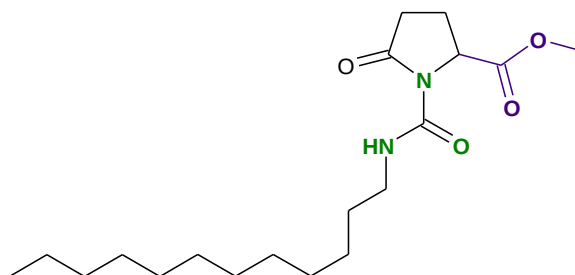
Scheme 1. Reagents and conditions: (i) 1-1.2 eq. R-NCO , toluene, reflux, 24-48 h.

Methyl 1-[(butylamino)carbonyl]-5-oxoprolinate (**M1**)



Acylurea **M1** was obtained with the same physico-chemical properties as previously described in the literature by our group.¹

Methyl 1-[(dodecylamino)carbonyl]-5-oxoprolinate (**M2**).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate (**M9**) (2.82 g, 19.7 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-dodecyl isocyanate (5.00 g, 23.6 mmol, 1.2 equiv.) and the mixture heated at reflux under nitrogen atmosphere for 24 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by chromatography on flash chromatography (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M2** as yellow oil in 55% yield, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.67;

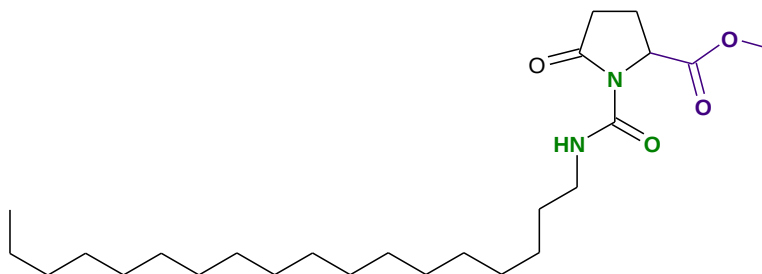
IR ν cm^{-1} : 3316, 2922, 2853, 1720, 1539, 1438, 1378, 1206, 1043, 596.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.26 (br s, 18H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.54 (quint, J = 13.9, 6.9, 2.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.01-2.10 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.27-2.40 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.52-2.62 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.69-2.80 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 3.20-3.36 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 4.80 (dd, J = 9.8, 2.7 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 8.27 (br s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 14.1 (CH_3), 21.3 (CH_2), 22.7 (CH_2), 26.9 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.6 (3 CH_2), 29.7 (2 CH_2), 31.9 (CH_2), 32.0 (CH_2), 40.0 (CH_2), 52.7 (CH_3), 58.0 (CH), 152.2 (C), 172.0 (C), 176.3 (C).

Anal. calcd for **C₁₉H₃₄N₂O₄** (354.49 g/mol): C, 64.38; H, 9.67; N, 7.90%. Found: C, 64.76; H, 9.78; N, 7.87%. **LogP**: 3.55 ± 0.62.

Methyl 1-[(octadecylamino)carbonyl]-5-oxoprolinate (**M4**).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate (**M9**) (0.97 g, 6.8 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-octadecyl isocyanate (2.0 g, 6.8 mmol, 1 equiv.) and the mixture heated at reflux under nitrogen atmosphere for 48 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica preppacked column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M4** as a white solid in 53% yield, *R_f* (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.65;

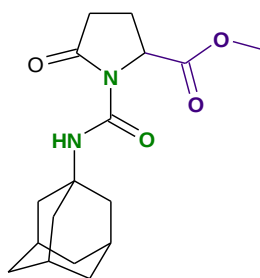
IR ν cm⁻¹: 3336, 2918, 1750, 1716, 1532, 1462, 1242, 1202, 720, 584.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₂(CH₂)₁₅CH₂CH₃), 1.25 (br s, 30H, CH₂(CH₂)₁₅CH₂CH₃), 1.50-1.60 (m, 2H, CH₂(CH₂)₁₅CH₂CH₃), 2.01-2.09 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.27-2.40 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.52-2.61 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.69-2.80 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 3.20-3.36 (m, 2H, CH₂(CH₂)₁₅CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.80 (dd, *J* = 9.4, 2.7 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 8.27 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.1 (CH₃), 21.2 (CH₂), 22.7 (CH₂), 26.7 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (7CH₂), 31.8 (CH₂), 31.9 (CH₂), 40.1(CH₂), 52.6 (CH₃), 58.0 (CH), 152.1 (C), 172.0 (C), 176.3 (C).

Anal. calcd for **C₂₅H₄₆N₂O₄** (438.66 g/mol): C, 68.45; H, 10.57; N, 6.39%. Found: C, 68.27; H, 10.30; N, 6.26%. **LogP**: 6.73 ± 0.62.

Methyl 1-[(1-adamantylamino)carbonyl]-5-oxoprolinate (M5).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate (**M9**) (4.05 g, 28.0 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and 1-adamantyl isocyanate (5.00 g, 28.0 mmol, 1.2 equiv.) and the mixture heated at reflux under nitrogen atmosphere for 24 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M5** as a white solid in 53% yield, mp 147-148 °C, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.67;

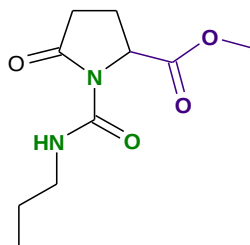
IR ν cm⁻¹: 3287, 2900, 1747, 1717, 1546, 1379, 1277, 1200, 768, 609.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.65-1.70 (m, 6H, 3CH₂), 1.98-2.03 (m, 7H, 3CH₂ + CH₂CH₂CH), 2.05-2.10 (m, 3H, 3CH), 2.22-2.35 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.49-2.60 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.66-2.78 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 4.76 (dd, J = 9.4, 2.8 Hz, CH₂CH₂CH), 8.20 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 21.0 (CH₂), 29.6 (3CH), 32.0 (CH₂), 36.3 (3CH₂), 41.6 (3CH₂), 51.6 (C), 52.6 (CH₃), 57.9 (CH), 150.3 (C), 172.0 (C), 176.3 (C).

Anal. calcd for C₁₇H₂₄N₂O₄ (320.39 g/mol): C, 63.73; H, 7.55; N, 8.74%. Found: C, 63.62; H, 7.91; N, 8.76%. LogP: -0.58 ± 0.63.

Methyl 5-oxo-1-[(propylamino)carbonyl]prolinate (M7).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate (**M9**) (5.09 g, 35.5 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-propyl isocyanate (3.63 g, 42.7 mmol, 1.2 equiv.) and the

mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 26 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M7** as a yellow solid in 56% yield, mp 50-51 °C, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.54;

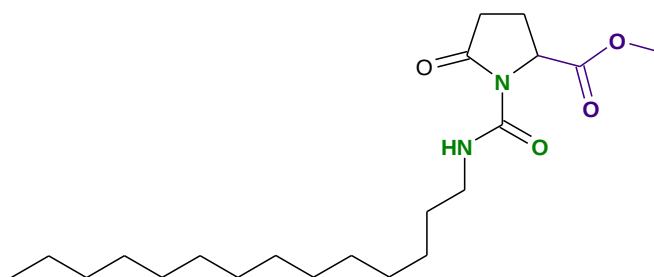
IR ν cm⁻¹: 3299, 2960, 2875, 1747, 1714, 1681, 1537, 1461, 1258, 1205, 993, 544.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.94 (t, J = 7.5 Hz, 3H, NHCH₂CH₂CH₃), 1.58 (sext, J = 14.5, 7.4 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₃), 2.02-2.10 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.29-2.40 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.53-2.62 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.70-2.80 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 3.19-3.33 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.80 (dd, J = 9.7, 2.8 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 8.30 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 11.3 (CH₃), 21.3 (CH₂), 22.9 (CH₂), 31.9 (CH₂), 41.6 (CH₂), 52.7 (CH₃), 58.0 (CH), 152.2 (C), 172.0 (C), 176.3 (C).

Anal. calcd for **C₁₀H₁₆N₂O₄** (228.25 g/mol): C, 52.62; H, 7.07; N, 12.27%. Found: C, 52.49; H, 7.19; N, 12.38%. **LogP**: -1.24 ± 0.62.

Methyl 5-oxo-1-[(tetradecylamino)carbonyl] proline (**M8**).



The general procedure was followed using methyl pyroglutamate (**M9**) (1.79 g, 12.5 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-tetradecyl isocyanate (3.0 g, 12.5 mmol, 1 equiv.) and the mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 24 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M8** as a white solid in 26% yield, mp 44-45°C, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.68;

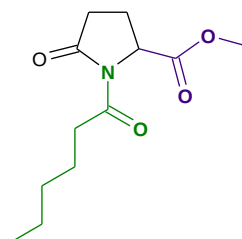
IR ν cm⁻¹: 3338, 2917, 2848, 1743, 1721, 1535, 1462, 1341, 1206, 989, 721, 596.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂(CH₂)₁₁CH₂CH₃), 1.25 (br s, 22H, CH₂(CH₂)₁₁CH₂CH₃), 1.49-1.57 (m, 2H, CH₂(CH₂)₁₁CH₂CH₃), 2.01-2.10 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.27-2.39 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.52-2.61 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.69-2.80 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 3.20-3.36 (m, 2H, CH₂(CH₂)₁₁CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.80 (dd, *J* = 9.4, 2.7 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 8.27 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 14.1 (CH₃), 21.2 (CH₂), 22.7 (CH₂), 26.8 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (5CH₂), 29.7 (CH₂), 31.8 (CH₂), 31.9 (CH₂), 39.9 (CH₂), 52.6 (CH₃), 58.0 (CH), 152.1 (C), 172.0 (C), 176.3 (C).

Anal. calcd for C₂₁H₃₈N₂O₄ (382.55 g/mol): C, 65.94; H, 10.01; N, 7.32%. Found: C, 66.26; H, 10.30; N, 7.48%. **LogP**: 4.61 ± 0.62;

1-Hexanoyl-5-oxo-pyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester (M3)



A mixture of methyl pyroglutamate **M9** (5.0 g, 34.9 mmol), hexamethyldisiloxane (HMDS) (5.63 g, 34.9 mol), saccharine (0.08 g, 0.70 mmol) and hexanoyl chloride (1.2 eq.), in dichloromethane (30mL) was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24 h. The residue was partitioned between water and ethyl acetate. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and then filtered and concentrated. The residue was separated by flash chromatography on silica pre-packed column, eluting EtOAc/*n*-heptane 5:5 to generate pure product **M3** as a white solid in 40% yield, mp 78-80 °C, *R_f* (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.65;

IR ν cm⁻¹: 2951, 1736, 1684, 1645, 1541, 1494, 1399, 1242, 1209, 1155, 1018, 698, 421.

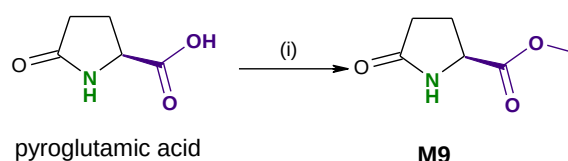
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.30-1.36 (m, 4H, 2CH₂), 1.59-1.68 (m, 2H, CH₂), 2.03-2.11 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.27-2.39 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.52-2.60 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.67-2.77 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.82-3.01 (m, 2H, CH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 4.76 (dd, *J* = 9.5, 2.8 Hz, 1H, CH₂CH₂CH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.9 (CH₃), 21.3 (CH₂), 22.4 (CH₂), 23.6 (CH₂), 31.2 (CH₂), 32.0 (CH₂), 36.5 (CH₂), 52.6 (CH₃), 57.8 (CH), 171.6 (C), 174.2 (2C).

Anal. calcd for **C₁₂H₁₉NO₄** (241.29 g/mol): C, 59.73; H, 7.94; N, 5.80%. Found: C, 59.60; H, 7.80; N, 6.26%. **LogP**: 1.71 ± 0.26.

L-Methyl pyroglutamate (**M9**)

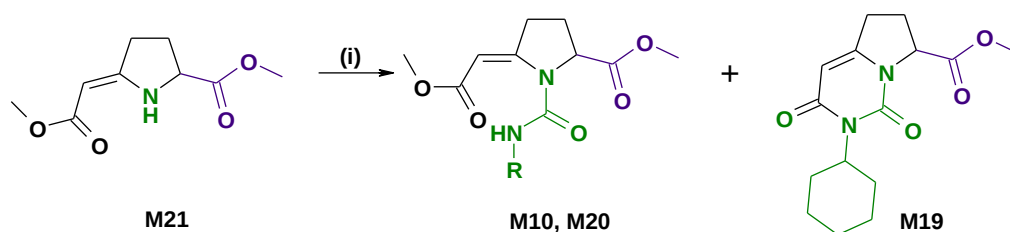
L-Methylpyroglutamate (**M9**) was obtained by esterification of pyroglutamic acid following a described procedure.² The reaction is carried out in a mixture of refluxing methanol and chloroform which, in the presence of a catalytic amount of methanesulphonic acid, via a soxhlet filled with 3Å molecular sieves, allows the removal of water formed during the reaction (Scheme 2). Methyl ester **M9** was thus obtained with the same physico-chemical properties as described in the literature.²



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) methanesulfonic acid, molecular sieves 3Å, MeOH/CHCl₃, reflux, 98%.

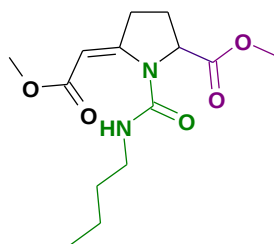
General procedure for the synthesis of vinylogous acylureas **M10 and **M20** and of bicyclic molecule **M19** (Scheme 3).**

Isocyanates (1 equiv.) dissolved in toluene were added dropwise with a syringe to a stirred solution of methyl 5-(2-methoxy-2-oxoethylidene)prolinate (**M21**) (1 equiv.) in refluxed toluene (20 mL). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 48 h. After cooling to room temperature, methanol was added. The mixture was concentrated and purified by flash chromatography (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to afford the products **M10**, **M19** and **M20** (Scheme 3).



Scheme 3. Reagents and conditions: (i) 1 eq. R-NCO, toluene, reflux, 48 h.

Methyl 1-[(butylamino)carbonyl]-5-(2-methoxy-2-oxoethylidene) proline (M10)



The general procedure was followed using methyl 5-(2-methoxy-2-oxoethylidene)proline (**M21**) (3.00 g, 15.0 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-butyl isocyanate (1.49 g, 15.0 mmol, 1 equiv.) and mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 48 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M10** as yellow oil in 24% yield, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.3;

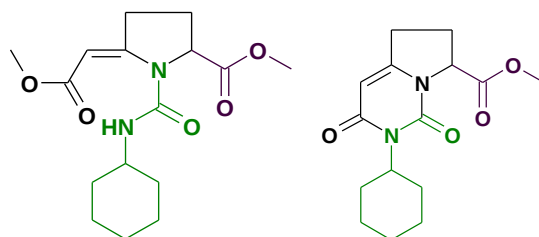
IR ν cm^{-1} : 3311, 2955, 1743, 1655, 1599, 1435, 1209, 1073, 801, 554.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.91 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.32-1.42 (m, 2H, CH_2), 1.48-1.56 (m, 2H, CH_2), 2.01-2.19 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.24-2.35 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 3.09-3.22 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 3.24-3.32 (m, 2H, CH_2), 3.69 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 4.45 (dd, J = 9.2, 5.3 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 9.07 (s, 1H, CH), 11.79 (s, 1H, NH) .

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.8 (CH_3), 20.3 (CH_2), 25.5 (CH_2), 31.7 (CH_2), 35.1 (CH_2), 38.8 (CH_2), 50.6 (OCH_3), 52.6 (OCH_3), 60.9 (CH), 88.1(CH), 169.8 (2C), 171.6 (C), 173.5 (C).

Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ (298.34 g/mol): C, 56.36; H, 7.43; N, 9.39%. Found: C, 56.51; H, 7.39; N, 9.70%. **LogP**: 0.70 ± 0.61 .

Methyl 1-[(cyclohexylamino)carbonyl]-5-(2-methoxy-2-oxoethylidene)prolinate (M20) and methyl 2-cyclohexyl-1,3-dioxo-1,2,3,5,6,7-hexahydropyrrolo[1,2-c]pyrimidine-7-carboxylate (M19).



M20 and M19

The general procedure was followed using methyl 5-(2-methoxy-2-oxoethylidene)prolinate (**M21**) (3.00 g, 15.0 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and cyclohexyl isocyanate (1.88 g, 15.0 mmol, 1 equiv.) and heated at reflux under nitrogen atmosphere for 48 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure products **M20** and **M19**.

Product **M20**: white solid; 56% yield, mp 120-122 °C, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.33.

IR ν cm⁻¹: 2935, 1741, 1703, 1649, 1524, 1412, 1199, 1100, 796, 552.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.18-1.33 (m, 4H, 2CH₂), 1.33-1.46 (m, 2H, CH₂), 1.66-1.77 (m, 2H, CH₂), 1.86-1.97 (m, 2H, CH₂), 2.11-2.21 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.25-2.37 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 3.10-3.28 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.78-3.90 (m, 1H, CH), 4.46 (dd, J = 11.4, 6.0 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), (d, J = 7.6 Hz, 1H, CH), 11.80 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 24.8 (CH₂), 25.5 (CH₂), 25.8 (CH₂), 33.1 (2CH₂), 35.1 (2CH₂), 47.5 (CH), 50.6 (CH₃), 52.6 (CH₃), 60.9 (CH), 88.0 (CH), 168.9 (C), 169.8 (C), 171.6 (C), 173.5 (C).

Anal. calcd for **C₁₆H₂₄N₂O₅** (324.38 g/mol): C, 59.24; H, 7.46; N, 8.64%. Found: C, 59.43; H, 7.69; N, 9.00%. LogP: 0.70 ± 0.61.

Product **M19**: yellow oil; 10% yield, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.6;

IR ν cm⁻¹: 2933, 1709, 1637, 1363, 1150, 848, 601, 421.

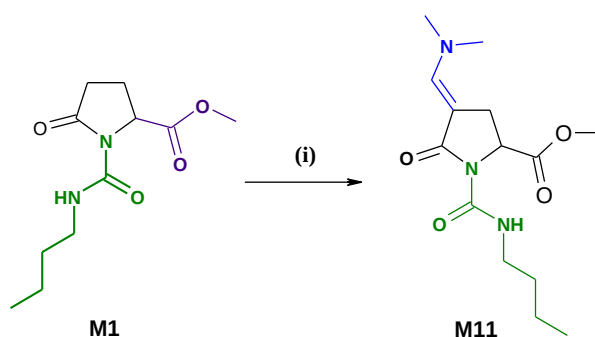
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.17-1.41 (m, 4H, 2CH₂), 1.68-1.74 (m, 2H, CH₂), 1.74-1.94 (m, 4H, 2CH₂), 2.38-2.44 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.89-2.94 (m, 3H, CH₂CH₂CH), 3.68 (s,

3H, OCH₃), 4.54-4.63 (m, 1H, CH), 4.72 (dd, *J* = 9.0, 5.3 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 5.76 (s, 1H, CH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 22.4 (2CH₂), 26.7 (CH₂), 30.9 (2CH₂), 31.6 (CH₂), 35.1 (2CH₂), 34.9 (CH₂), 52.5 (CH₃), 54.6 (CH), 59.0 (CH), 100.9 (CH), 168.9 (C), 150.2 (C), 162.0 (C), 164.4 (C), 172.5 (C).

Anal. calcd for C₁₅H₂₀N₂O₄ (292.34 g/mol): C, 61.63; H, 6.90; N, 9.58%. Found: C, 61.90; H, 7.11; N, 9.94%. **LogP**: 2.62 ± 0.40.

Methyl 1-[(butylamino)carbonyl]-4-[(dimethylamino)methylene]-5-oxoprolinate (**M11**)



Scheme 4. Reagents and conditions: (i) Brederick's reagent (2 equiv.), toluene, reflux, 4h.

A mixture of compound **M1** (1 equiv.), and Brederick's reagent (3 equiv.) was heated at reflux for 4 h (Scheme 4). Volatile components were evaporated *in vacuo*, dichloromethane was then added (200 mL) and the solution was washed with distilled water. The organic phase was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate concentrated *in vacuo*. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M11** as a white solid in 25% yield; mp 117-118 °C, *R_f* (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.56.

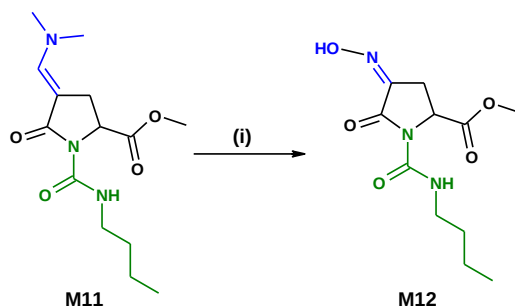
IR ν cm⁻¹: 3311, 2960, 1752, 1692, 1599, 1528, 1437, 1334, 1248, 1115, 630, 459.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 1.33-1.42 (m, 2H, CH₂), 1.50-1.57 (m, 2H, CH₂), 2.89 (dd, *J* = 15.0, 2.9 Hz, 1H, CH₂CH), 3.03 (s, 6H, 2CH₃, N(CH₃)₂), 3.22-3.37 (m, 3H, CH₂ + CH₂CH), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 4.72 (dd, *J* = 10.8, 3.5 Hz, 1H, CH₂CH), 7.07 (s, 1H, CHN(CH₃)₂), 8.63 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.7 (CH₃), 20.0 (CH₂), 26.0 (CH₂), 31.8 (2CH₂), 39.4 (2CH₃), 52.4 (CH₃), 55.0 (CH), 91.5 (C), 146.1 (CH), 153.8 (C), 172.0 (C), 172.7 (C).

Anal. calcd for **C₁₄H₂₃N₃O₄** (297.36 g/mol): C, 56.55; H, 7.80; N, 14.13%. Found: C, 56.90; H, 8.11; N, 14.53%. **LogP**: 0.94 ± 0.68.

Methyl 1-[(butylamino) arbonyl]-4-(hydroxyimino)-5-oxoprolinate (**M12**).



Scheme 5. Reagents and conditions: (i) CH_3COOH , NaNO_2 , H_2O , 0-5°C, 3h.

A cold solution (0-5°C) of sodium nitrite (460 mg, 66.6 mmol, 1 equiv.) in water (3 mL) was added to a stirred solution of enamine **M11** (500 mg, 16.8 mmol, 4 equiv.) in acetic acid for 3 h (Scheme 5). The solution was neutralized with saturated aqueous NaHCO_3 (50 mL) and was extracted with dichloromethane (2×100 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 and then evaporated, to generate pure product **M12** as white powder in 83% yield; mp (Et_2O) 119–122°C; R_f ($\text{EtOAc}/n\text{-heptane}$ 50/50) = 0.20;

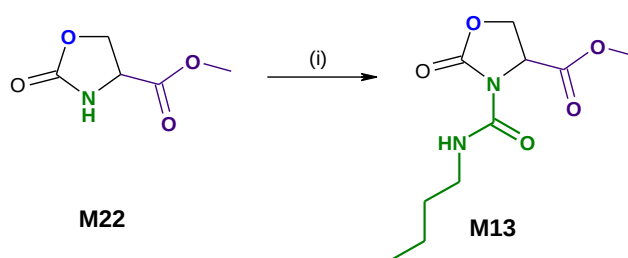
IR ν cm^{-1} : 3244, 2930, 1752, 1715, 1651, 1524, 1386, 1244, 1179, 950, 730, 532.

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.94 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3), 1.33-1.43 (m, 2H, CH_2), 1.53-1.60 (m, 2H, CH_2), 2.91 (dd, J = 19.8; 3.0 Hz, 1H, CH_2CH), 3.13 (dd, J = 19.8; 9.9 Hz, 1H, CH_2CH), 3.27-3.41 (m, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.88 (dd, J = 9.8, 3.0 Hz, 1H, CH_2CH), 8.32 (s, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, NOH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7 (CH_3), 19.9 (CH_2), 24.4 (CH_2), 31.5 (CH_2), 39.9 (CH_2), 53.0 (CH_3), 53.8 (CH), 150.2 (C), 151.8 (C), 163.8 (C), 170.9 (C).

Anal. calcd for **C₁₁H₁₇N₃O₅** (271.28 g/mol): C, 48.70; H, 6.32; N, 15.49%. Found: C, 49.06; H, 6.67; N, 15.90%. **LogP**: -0.38 ± 0.66.

Methyl 3-[(butylamino)carbonyl]-2-oxo-1,3-oxazolidine-4-carboxylate (**M13**).



Scheme 6. Reagents and conditions: (i) 1.2 eq. *n*-butyl isocyanate, toluene, reflux, 24h.

n-Butyl isocyanate (1.64 g, 16.5 mmol, 1.2 equiv.) was added to a mixture of methyl *DL*-2-oxo-1, 3-oxazolidine-4-carboxylate **M22** (2.00 g, 13.8 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and the medium was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 24 hours (Scheme 6). After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-hexane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M13** a yellow oil in 54% yield, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.36;

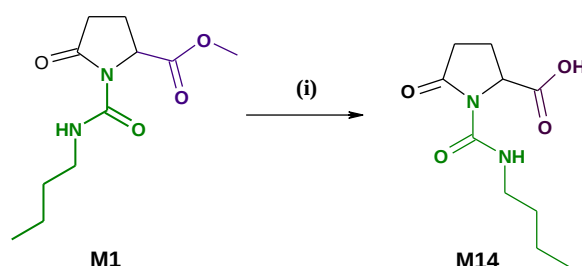
IR ν cm^{-1} : 3358, 2958, 1753, 1700, 1538, 1396, 1206, 1101, 763, 609.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.32-1.42 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.51-1.59 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.25-3.37 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 4.34 (dd, $J = 9.4, 3.9$ Hz, 1H, SCH_2CH), 4.56 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H, SCH_2CH), 4.94 (dd, $J = 9.4, 3.9$ Hz, 1H, SCH_2CH), 7.68 (br s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.6 (CH_3), 19.9 (CH_2), 31.5 (CH_2), 39.9 (CH_2), 53.2 (CH_3), 55.2 (CH), 64.8 (CH_2), 150.7 (C), 154.7 (C), 169.5 (C).

Anal. calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ (244.25 g/mol): C, 49.18; H, 6.60; N, 11.47%. Found: C, 49.27; H, 6.22; N, 11.90%. **LogP**: -0.20 ± 0.65 .

1-Butylcarbamoyl-5-oxo-pyrrolidine-2-carboxylic acid (**M14**)



Scheme 7. Reagents and conditions: (i) 1.5 equiv. Cs_2CO_3 , H_2O , reflux, 6h, 89%.

Methyl 1-[(butylamino)carbonyl]-5-oxoproline (**M1**) (1 equiv.) was mixed with a 2N aqueous solution of cesium carbonate (Cs_2CO_3) (1.5 equiv.) and then refluxed for 6 hours (Scheme 7). After complete solubilization and cooling the medium at rt, concentrated HCl was added till a white precipitate formed. The precipitate was washed with water and dried to provide pure carboxylic acid **M14** as a white solid in 89% yield.

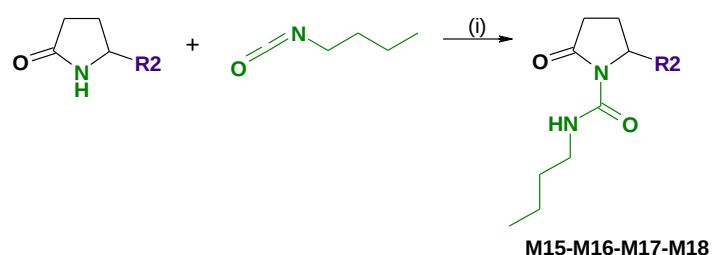
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 0.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.17-1.27 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.41-1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.64-1.74 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.87-1.97 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.25-2.32 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 3.20 (dt, $J = 7.08, 2.36$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 4.05 (t, $J = 6.68$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 8.22 (s, 1H, NH), 12.23 (br s, 1H, CO_2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 13.9 (CH_3), 19.8 (CH_2), 27.4 (CH_2), 29.5 (CH_2), 30.0 (CH_2), 37.7 (CH_2), 55.8 (CH), 157.2 (C), 174.1 (C), 174.5 (C).

Anal. calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ (228.25 g/mol): C, 52.62; H, 7.07; N, 12.27%. Found: C, 52.19; H, 6.79; N, 12.49%. **LogP**: -1.24 ± 0.62 .

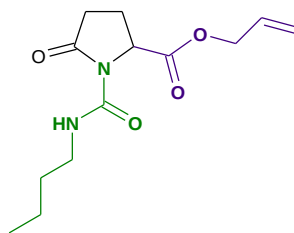
General procedure for the synthesis of derivatives M15, M16, M17 and M18, analogues of M1 with different substitutions in position 5 (Scheme 8).

To a stirred solution of substrate (1 equiv.) in refluxed toluene (20 mL), was added dropwise with a syringe *n*-butyl isocyanate (1-1.2 equiv.) dissolved in toluene. The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at reflux for 24-48 h (Scheme 8). After cooling to room temperature, methanol was added. The mixture was concentrated and purified by flash chromatography on silica pre-packed column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 $\rightarrow$ *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to afford the products.



Scheme 8. Reagents and conditions: (i) 1-1.2 equiv. $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{NCO}$, toluene, reflux, 24-48 h.

Allyl 1-[(butylamino)carbonyl]-5-oxoprolinate (**M15**).



The general procedure was followed using allyl 5-oxoprolinate (3.0 g, 17.73 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-butyl isocyanate (2.26 g, 18.0 mmol, 1.02 equiv.). The mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 48 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M15** a yellow oil in 48% yield, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.73.

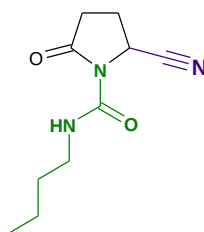
IR ν cm^{-1} : 3317, 2960, 1717, 1539, 1459, 1368, 1255, 1193, 734, 595.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.29-1.41 (m, 2H, CH_2), 1.45-1.57 (m, 2H, CH_2), 2.07-2.18 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.32-2.37 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.46-2.53 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.76 (s, 2H, CH_2), 2.92-3.01 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 3.21-3.33 (m, 4H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ + OCH_2), 4.70 (dd, J = 8.6, 1.3 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 6.7 (br s, 1H, CH), 8.47 (br s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7 (CH_3), 20.0 (CH_2), 28.4 (CH_2), 30.6 (CH_2), 32.2 (CH_2), 38.3 (CH_2), 59.3 (CH), 65.4 (CH_2), 118.3 (CH_2), 132.2 (CH), 156.2 (C), 169.6 (C), 169.9 (C).

Anal. calcd for **$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$** (268.32 g/mol): C, 58.19; H, 7.51; N, 10.44%. Found: C, 58.26; H, 7.39; N, 10.68%. **LogP**: 0.16 ± 0.63 .

N-Butyl-2-cyano-5-oxopyrrolidine-1-carboxamide (**M16**).



The general procedure was followed using 5-oxopyrrolidine-2-carbonitrile (3.0 g, 27.2 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-butyl isocyanate (2.7 g, 27.2 mmol, 1 equiv.); the mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 24 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was then added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M16** as a yellow oil in 71% yield.

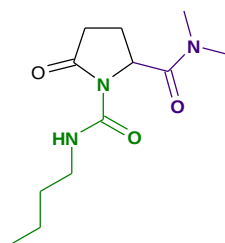
IR ν cm⁻¹: 2957, 1739, 1692, 1437, 1364, 1208, 1040, 596.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.91 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.34 (sext, *J* = 15.2, 7.5 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.52 (quint, *J* = 14.2, 7.2 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 2.33-2.45 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 2.59-2.70 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.82-2.95 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 3.29 (dd, *J* = 7.5, 2.1 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 5.02 (dd, *J* = 7.7, 3.4 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 8.04 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.6 (CH₃), 19.9 (CH₂), 22.7 (CH₂), 31.5 (CH₂), 31.7 (CH₂), 39.8 (CH₂), 46.4 (CH), 117.6 (C), 150.9 (C), 174.7 (C).

Anal. calcd for **C₁₀H₁₅N₃O₂** (209.25 g/mol): C, 57.40; H, 7.23; N, 20.08%. Found: C, 57.78; H, 7.06; N, 20.43%. **LogP**: -1.03 ± 0.62.

*N*¹-butyl-*N*²,*N*²-dimethyl-5-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxamide (**M17**).



The general procedure was followed using *N,N*-dimethyl-5-oxoprolineamide (5.0 g, 32.0 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-butyl isocyanate (3.17 g, 32.0 mmol, 1 equiv.); the mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 24 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M17** as a white solid in 45% yield, mp 48-49 °C.

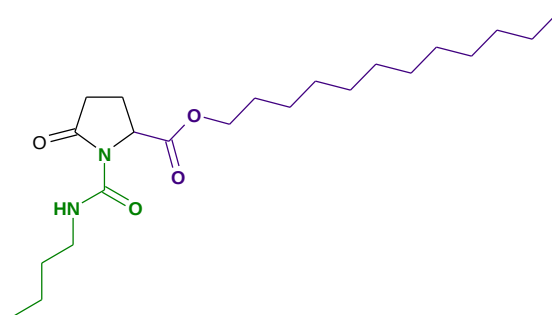
IR ν cm⁻¹: 2957, 1739, 1692, 1437, 1364, 1208, 1040, 596.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.88 (dt, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 3H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.32 (m, *J* = 15.0, 7.4 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.48 (quint, *J* = 14.2, 7.5 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.85-1.93 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.13-2.26 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.48 (dd, *J* = 17.5, 8.2 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 2.85 (quint, *J* = 18.6, 7.8 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 2.95 (s, 3H, N(CH₃)₂), 3.10 (s, 3H, N(CH₃)₂), 3.12-3.22 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 3.23-3.33 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 5.12 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 8.36 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.7 (CH₃), 20.0 (CH₂), 21.3 (CH₂), 31.6 (CH₂), 32.0 (CH₂), 36.0 (CH₃), 36.8 (CH₃), 39.6 (CH₂), 59.2 (CH), 152.6 (C), 171.1 (C), 177.0 (C).

Anal. calcd for C₁₂H₂₁N₃O₃ (255.32 g/mol): C, 56.45; H, 8.29; N, 16.46%. Found: C, 56.73; H, 8.36; N, 16.24%. **LogP**: -1.63 ± 0.63.

Dodecyl 1-[(butylamino)carbonyl]-5-oxoprolinate (**M18**).



The general procedure was followed using dodecyl 5-oxoprolinate (5.0 g, 16.8 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) and *n*-butyl isocyanate (1.99 g, 20.0 mmol, 1.2 equiv.) and the mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 48 hours. After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M18** as a yellow oil in 78% yield, *R_f* (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.7.

IR ν cm⁻¹: 3317, 2960, 1717, 1539, 1459, 1368, 1255, 1193, 734, 595.

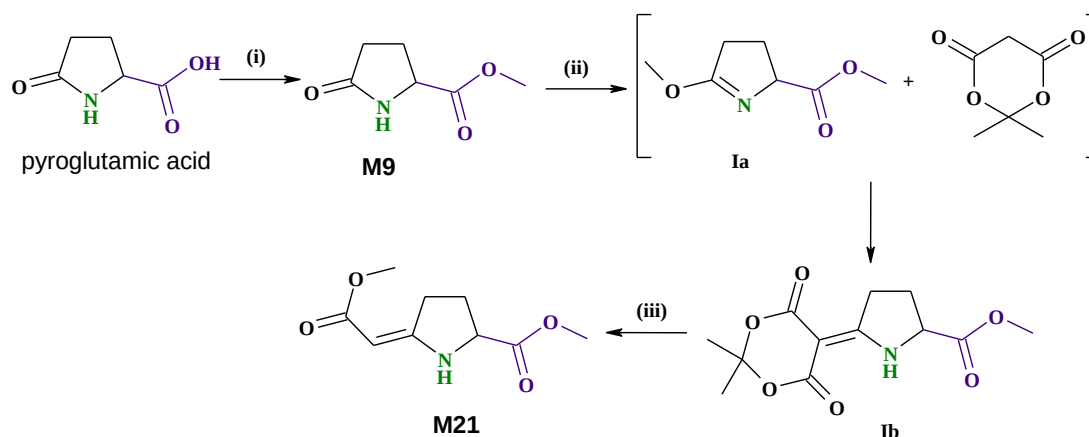
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.93 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.26 (s, 18H, 9CH₂), 1.30-1.41 (m, 4H, 2CH₂), 1.50-1.57 (m, 2H, CH₂), 2.00-2.08 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.28-2.39 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.52-2.60 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.68-2.78 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 3.24-3.34 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 4.12-4.22 (m, 2H, OCH₂), 4.79 (dd, *J* = 9.8, 2.7 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 8.28 (br s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7 (CH_3), 14.0 (CH_3), 20.0 (CH_2), 21.3 (CH_2), 22.6 (CH_2), 25.7 (CH_2), 28.4 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.6 (2CH_2), 31.6 (CH_2), 31.8 (CH_2), 31.9 (CH_2), 39.6 (CH_2), 58.1 (CH), 65.7 (CH_2), 152.1 (C), 171.5 (C), 176.3 (C).

Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$ (396.58 g/mol): C, 66.63; H, 10.17; N, 7.06%. Found: C, 66.98; H, 10.30; N, 7.32%. **LogP**: 5.14 ± 0.62 .

5-Methoxycarbonylmethylene-pyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester (**M21**)

The synthesis of **M21** is presented in Scheme 9 and was realized starting from the pyroglutamic acid and was described previously by our team.³

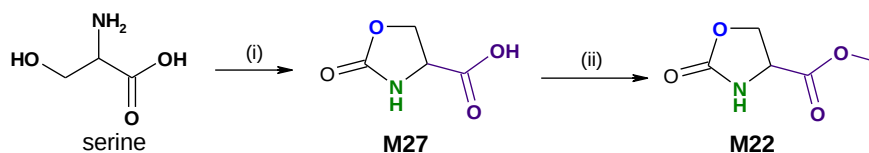


Scheme 9. Reagents and conditions: (i) MeOH , CHCl_3 , $3\text{\AA}$ molecular sieves, ZrCl_4 , reflux, 48h; (ii) (a) $(\text{MeO})_2\text{SO}_2$, 60°C , 12h (b) TEA , rt, 5h; (iii) (a) MeONa , MeOH , reflux, 24h (b) HCl , rt.³

Methyl 2-oxo-1,3-oxazolidine-4-carboxylate (**M22**) and

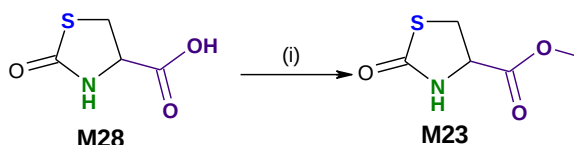
2-Oxo-1,3-oxazolidine-4-carboxylic acid (**M27**)

The synthesis of **M22** was realized following a two-steps procedure, described in Scheme 10. The first step was the synthesis of 2-oxo-1,3-oxazolidine-4-carboxylic acid **M27** starting from commercially available serine by using the classical conditions described in the literature.⁴ Carboxylic acid **M22** was then esterified in a mixture of methanol and chloroform at reflux in presence of thionyl chloride and catalytic amount of DMF. Final product **M22** was obtained as pure compound with the same physico-chemical properties as described in the literature.⁵



Scheme 10. Reagents and conditions: (i) phenyl chloroformate, NaOH, toluene/H₂O; (ii) thionyl chloride, DMF, MeOH/CHCl₃, reflux.

Methyl 2-oxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylate (M23)



Scheme 11. Reagents and conditions: (i) thionyl chloride, DMF, MeOH/CHCl₃, reflux, 51%.

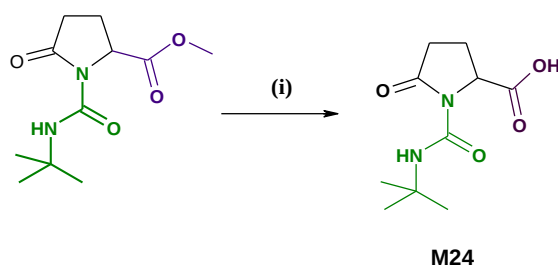
2-Oxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid (**M28**) (1 equiv.) was added to a solution of thionyl chloride (1.4 equiv.) and treated with catalytic amount of *N,N'*-dimethylformamide (DMF, 100 μ L) in MeOH (50 mL) at 80 °C (Scheme 11). The mixture was heated during 24 h under nitrogen atmosphere, then concentrated *in vacuo*. Dichloromethane was added to the crude and extracted with water. The organic layers were dried on MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to provide the pure compound **M23** in 51% yield with the same physico-chemical properties as described in the literature.²

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3.61 (dd, *J* = 11.3, 4.9 Hz, 1H, SCH₂CH), 3.72 (dd, *J* = 11.3, 3.2 Hz, 1H, SCH₂CH), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 4.48 (dd, *J* = 8.3, 4.7 Hz, 1H, SCH₂CH), 6.88 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 31.8 (CH₂), 53.2 (CH₃), 56.1 (CH), 170.7 (C), 174.8 (C).

LogP: -0.65 $\pm$ 0.71.

1-tert-Butylcarbamoyl-5-oxo-pyrrolidine-2-carboxylic acid (M24)



Scheme 12. Reagents and conditions: (i) 1.2 equiv. NaOH, H₂O, reflux, 4h, 47%.

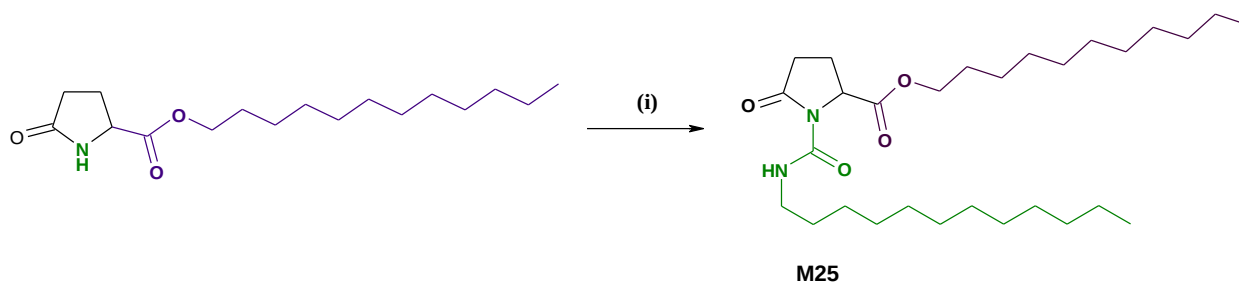
1-*tert*-Butylcarbamoyl-5-oxo-pyrrolidine-2-carboxylic acid methyl ester (1 equiv.) was stirred at reflux with a 2N aqueous solution of sodium hydroxide (1.2 equiv.) for 4 hours (Scheme 12). After complete solubilization and cooling the medium at rt, concentrated HCl was added till a white precipitate formed. The precipitate was washed with water and dried to provide pure carboxylic acid **M24** as a white solid in 47% yield; mp (H₂O) 110-113°C; *R_f* (EtOAc/*n*-heptane 1/1) = 0.56.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.36 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.16-2.34 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 2.51-2.60 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.70-2.81 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 4.78 (dd, *J* = 9.4, 2.7 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 8.38 (s, 1H, NH), 8.38 (br s, 1H, CO₂H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 20.7 (CH₂), 28.8 (3CH₃), 31.9 (CH₂), 51.3 (C), 57.9 (CH), 151.4 (C), 175.1 (C), 176.4 (C).

Anal. calcd for **C₁₀H₁₆N₂O₄** (228.25 g/mol): C, 52.62; H, 7.07; N, 12.27%. Found: C, 52.40; H, 7.33; N, 12.28%. **LogP**: -1.53 ± 0.62.

Dodecyl 1-[(dodecylamino)carbonyl]-5-oxoprolinate (M25).



Scheme 13. Reagents and conditions: (i) 1.0 eq. *n*-dodecyl isocyanate, toluene, reflux, 24h.

Dodecyl 5-oxoprolinate (3.0 g, 10 mmol, 1 equiv.) in toluene (20mL) was treated with *n*-dodecyl isocyanate (2.13 g, 10 mmol, 1 equiv.) and the mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 24 hours (Scheme 13). After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica pre-packed column (elution with *n*-heptane/ethyl acetate: 80/20 → *n*-heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M25** as a white solid in 75% yield, *R_f* (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.7;

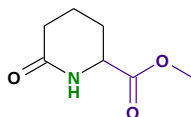
IR ν cm⁻¹: 3334, 2919, 1721, 1686, 1537, 1465, 1248, 1225, 721, 634, 597.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.88 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H, 2CH₂(CH₂)₉CH₂CH₃), 1.26 (s large, 36H, 2CH₂(CH₂)₉CH₂CH₃), 1.52-1.57 (m, 4H, 2CH₂(CH₂)₉CH₂CH₃), 2.01-2.07 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.28-2.39 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.52-2.60 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.69-2.78 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 3.22-3.31 (m, 2H, NHCH₂(CH₂)₉CH₂CH₃), 4.14-4.19 (m, 2H, OCH₂(CH₂)₉CH₂CH₃), 4.78 (dd, *J* = 9.2, 2.0 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 8.28 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 13.5 (2CH₃), 20.7 (CH₂), 22.1 (2CH₂), 25.2 (CH₂), 26.3 (CH₂), 27.9 (CH₂), 28.6 (CH₂), 28.7 (4CH₂), 28.9 (2CH₂), 29.0 (7CH₂), 31.3 (2CH₂), 39.4 (CH₂), 57.6 (CH), 65.2 (CH₂), 151.6 (C), 170.9 (C), 175.7 (C).

Anal. calcd for C₃₀H₅₆N₂O₄ (508.79 g/mol): C, 70.82; H, 11.09; N, 5.51%. Found: C, 71.11; H, 11.42; N, 5.82%. **LogP**: 9.39 ± 0.62.

Methyl 6-oxopiperidine-2-carboxylate (**M26**).



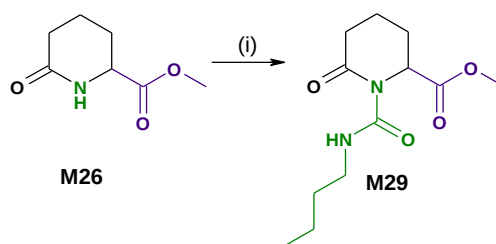
6-Oxopiperidine-2-carboxylic acid (1 equiv.) was added to a solution of thionyl chloride (1.4 equiv.) and treated with catalytical amount of *N,N*-dimethylformamide (DMF, 100 μL) in MeOH (50 mL) at 80 °C. The mixture was heated during 24 h under nitrogen atmosphere. The mixture was concentrated and dichloromethane was added. The organic layers were dried on MgSO₄ and concentrated in vacuum to provide the pure compound **M26** in 51 % yield with the same physico-chemical properties as described in the literature.⁶

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.74-1.95 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH), 2.30-2.47 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 4.10 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 6.23 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 19.5 (CH₂), 25.3 (CH₂), 31.0 (CH₂), 52.7 (CH₃), 54.7 (CH), 171.2 (C), 171.5 (C).

Molecular formula: C₇H₁₁NO₃ (157.17); **LogP**: -1.36 ± 0.28.

Methyl 1-[(butylamino)carbonyl]-6-oxopiperidine-2-carboxylate (**M29**).



Scheme 14. Reagents and conditions: (i) 1.2 equiv. $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{NCO}$, toluene, reflux, 24 h, inert atmosphere.

N -butyl isocyanate (1.89 g, 19.0 mmol, 1 equiv.) was added to methyl 6-oxopiperidine-2-carboxylate **M26** (3.0 g, 19.0 mmol, 1 equiv.) in toluene (20 mL) and the resulting mixture was heated at reflux under nitrogen atmosphere for 24 hours (Scheme 14). After cooling to room temperature, methanol (20 mL) was added. The residue was concentrated and separated by flash chromatography on silica pre-packed column (elution with n -heptane/ethyl acetate: 80/20 $\rightarrow$ n -heptane/ethyl acetate: 0/100) to generate pure product **M29** as a yellow oil in 44 % yield.

IR ν cm^{-1} : 3280, 1745, 1700, 1655, 1525, 1390, 1202, 1091, 581.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.92 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.31-1.41 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.48-1.57 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.65-1.83 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.92-2.02 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.20-2.29 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.45-2.56 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.58-2.67 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 3.21-3.35 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 5.10 (dd, $J = 6.0, 3.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 9.33 (br s, 1H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 13.7 (CH_3), 17.6 (CH_2), 20.0 (CH_2), 25.4 (CH_2), 31.4 (CH_2), 33.7 (CH_2), 40.2 (CH_2), 52.5 (CH_3), 55.8 (CH), 154.6 (C), 172.0 (C), 174.1 (C).

Anal. calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ (256.30 g/mol): C, 56.24; H, 7.87; N, 10.93 %. Found: C, 56.28; H, 7.99; N, 11.32%. **LogP**: -0.14 ± 0.62 .

References

1. Cauliez, P.; Fasseur, D.; Couturier, D.; Bigo, B.; Kolocouris, A. *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, 33, 1233.

2. Rigo, B.; Erb, B.; Ghammarti, S. E.; Gautret, P.; Couturier, D. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 1599.
3. Fasseur, D.; Rigo, B.; Leduc, C.; Cauliez, P.; Defretin, S. *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 829.
4. Seki, M.; Hatsuda, M.; Mori, Y.; Yoshida, S.; Yamada, S.; Shimizu, T. *Chem. Eur. J.*, **2004**, *10*, 6102.
5. Xue, F.; Seto, C. T. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1936.
6. Kumar, K.S.A.; Misra, A.; Siddiqi, T.I.; Srivastava, S.; Jain, M.; Bhatta, R.S.; Barthwal, M.; Dikshit, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *81*, 456.

Annexe 3. Supporting Information de l'article 3

General procedure for the synthesis of bistrimethylsilylpyroglutamate derivatives (compounds 9-10). A stirred mixture of 1 eq. of pyroglutamic acid (**2**) or 2-oxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid (**8**), hexamethyldisilazane, HMDS (2 eq.), and saccharine cat. (1,1-dioxo-1,2-benzothiazol-3-one) (0.02 eq.) was heated at 120 °C under nitrogen atmosphere for 2 up to 6 hours. The excess of HMDS was then evaporated from medium, and dichloromethane (30 mL) was added, providing crude compound **9** or **10** in 99% yield.

Bistrimethylsilylpyroglutamate (9). The general procedure was followed using pyroglutamic acid **2** (12.9 g, 100 mmol), saccharine (0.21 g, 1.9 mmol) and HMDS (32.24 g, 200 mmol) was heated at 120°C under nitrogen atmosphere for 2 hours. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.23 (s, 9H, 3CH₃), 0.27 (s, 9H, 3CH₃), 2.04-2.12 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.21-2.28 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.30-2.41 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 4.11 (dd, *J* = 6.7, 2.3 Hz, 1H, CH₂CH₂CH).

Bistrimethylsilyl-2-oxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylate (10). The general procedure was followed using *L*-2-thiazolidinone-4-carboxylic acid **8** (5 g, 34.0 mmol), 1,1-dioxo-1,2-benzothiazol-3-one (saccharine) (0.18 g, 1.7 mmol) and HMDS (10.96 g, 68.0 mmol) was heated at 120 °C under nitrogen atmosphere for 6 hours. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.30 (s, 9H, 3CH₃), 0.32 (s, 9H, 3CH₃), 3.53 (dd, *J* = 11.3, 1.6 Hz, 1H, SCH₂CH), 3.71 (dd, *J* = 11.3, 2.6 Hz, 1H, SCH₂CH), 4.30 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, SCH₂CH).

General procedure for the synthesis of 2-acetoxybenzoyl chloride (12). Compound **11** (1 eq.) was added to a solution of thionyl chloride (1.4 eq.) and treated with catalytic amount of *N,N'*-dimethylformamide (DMF, 100 μL). The mixture was refluxed for 3 h, then excess of thionyl chloride was removed under high vacuum. Upon cooling to rt, the residue was dissolved in dry dichloromethane CH₂Cl₂ (DCM) (25 mL) to give acid chloride **12**, which was used without further purification in the next step with the same physico-chemical references as described previously.¹

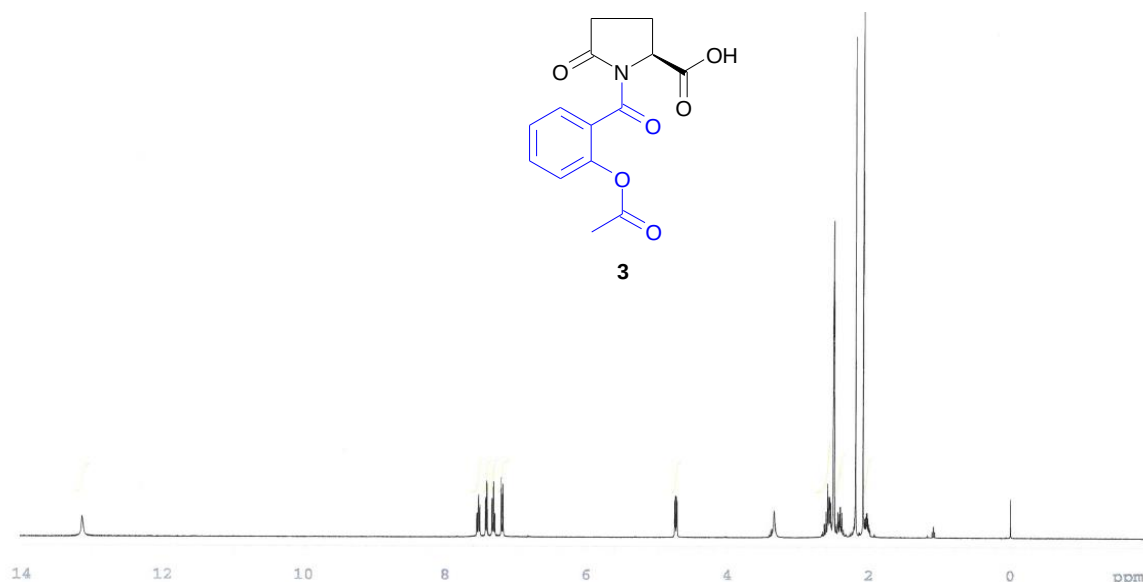
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 2.34 (s, 3H, CH₃), 7.16 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, CH, ArH), 7.41 (td, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, CH, ArH), 7.67 (td, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1H, CH, ArH), 8.22 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, CH, ArH).

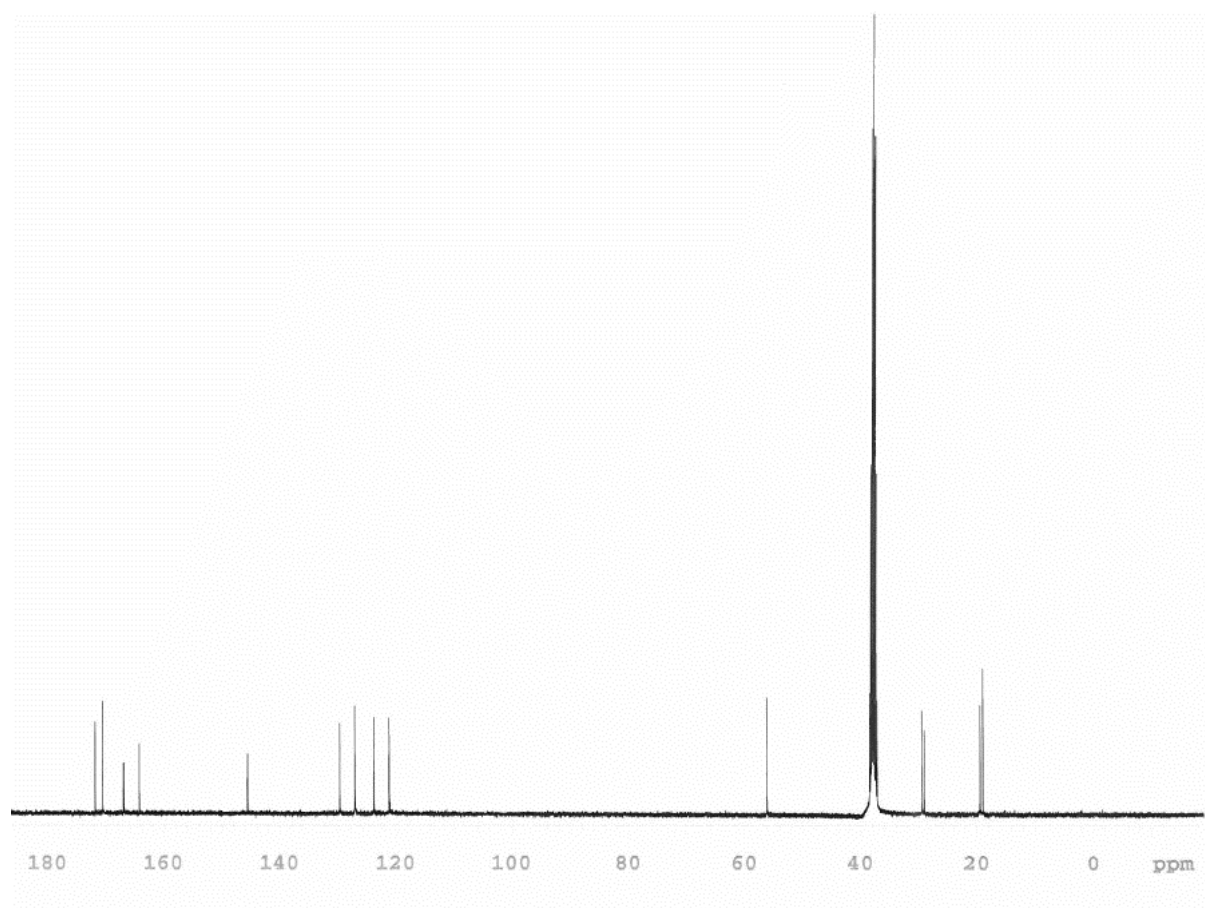
General procedure for the synthesis of compounds (3), (4) and (5). A stirred mixture of compounds (**9** or **10**) and 2-acetoxybenzoyl chloride (**12**) in refluxing DCM (30 mL) under nitrogen atmosphere for 24 up to 48 hours. Then solvolysis of the silyl ester was easily realized by stirring in methanol. The residue was partitioned between water and ethyl acetate. The

organic layer was dried over anhydrous MgSO_4 and then filtered and concentrated in vacuo. The crude was separated by flash liquid chromatography on silica gel prepacked columns, to generate pure products (3-5).

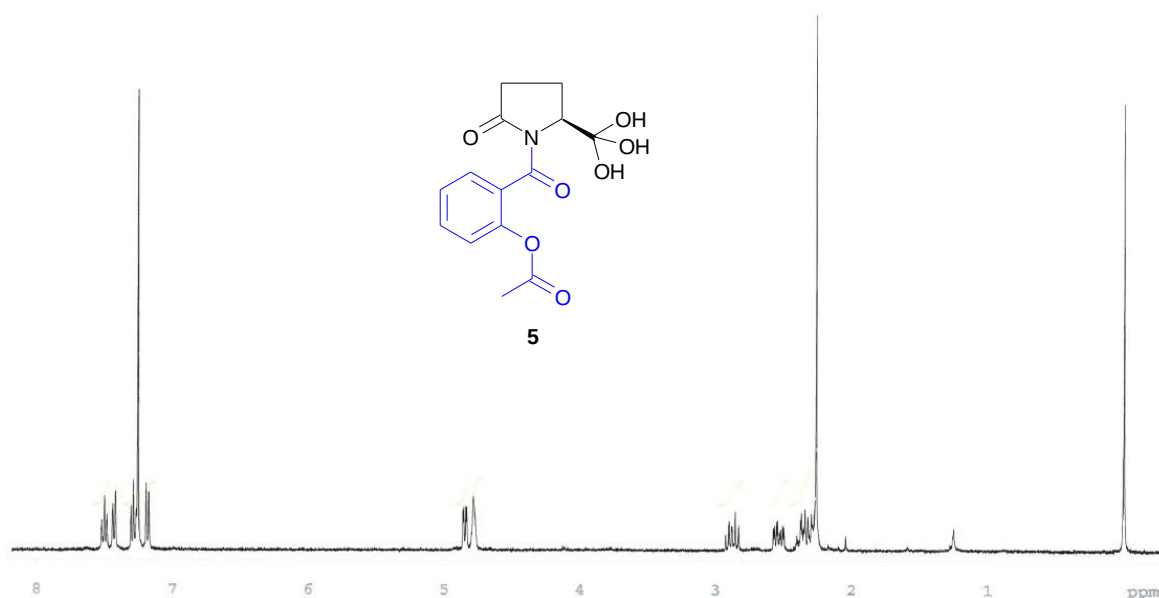
1-[2-(Acetyloxy)benzoyl]-5-carboxypyrrolidone (3). The general procedure was followed using compound **9** (12.5 g, 4.57 mmol), 2-acetoxybenzoyl chloride **12** (9.08 g, 4.57 mmol), in refluxing DCM (30 mL). The crude was purified by flash liquid chromatography on silica gel prepacked columns, eluting EtOAc/*n*-heptane 5:5 to generate pure product **3** as a white solid in 50% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 145-147°C, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.73; IR ν cm^{-1} : 3279, 1750, 1731, 1682, 1608, 1453, 1323, 1205, 1152, 1025, 736, 503. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 1.97-2.08 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.18 (s, 3H, CH_3), 2.36-2.44 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.52-2.61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 4.72 (dd, $J = 9.3, 4.0$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 7.18 (dd, $J = 8.2, 0.8$ Hz, 1H, CH, ArH), 7.30 (dt, $J = 7.4, 1.2$ Hz, 1H, CH, ArH), 7.40 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H, CH, ArH), 7.52 (dt, $J = 7.8, 1.9$ Hz, 1H, CH, ArH), 13.13 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm: 21.1 (CH_3), 21.6 (CH_2), 31.6 (CH_2), 58.3 (CH), 123.3 (CH), 125.9 (CH), 129.2 (C), 129.2 (CH), 131.9 (CH), 166.4 (C), 169.1 (C), 172.7 (C), 174.0 (C).

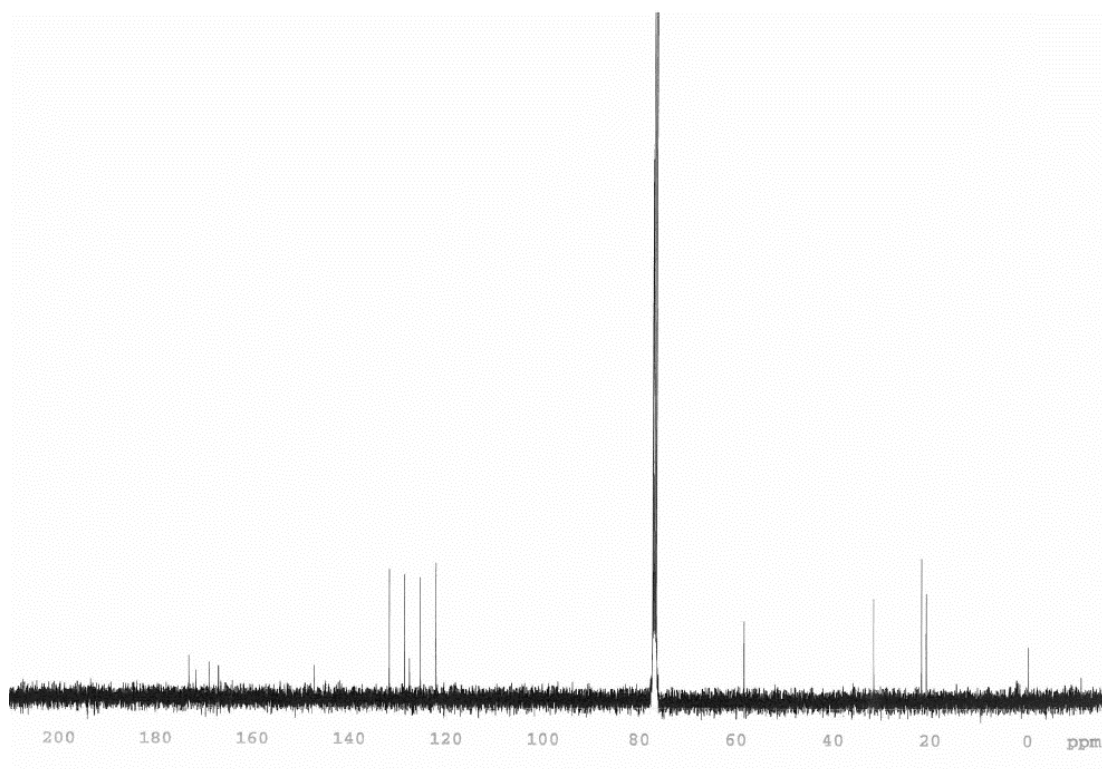
Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_6$ (291.26 g/mol): C, 57.73; H, 4.50; N, 4.81%. Found: C, 57.36; H, 4.30; N, 11.26%. Predicted LogP: -1.68 ± 0.65 .



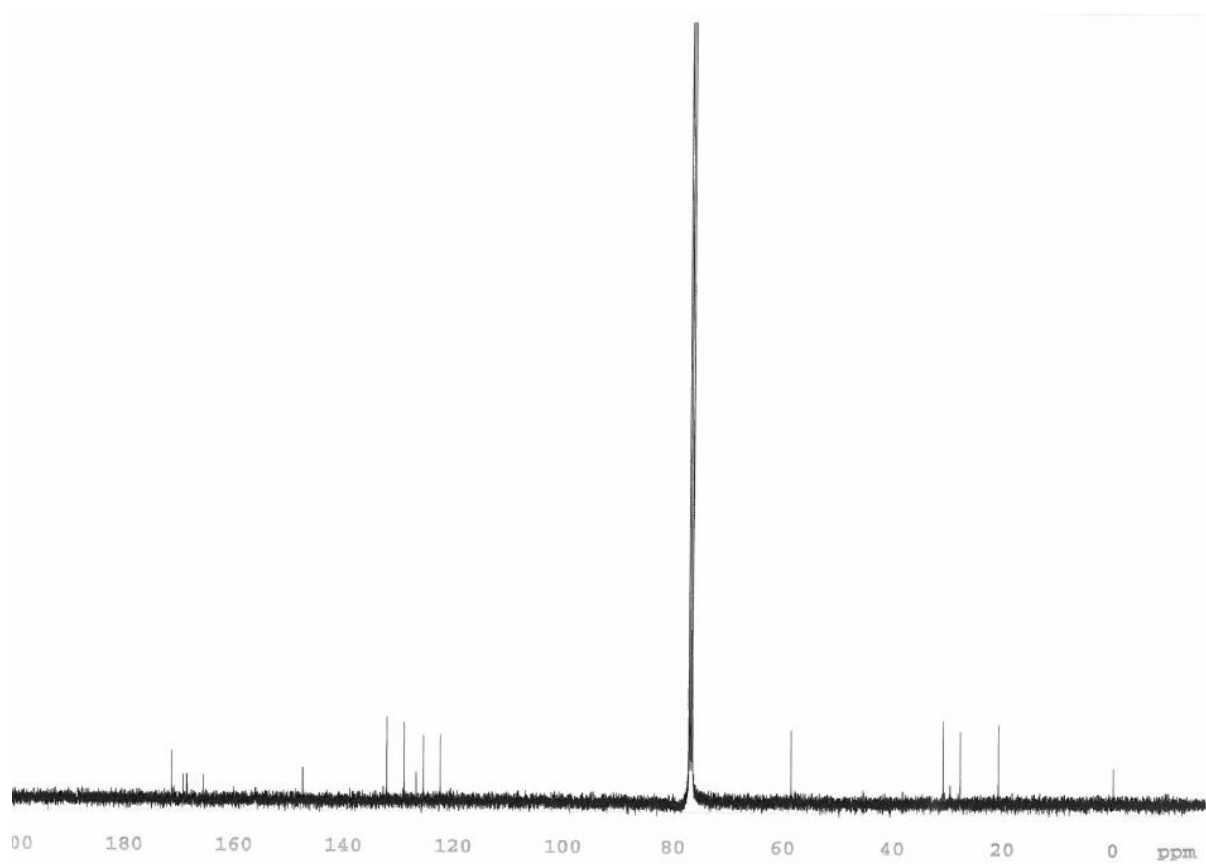
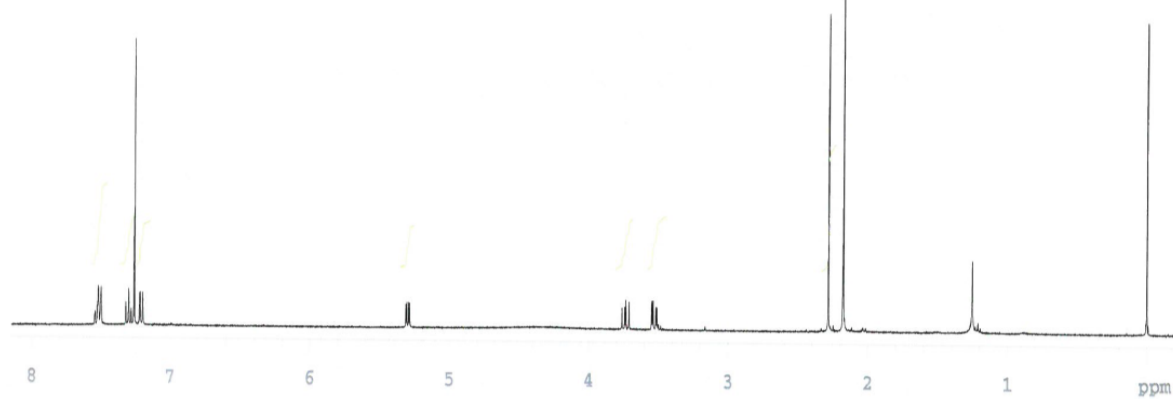
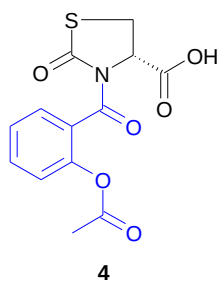


2-[[2-Oxo-5-(trihydroxymethyl)pyrrolidin-1-yl]carbonyl]phenyl acetate (5). By-product from the synthesis of compound **3**; white solid isolated in 10% yield; mp (EtOAc/*n*-heptane) 163-166°C, R_f (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.82; IR ν cm^{-1} : 3434, 3285, 3218, 1736, 1697, 1667, 1451, 1318, 1188, 1016, 912, 624, 501. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.27 (s, 3H, CH_3), 2.27-2.41 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.49-2.60 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.82-2.95 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 4.76 (br s, 2H, 2OH), 4.85 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 7.19 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CH, ArH), 7.30 (d, J = 7.6 Hz, 1H, CH, ArH), 7.44 (d, J = 7.8 Hz, 1H, CH, ArH), 7.51 (t, J = 8.2 Hz, 1H, CH, ArH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 21.0 (CH_3), 22.0 (CH_2), 31.8 (CH_2), 58.6 (CH), 122.4 (CH), 125.6 (CH), 127.9 (C), 128.9 (CH), 132.0 (CH), 147.5 (C), 167.3 (C), 169.2 (C), 171.9 (C), 173.4 (C). Anal. calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_7$ (309.28 g/mol): C, 54.37; H, 4.89; N, 4.53%. Found: C, 54.17; H, 4.62; N, 4.92%. Predicted LogP: -2.13 ± 0.68 .



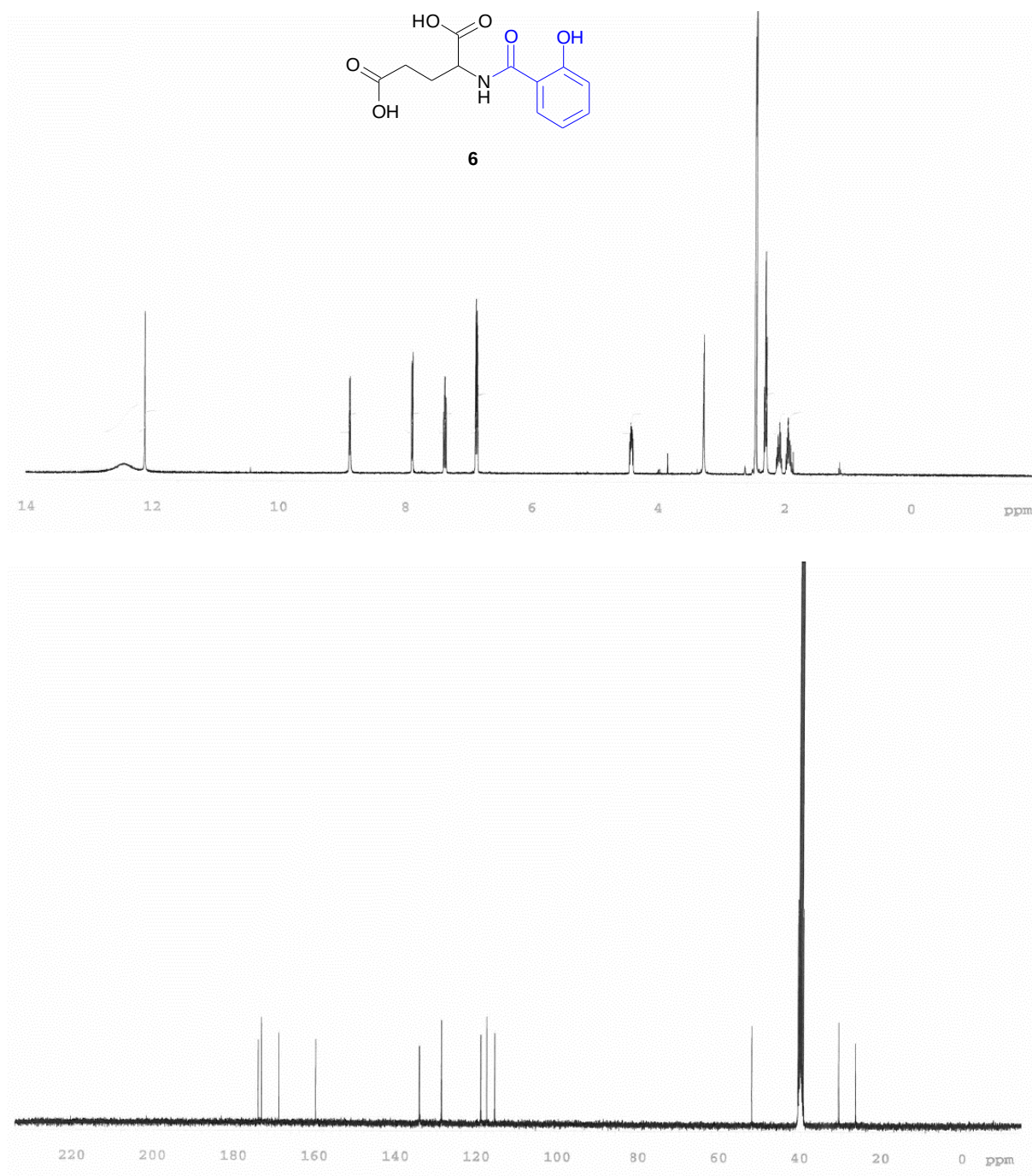


3-[2-(Acetyloxy)benzoyl]-2-oxo-1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid (4). The general procedure was followed using compound **10** (4.5 g, 15.4 mmol), 2-acetoxybenzoyl chloride **12** (3.06 g, 15.4 mmol) in DCM (30 mL). The crude residue was purified by flash liquid chromatography on silica gel prepacked columns, eluting EtOAc/*n*-heptane 5:5 to generate pure product **4** as a white solid in 44 % yield; mp 153-155 °C; IR ν cm^{-1} : 3350, 1738, 1686, 1610, 1453, 1316, 1141, 858, 643. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2.18 (s, 3H, CH_3), 3.53 (dd, J = 11.6, 3.1 Hz, 1H, SCH_2CH), 3.74 (dd, J = 11.7, 8.5 Hz, 1H, SCH_2CH), 4.30 (s, 1H, OH), 5.30 (dd, J = 8.3, 2.8 Hz, 1H, SCH_2CH), 7.21 (d, J = 8.3 Hz, 1H, CH, ArH), 7.30 (t, J = 7.5 Hz, 1H, CH, ArH), 7.49-7.55 (m, 2H, 2CH, ArH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 20.3 (CH_3), 27.9 (CH_2), 31.0 (CH_2), 58.7 (CH), 122.6 (CH), 125.7 (CH), 127.1 (C), 129.2 (CH), 132.4 (CH), 147.7 (C), 165.9 (C), 168.9 (C), 169.6 (C), 171.7 (C). Anal. calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_6\text{S}$ (309.30 g/mol): C, 50.48; H, 3.58; N, 4.53. Found: C, 50.71; H, 3.30; N, 4.80%. Predicted LogP: -0.83 $\pm$ 0.78.



Procedure for the synthesis of compound 6. A stirred mixture of 1 eq. of compound (3) and 3 eq. of sodium methoxide, 30% solution in methanol was heated at 80°C under nitrogen atmosphere for 24 hours. The solution was washed with water and the aqueous residue was acidified with HCl until pH 4-5. The solution was extracted with ethyl acetate (100 mL), and the combined organic phases were washed with brine, dried on anhydrous MgSO₄, and then concentrated *in vacuo* to give compound 6.

N-[2-(Acetyloxy)benzoyl]glutamic acid (6). The procedure was followed using 1-[2-(acetyloxy)benzoyl]-5-carboxypyrrolidone (3) (1 g, 3.43 mmol, 1 eq.) and sodium methoxide, 30% solution in methanol (0.55 g, 10.2 mmol, 3 eq.) heated at 80 °C under nitrogen atmosphere for 24 hours. The solution was washed with water and the aqueous residue was acidified with HCl until pH 4-5. The solution was extracted with ethyl acetate (100 mL), and the combined organic phases were washed with brine, dried on anhydrous MgSO₄, and then concentrated *in vacuo* to give compound 6 as a beige solid in 80% yield; mp 162-164°C, *R_f* (EtOAc/*n*-heptane 50/50) = 0.67; IR ν cm⁻¹: 3410, 3047, 2763, 1722, 1650, 1593, 1446, 1373, 1251, 1180, 757, 528. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.87-1.99 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.05-2.15 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 2.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH), 4.42 (dd, *J* = 7.6, 4.8 Hz, 1H, CH₂CH₂CH), 6.82-6.90 (m, 2H, 2CH, ArH), 7.37 (dt, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H, CH, ArH), 7.89 (dd, *J* = 8.3, 1.7 Hz, 1H, CH, ArH), 8.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 12.12 (s, 1H, OH), 12.46 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 26.4 (CH₂), 30.6 (CH₂), 52.1 (CH), 115.7 (C), 117.7 (2CH), 119.2 (C), 128.9 (CH), 134.3 (CH), 159.9 (C), 169.1 (C), 173.4 (C), 174.2 (C). Anal. calcd for C₁₄H₁₅NO₇ (309.28 g/mol): C, 54.37; H, 4.89; N, 4.53%. Found: C, 54.70; H, 4.98; N, 4.88%. Calculated **LogP**: -0.95 ± 0.56.



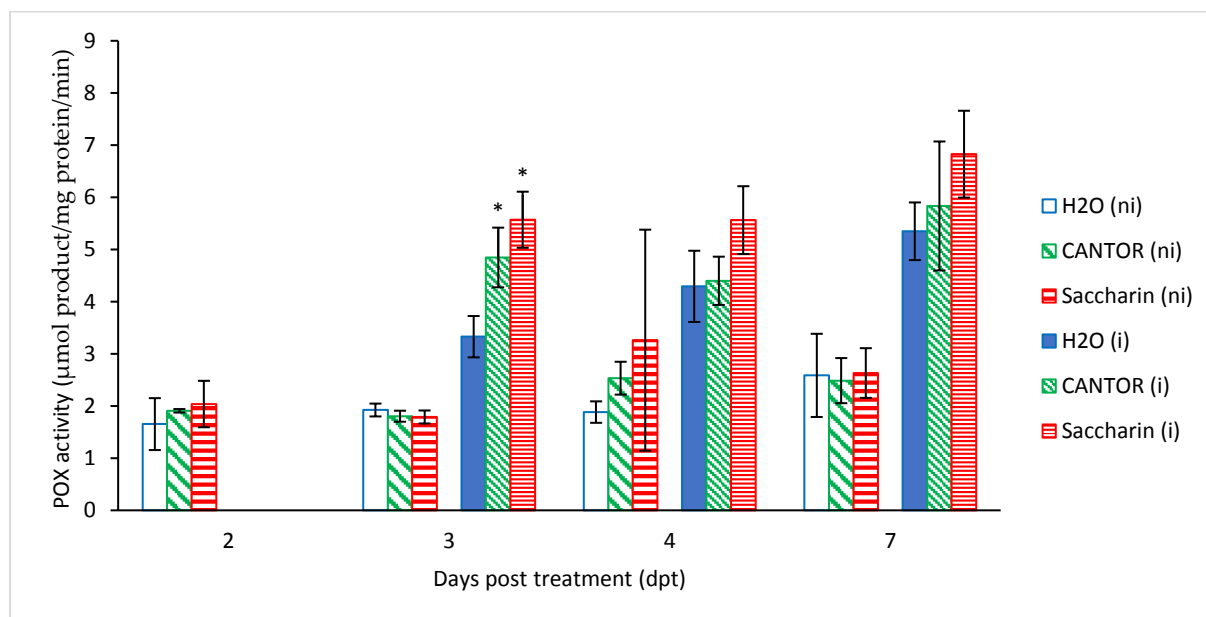
1-[2-(Acetyloxy)benzoyl]-L-proline (7). A mixture of *L*-proline **16** (5 g, 43.4 mmol, 1 eq.), 1,1-dioxo-1,2-benzothiazol-3-one (saccharine) (0.24 g, 2.22 mmol, 0.05 eq.) and HMDS (14.02 g, 86.8 mmol, 2 eq.) was heated at 120 °C under nitrogen atmosphere for 2 hours. The HMDS excess was evaporated from the above solution, and dichloromethane CH₂Cl₂ (20 mL) was added, giving compound **17** in a 95% crude yield. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.36 (s, 9H, 3CH₃), 0.38 (s, 9H, 3CH₃), 1.82-1.93 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 1.93-2.01 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 2.15-2.24 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 3.09-3.20 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 3.35-3.49 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH), 4.01 (dd, *J* = 8.6, 5.4 Hz, 1H, CH₂CH₂CH₂CH).

To the resulting medium, was added acetylsalicylic acid chloride (**12**) (1.2 eq.). The mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 120°C for 24 h. The residue was partitioned between water and ethyl acetate. The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and then filtered and concentrated. The residue was separated by flash liquid chromatography on silica gel prepacked columns, eluting EtOAc/*n*-heptane 5:5 to generate pure product **7** as a yellow oil in 47% yield; IR ν cm⁻¹: 2980, 1737, 1594, 1436, 1370, 1186, 911, 731. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.82-1.93 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 1.93-2.01 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 2.15-2.24 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.28-2.37 (m, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 3.35-3.49 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH), 4.68 (dd, *J* = 8.4; 4.7 Hz, 1H, CH₂CH₂CH₂CH), 7.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.27 (dt, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, ArH), 7.37 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H, ArH), 7.44 (dt, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H, ArH), 9.70 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 20.9 (CH₃), 24.7 (CH₂), 29.1 (CH₂), 49.4 (CH₂), 58.8 (CH), 117.7 (CH), 125.3 (CH), 126.8 (CH), 129.9 (CH), 135.5 (C), 149.5 (C), 166.3 (C), 170.6 (C), 174.7 (C). Anal. calcd for C₁₄H₁₅NO₅ (277.28 g/mol): C, 60.65; H, 5.45; N, 5.05%. Found: C, 60.33; H, 5.37; N, 5.22%. Calculated **LogP**: -0.91 ± 0.29.

References

1. Huang, B.; Du, D.; Zhang, R.; Wu, X.; Xing, Z.; He, Y.; Huang, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 7330.

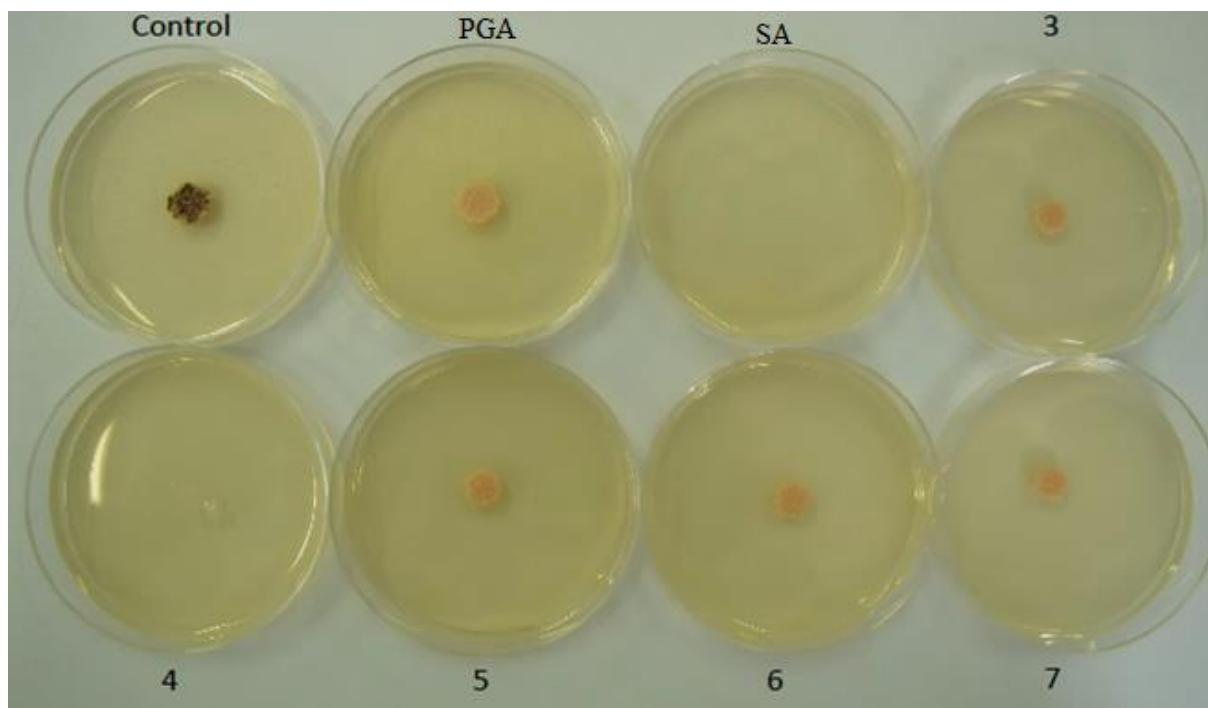
Annexe 4. Dosage de l'activité enzymatique de la peroxydase pour le traitement Saccharine



Activité enzymatique de la Peroxydase (POX) mesurée sur des plantes traitées ou non avec la saccharine ou l'adjuvant cantor® à 2, 3, 4 et 7 jours post traitement en condition inoculée ou non inoculée. Les résultats présentés sont la moyenne de deux répétitions indépendantes. L'activité POX a été mesurée selon le protocole Mitchell et al., (1994).

La saccharine ainsi que l'adjuvant entraînent l'augmentation de l'activité peroxydase principalement en condition inoculée aux différentes dates bien que cette augmentation n'a été significative qu'à J 3 post traitement correspondant à J 1 post inoculation.

Annexe 5. Test in vitro sur boîtes de Petri



Effet *in vitro* de l'acide pyroglutamique (PGA), l'acide salicylique (SA) ainsi que 5 molécules conjuguées à partir de SA et PGA sur le développement de *Z. tritici*

Annexe 6. Effet des deux adjuvants utilisés sur le développement de *Z. tritici* in vitro



Effet des deux adjuvants utilisés (Heliosol® et Cantor®) sur le développement de *Z. tritici* in vitro.

Valorisation des travaux de la thèse : articles publiés, communications orales et posters

Publications

2018. Salicylic acid and pyroglutamic acid conjugated derivatives confer protection of bread wheat against *Zymoseptoria tritici*. Mejri et al. (Soumis).

2018. Les lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* : méthode alternative pour lutter contre la septoriose du blé. Mejri et al. (Acte du colloque Phloeme).

2017. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. Mejri et al. (Environmental Science and Pollution Research, Juin 2017).

Communications

2018. 70th International Symposium on Crop Protection (Ghent, Belgium). S. Mejri, M. Magnin-Robert, A. Siah, A. Ghinet, B. Randoux, B. Tisserant, B. Rigo, Ph. Reignault and P. Halama. Saccharin induces resistance in wheat against *Zymoseptoria tritici*. (Poster).

2018. 1^{ères} Biennales de l'Innovation Céréalière (Paris, France). S. Mejri, A. Siah, F. Coutte, M. Magnin-Robert, B. Randoux, B. Tisserant, F. Krier, PH. Jacques, PH. Reignault, P. Halama. Les lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* : méthodes alternatives pour lutter contre la septoriose du blé. (Poster).

2017. Colloque en Environnement et Santé (Dunkerque, France). S. Mejri, A. Siah, F. Coutte, M. Magnin-Robert, B. Randoux, B. Tisserant, F. Krier, PH. Jacques, PH. Reignault, P. Halama. Les lipopeptides cycliques produits par *Bacillus subtilis* : des biofongicides prometteurs pour lutter contre la septoriose du blé. (Poster).

2016. The American Phytopathological Society. APS Annual Meeting (Florida, USA). S. Mejri, A. Siah, A. Ghinet, B. Rigo, C. Abuhaie, M. Magnin-Robert, B. Randoux, Ph. Reignault and P. Halama. Sugar beet-derived products as inducers of bread wheat defenses against *Zymoseptoria tritici*. (Poster).

2016. 68th International Symposium on Crop Protection (Ghent, Belgium). S. Mejri, A. Siah, A. Ghinet, B. Rigo, C. Abuhaie, M. Magnin-Robert, B. Randoux, Ph. Reignault and P. Halama. Sugar beet-derived products as inducers of bread wheat defenses against *Zymoseptoria tritici*. (Communication orale).

2016. 9th International Symposium on Septoria Diseases of Cereals (Paris, France). S. Mejri, A. Siah, F. Coutte, M. Magnin-Robert, B. Randoux, B. Tisserant, F. Krier, PH. Jacques, PH. Reignault, P. Halama. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* protect wheat against *Zymoseptoria tritici*. (Poster).

2016. Journées Jeunes Chercheurs Condorcet J2C2 (Reims, France). S. Mejri, A. Siah, A. Ghinet, B. Rigo, C. Abuhaie, M. Magnin-Robert, B. Randoux, Ph. Reignault and P. Halama. Efficacité et modes d'action de stimulateurs de défense des plantes sur le pathosystème blé-septoriose. (Communication orale).

Et aussi ...

Distinction

2016. Deuxième prix du meilleur poster aux Doctoriales Hauts de France.

Expérience pédagogique

2018. Participation à l'animation de l'atelier de formation doctorale « Améliorer ses chances d'être publié »