



HAL
open science

**Criblage de molécules et de champignons pour le
biocontrôle de l'oïdium du blé: sélection d'un
chito-oligosaccharide et d'un champignon mycorhizien à
arbruscules, application combinée et mécanismes de
défense induits**

Nour El Houda Raouani

► **To cite this version:**

Nour El Houda Raouani. Criblage de molécules et de champignons pour le biocontrôle de l'oïdium du blé: sélection d'un chito-oligosaccharide et d'un champignon mycorhizien à arbruscules, application combinée et mécanismes de défense induits. *Biologie végétale*. Université du Littoral Côte d'Opale, 2021. Français. NNT: 2021DUNK0586 . tel-03916738

HAL Id: tel-03916738

<https://theses.hal.science/tel-03916738>

Submitted on 31 Dec 2022

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

École Doctorale Sciences, Technologie, Santé

Discipline : Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, physiologie

Criblage de molécules et de champignons pour le biocontrôle de l'oïdium du blé : sélection d'un chito-oligosaccharide et d'un champignon mycorhizien à arbuscules, application combinée et mécanismes de défense induits

Par

RAOUANI Nour El Houda

Soutenue le 30 mars 2021 devant le jury :

Pr. AZIZ A. , Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Rapporteur- président du jury
Pr. CHONG J. , Université de Haute-Alsace, France	Rapporteur
MCF SELIM S. , Institut Polytechnique UniLaSalle, France	Examineur
VICRE M. , MCF - HDR, France	Examinatrice
LOUNES-HADJ SAHRAOUI A. , Pr., ULCO, France	Directrice de thèse
REIGNAULT PH. , Pr., ANSES, France	Co-directeur de thèse
RANDOUX B. , MCF, ULCO, France	Invitée

*Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEiV), Calais
50, rue Ferdinand Buisson, C.S. 80699 - 62228 Calais cedex*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Aziz Aziz, Professeur à l'Université de Reims, ainsi que Madame Julie Chong, Professeur à l'Université de Haute-Alsace, d'avoir accepté de relire ma thèse et d'en être les rapporteurs. Mes sincères remerciements s'adressent également à Monsieur Sameh Selim, Maître de conférences-HDR à l'institut Polytechnique UniLaSalle, d'avoir endossé le rôle d'examinateur. Je remercie également Madame Maïté Vicré, Maître de conférences-HDR à l'Université de Rouen, qui après avoir pris le temps d'assister à mon comité de suivi de thèse, a accepté de participer à mon jury de thèse en qualité d'examinatrice.

J'adresse mes remerciements également à Madame Anissa Lounès-Hadj Sahraoui, Professeur à l'ULCO, responsable de l'équipe Interactions Plantes-Champignons (IPCR) à l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le vivant (UCEIV) et directrice de ce projet de thèse ainsi qu'à Monsieur Philippe Reignault, Professeur et directeur du laboratoire de santé des végétaux à l'ANSES et co-directeur de cette thèse. Je vous remercie de m'avoir guidée et encadrée tout le long de cette thèse, pour la qualité de votre encadrement, pour votre rigueur et surtout pour votre disponibilité.

Merci Anissa de m'avoir accompagnée jusqu'au bout, Merci pour votre bienveillance... et vos messages quotidiens tout le long du confinement !

Mes remerciements vont aussi à Maryline Magnin Robert, Béatrice Randoux et Joël Fontaine, pour tout le temps que vous m'avez accordé, votre écoute, vos remarques pertinentes et corrections. Merci pour votre oreille attentive, Béatrice et Maryline, Merci pour vos encouragements et votre gentillesse qui me donnent le baume au cœur à chaque fois où je n'allais pas bien.

Dominique, un grand merci de m'avoir accueillie au sein de l'UCEIV, pour votre gentillesse et votre attention.

Enfin, j'adresse mes remerciements à toute l'équipe UCEIV pour tous les moments partagés, les dîners de Noël, les restaurants... (Oui c'était ainsi la vie avant le Covid-19). Merci d'être ma deuxième famille tout simplement ! Merci à Corinne, Benoit, Natacha et Frédérique...

Mention spéciale à Benoit et Natacha pour l'aide technique et parfois 'psychologique' que vous m'avez apportée ! Merci Benoit alias Homer Simpson, pour tous les fous rires –au-quo-ti-dien- et pour ta délicatesse 'surdimensionnée', pour tes prises de tête et nos querelles !

Merci à tous ceux qui ont croisé mon chemin à Calais, Merci à mes camarades avec qui j'ai pris énormément plaisir à travailler : Yuko, Aline, Pamela, Morgane, Elodie, Abder, Samara, Sonia, Maroua, Amandine, Julien, Arnaud, Robin et Sarah ! Et puis merci Thierry et Alice pour votre aide précieuse en biologie moléculaire !

Mes remerciements s'adressent également à l'ULCO, cet établissement qui m'a accueilli depuis mon stage de Master 2 jusqu'à la concrétisation de ce travail...

Remerciements

Maman Najouta, Papa Hsouna, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les sacrifices et efforts que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon bien-être et mon instruction. C'est grâce à vos encouragements que j'ai pu continuer ce chemin, et tenir bon malgré la distance et la pandémie. J'espère avoir été à la hauteur et répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de Baha, Farah et moi.

A mon frère Baha et ma sœur Farah, je ne peux exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous deux. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. Je vous souhaite la réussite dans votre vie, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler. J'espère que vous réaliserez tous vos rêves ; Je vous aime que Dieu vous garde ...

A mon chéri Aymen, merci d'avoir donné un sens à ma vie. Merci pour ton amour, tes encouragements et surtout ton sens de sacrifice. Je te dédie ce travail qui est aussi le tien, en implorant Dieu le tout puissant de nous accorder une longue vie de bonheur, de prospérité et de réussite, en te souhaitant le brillant avenir que tu mérites et dont tu rêves. Je t'aime tout simplement...

Lala, Baba Othman, Baba Ismail, Ommi Zohra, je sais que, de tout là-haut, vous êtes fiers de votre petite fille, vous manquez à ma vie, à mes rires comme à mes pleurs...

Sommaire

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I	7
Synthèse bibliographique	7
I. Pathosystème Blé-Oïdium.....	9
1. Le blé.....	9
1.1. Historique et taxonomie	9
1.2. Cycle de développement.....	11
1.3. Importance économique	12
2. Maladies cryptogamiques aériennes du blé.....	14
2.1. Oïdium du blé.....	16
2.2. Cycle de développement de <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>	17
II. Mécanismes de défenses des plantes	19
1. Relations et interactions parasitaires	19
2. Mécanisme d'induction de la résistance chez les plantes	20
2.1. Reconnaissance du stimulus d'attaque et induction de la résistance basale : la PTI	21
2.2. Réponse de l'agent pathogène : l'ETS	22
2.3. Induction de la résistance spécifique : l'ETI	23
3. Résistance locale et résistance systémique.....	23
3.1. Résistance locale acquise.....	23
3.2. Résistance systémique acquise	24
4. Résistances suite à l'interaction plantes-microorganismes du sol.....	25
4.1. Résistance systémique induite: ISR.....	25
4.2. Résistance induite par les champignons mycorhiziens arbusculaires.....	27
5. Réponses cellulaires précoces dans la transduction du signal.....	35
5.1. Flux ioniques	35
5.2. Phosphorylation et déphosphorylation des protéines	36

Sommaire

5.3.	Accumulation des formes activées d'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS)	38
6.	Voies de signalisation intercellulaires	41
6.1.	L'acide salicylique (AS)	43
6.2.	L'acide jasmonique (AJ)	44
6.3.	L'éthylène.....	47
7.	Les réponses de défense tardives.....	50
7.1.	Renforcement de la paroi cellulaire.....	50
7.1. a	La callose	50
7.1. b	La lignification.....	51
7.1. c	Les protéines PR (Pathogenesis-Related).....	53
III.	Méthodes de lutte contre l'oïdium du blé	59
1.	Méthodes de lutte actuelles	59
1.1.	Lutte chimique.....	59
1.2.	Lutte génétique	62
1.3.	Lutte prophylactique.....	62
2.	Lutte alternative : les stimulateurs de défense des plantes (SDP).....	63
2.1.	Principe.....	63
3.	Stimulateurs de défense étudiés dans le cadre de cette thèse	64
3.1.	Chito-oligosaccharides (COS).....	64
3.2.	Rhamnolipides.....	67
3.3.	Lipopeptides	69
3.3. a	Les surfactines	71
3.3. b	Les fengycines	72
3.3. c	Les iturines	72
4.	Les Champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA).....	73
4.1.	Généralités.....	73
4.2.	Classification des champignons mycorhiziens arbusculaires	74
4.3.	Fonctionnement général de la symbiose mycorhizienne arbusculaire.....	74
4.4.	Bénéfices de la symbiose mycorhizienne arbusculaire.....	76

Sommaire

4.5. Bénéfices pour le CMA	77
4.6. Bénéfices pour la plante	79
4.6. a Nutrition hydrique	79
4.6. b Nutrition minérale.....	79
4.6. c Biofertilisation	80
4.6. d Protection contre les agents pathogènes	80
RESULTATS & DISCUSSIONS.....	83
Chapitre II	85
Criblage de molécules et d'inoculum fongiques efficaces contre l'oïdium du blé.....	85
1. Introduction	87
2. Matériels et méthodes.....	88
2.1. Matériels végétal, fongique et produits testés.....	88
2.1. a Molécules candidates.....	89
2.1. b Inoculum fongiques racinaires bénéfiques testés	91
2.2. Conditions de culture des plantules de blé	91
2.3. Traitement des plantules.....	92
2.3. a Application des molécules.....	92
2.3. b Applications des inoculum fongiques racinaires.....	92
2.4. Évaluation des taux de protection contre <i>B. graminis</i>	93
2.5. Détermination des taux de colonisation des racines	93
2.6. Evaluation de l'effet direct des molécules testées sur la germination des spores de <i>B. graminis in vitro</i>	95
2.7. Traitement des données	96
3. Résultats	97
3.1. Criblage des molécules.....	97
3.1. a Test de protection <i>in planta</i> par les molécules contre <i>B. graminis</i>	97
3.1. b Validation de l'effet des molécules sur plantules cultivées sur substrat artificiel.	
98	
3.2. Sélection des inoculum fongiques bénéfiques racinaires	100

Sommaire

3.2. a	Détermination des taux de mycorhization des racines de blé.....	100
3.3.	Test de protection contre l'oïdium du blé.....	101
3.4.	Effet direct des molécules sur la germination <i>in vitro</i> des spores de <i>B. graminis</i>	103
4.	Discussion	106
4.1.	Criblage des molécules.....	106
4.1. a	Les rhamnolipides.....	106
4.1. b	Le chito-oligosaccharide.....	109
4.1. c	Les lipopeptides	110
4.2.	Criblage des inoculums racinaires	111
5.	Conclusion.....	113

Chapitre III 115

Association d'un traitement à base d'un chito-oligosaccharide avec un champignon mycorhizien arbusculaire

pour lutter contre l'oïdium du blé

1.	Introduction	117
2.	Matériels et méthodes.....	118
2.1.	Matériels végétal, fongique et molécule testée.....	118
2.2.	Conditions de culture des plantules de blé	118
2.3.	Traitements des plantules de blé.....	119
2.4.	Infection des plantes par <i>B.graminis</i> et détermination des taux de protection.....	120
2.5.	Détermination des taux de mycorhization des racines.....	120
2.6.	Mesure des paramètres de croissance des plantules de blé.....	120
2.7.	Dosage des pigments photosynthétiques	121
2.8.	Dosage de l'activité enzymatique peroxydase.....	122
2.9.	Suivi de l'expression des gènes de défense chez le blé	124
2.9. a	Extraction des ARNs	124
2.9. b	RT-PCR et analyse de l'expression des gènes	125
2.10.	Analyse métabolomique	129
2.10. a	Extraction des métabolites et analyse par chromatographie et spectrométrie	

Sommaire

de masse	129
2.11. Traitement des données	130
3. Résultats	131
3.1. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur la protection du blé contre <i>B. graminis</i>	131
3.2. Mycorhization des racines de blé	132
3.3. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur la croissance du blé.....	133
3.4. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur les teneurs en pigments photosynthétiques des plantules de blé.....	135
3.5. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur l'expression des gènes marqueurs des défenses du blé.....	137
3.5. a En conditions non infectieuses	137
3.5. b En conditions infectieuses	139
3.6. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur l'activité enzymatique peroxydase.....	142
3.6. a En conditions non infectieuses	142
3.6. b En conditions infectieuses	142
3.7. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur le profil métabolomique du blé.....	144
4. Discussion	153
5. Conclusions	161
Conclusions générales & Perspectives.....	163
Références bibliographiques	173
Valorisation.....	212

Sommaire

Liste des abréviations

AAO : Enzyme aldéhyde oxydase

ABA : Acide abscissique

AAC : 1- aminocyclopropane-1-acide carboxylique

AJ : Acide jasmonique

AOC : Allène oxyde cyclase

AOS : Allène oxyde synthase

APX : Ascorbate peroxydase

AS : Acide salicylique (*salicylic acid*)

ASM: Acibenzolar-S-methyl

BA : Acide benzoïque

BABA : Acide β -amino-butyrique

Bgt : *B.graminis* , *Blumeria graminis* f.sp.*tritici*

BTH : Acibenzolar-S-methyl-benzothiadiazole

CAD : Cinnamyl Alcool Déshydrogénase

CalS : Callose Synthase

CaM : protéine kinases Ca^{2+} /calmoduline-dépendantes

CAT : Catalase

CBL : CNB-Like

CCoAOMT : Caffeoyl Coenzyme A 3- *O* -MethylTransferase)

CMA : Champignon mycorhizien à arbuscules

CNB : Calcineurine B

COMT : Caffeic Acid O-Methyl Transferase

Liste des abréviations

COS : Chito-oligosaccharides

ERF : Ethylene Responsive Factor

ET : Ethylène

ETI : Effector Triggered Immunity

F5H : Ferulate/ coniferaldehyde 5-Hydroxylase

FAO : Food and Agriculture Organization

GA : Acide gibbérellique

GPX : Glutathion peroxydase

GSL : Glucan Synthase-Like

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HO₂[·] : Radical perhydroxyle

HR : hypersensitive response

HRGPs : Glycoprotéines structurales riches en hydroxyproline

IC : Isochorismate synthase

IFT : indice de fréquence de traitement

INA: Acide 2,6-dichloro-isonicotinique

ISR : Résistance Systémique Induite

JAZ : Jasmonates du domaine ZIM

JMT : JA carboxyl MethylTransferase

LAR : Local Acquired Resistance

LOX : Lipoxygénase

LTP : Lipid Transfer Protein

MAMPs : Microbe-Associated Molecular Pattern

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

Liste des abréviations

MAPKKK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

MAPKKKK : MAPK kinases kinases kinases

MeJA: Methyl ester jasmonic acid

MeSA: Méthyl salicylate

MeSAG: Méthyl salicylate O- β -glucoside

MIR: Mycorrhizal Induced Resistance

mlo : Mildew resistance locus o

MTI: *MAMP-Triggered Immunity*

NADPH-oxydases: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxydase

$O_2^{\bullet -}$: anion superoxyde

OH^- : Anion hydroxyle

OPDA : Acide 12-oxophytodienoic

OXO : Oxalate oxydase

PAL: Phénylalanine ammonia-lyase

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern,

PCD: Programmed cell death

PGPF: Plant Growth-Promoting Fungi

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Phe: Phénylalanine

PMG : Poids de mille grains

POX : Peroxydase

PPO Polyphénol oxydase

PRR Pattern recognition receptor,

PR Pathogenesis-Related

Liste des abréviations

Psj: *Pseudomonas syringae* pv japonica

PTI: PAMP-Triggered Immunity,

QoI: Quinone outside Inhibitors

RBOHD : Respiratory burst oxydase homologue protein D

RO: Radical alkoxy

RO₂·: Radical peroxy

ROS: Reactive Oxygen Species

SAM: S-adénosyl Méthionine

SAR: Systemic Acquired Resistance (Résistance Systémique Acquise)

SDN : Stimulateur de défense naturelle

SDP : Stimulateurs de Défense des Plantes

SGE : Salicyloyl glucose ester

SOD : Superoxyde dismutase

tCA : Acide transcinnamique

TGP : tube germinatif primaire

UE : Union Européenne

VSP : Vegetative Storage Protein

Xtc : *Xanthomonas translucens* pv cerealis

·OH : Radical hydroxyle

13-HPOT : 13-Hydroperoxyde d'acide linoléique

Liste des figures

Figure 1 : Présentation des cinq projets de SMARTBIOCONTROL et de leurs principaux objectifs.....	6
Figure 2 : Représentation schématique de l'évolution historique des espèces de blé (Chantret <i>et al.</i> , 2005).....	10
Figure 3 : Echelle de Zadoks indiquant les stades de développement repères du blé.....	12
Figure 4 : Production céréalière de l'Union Européenne en 2018 (Passion Céréales, https://www.passioncereales.fr)	13
Figure 5 : Principaux pays de l'Union Européenne producteurs de blé	13
Figure 6 : Symptômes des principales maladies du blé.....	16
Figure 7 : Phase asexuée du cycle de développement de <i>B. graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	18
Figure 8 : Schéma du modèle « en zig-zag » illustrant l'évolution de l'immunité de la plante, l'agressivité et la virulence des agents pathogènes (Jones et Dangl, 2006).	21
Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans la résistance systémique acquise (SAR) induite par un agent pathogène et la résistance systémique induite (ISR) déclenchée par les microorganismes bénéfiques du sol (Modifié de Pieterse <i>et al.</i> (2014)).....	27
Figure 10 : Cascade d'activation des MAPK en réponse à un stimulus et réponse des cellules suite à l'activation des MAPK.....	37
Figure 11 : Les différents seuils et effets des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mittler, 2017).....	39
Figure 12 : Production et implication des espèces réactives de l'oxygène dans les mécanismes de défense des plantes (Torres <i>et al.</i> , 2006)	41
Figure 13 : Implication de différentes hormones dans la régulation positive ou négative de la résistance des plantes à divers agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes.	42
Figure 14 : Voies de la biosynthèse de l'AS (Maruri-López <i>et al.</i> , 2019)	44
Figure 15 : Voies de biosynthèse des jasmonates chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Ruan <i>et al.</i> , 2019).	45
Figure 16 : Voie de signalisation de l'AJ suite à l'attaque par un agent pathogène (Pieterse <i>et al.</i> , 2012)	47
Figure 17 : Voie biosynthétique et régulation de l'éthylène (Wang <i>et al.</i> , 2002).....	48
Figure 18 : Modèle de signalisation de l'éthylène chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Binder, 2020).	49

Liste des figures

Figure 19 : Voie de biosynthèse de la lignine (Gallego - Giraldo <i>et al.</i> , 2018).....	53
Figure 20 : Structures chimiques de la chitine du chitosan et du COS. (Phil <i>et al.</i> , 2018)	65
Figure 21 : Structure chimique des principaux rhamnolipides produits par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (RLs) (Tan et Li., 2018).	68
Figure 22 : Structures représentatives des trois principales familles de lipopeptides cycliques : les surfactines, les fengycines et les iturines (d'après Ongena et Jacques (2008))	71
Figure 23 : Cycle de vie d'un champignon mycorhizien à arbuscules (Choi <i>et al.</i> , 2018)	76
Figure 24 : Transfert du carbone sous forme de sucres et de lipides au niveau de l'interface biotrophique de la plante hôte et le champignon arbusculaire mycorhizien (Wipf <i>et al.</i> , 2019).	78
Figure 25 : Structures chimiques des molécules testées.....	90
Figure 26 : Evaluation des différentes structures mycorhiziennes.....	94
Figure 27 : Différentes catégories de germination des spores de <i>B. graminis in vitro</i>	96
Figure 28 : Nombre de colonies de <i>B. graminis</i> et taux de protection observés sur la 3 ^{ème} feuille de blé du cultivar Pakito, selon le produit testé à 100µM.	97
Figure 29 : Nombre de colonies de <i>B. graminis</i> sur la 3 ^{ème} feuille de blé du cv. Pakito traité par les cyclodextrines (RAMEB, α-CD, β-CD, δ-CD) à 100µM.	98
Figure 30 : Nombre de colonies de <i>B. graminis</i> et taux de protection obtenus sur la 3 ^{ème} feuille des plantules de blé du cultivar Alixan âgées de 3 et 6 semaines traitées par les rhamnolipides C12 et le BioA 187 à 100µM.	99
Figure 31 : Racines de blé inoculées avec <i>Fm</i> montrant les différentes structures mycorhiziennes (Arbuscules, Vésicules et Hyphes).	101
Figure 32 : Pourcentages de germination <i>in vitro</i> des spores de <i>B. graminis</i> , sur de l'agar contenant du DMSO seul, ou contenant l'un des 3 rhamnolipides (Rh-Eth C12, Rh-Est C12, Rh-Succ C12) aux concentrations testées (50, 100, 200, 300 µM).....	104
Figure 33 : Pourcentages de la germination <i>in vitro</i> des spores de <i>B. graminis</i> sur de l'agar contenant du DMSO seul, ou contenant le BioA 187 aux concentrations testées : 50, 100, 200, 300 µM.	104
Figure 34 : Pourcentages de germination <i>in vitro</i> des spores de <i>B. graminis</i> sur de l'agar contenant du DMSO (témoin) ou contenant les lipopeptides seuls ou en mélange aux concentrations testées : 50, 100, 200, 300 µM.	105
Figure 35 : Paramètres de croissance aérienne mesurés sur des plantules de blé. (Taille du maître brin (cm), F : Feuilles, T : Talles).	121

Liste des figures

Figure 36 : Schéma récapitulant la méthodologie des traitements selon les modalités (BioA 187, <i>Fm</i> et BioA+ <i>Fm</i>) et la cinétique de l'échantillonnage des 3 ^{èmes} feuilles de blé pour chaque analyse.....	123
Figure 37 : Nombre de colonies de <i>B. graminis</i> et taux de protection observés sur la 3 ^{ème} feuille des plantules de blé âgées de 8 semaines traitées par BioA 187 en jaune ; <i>Fm</i> en marron et par BioA 187+ <i>Fm</i> en bleu.	132
Figure 38 : Mesure des paramètres de croissance sur des plantules de blé âgées de 8 semaines en réponse aux traitements par BioA 187 en jaune ; <i>Fm</i> en marron et par BioA 187+ <i>Fm</i> en bleu.....	134
Figure 39 : Teneurs des pigments photosynthétiques (en µg.mg de matière fraîche (MF)) dans la 3 ^{ème} feuille de plantules de blé âgés de 8 semaines en réponse à l'infection au <i>B.graminis</i> (+ <i>B.graminis</i>) 24Hpi et en conditions non infectieuses (- <i>B.graminis</i>), en fonction des traitements : <i>Fm</i> en marron, BioA 187 en jaune, BioA 187 + <i>Fm</i> en bleu comparés au témoin DMSO 0.1% en gris.	136
Figure 40 : Profil d'expression des gènes marqueurs de défense du blé en réponse aux traitements <i>Fm</i> , BioA 187 et BioA 187+ <i>Fm</i> en conditions non infectieuses.....	139
Figure 41 : Profil d'expression des gènes marqueurs de défense du blé en conditions infectieuses.....	141
Figure 42 : Evaluation de l'activité peroxydase dans les tissus foliaires des plantules blé en réponse aux traitements <i>Fm</i> , BioA187 et BioA187+ <i>Fm</i> en présence ou en absence de <i>B. graminis</i>	143
Figure 43 : Analyse partielle des moindres carrés-discriminants (PLSDA). Graphique des scores PLSDA validés par recoupement pour la comparaison des profils globaux des métabolites	145
Figure 44 : Profil des modifications d'accumulation des métabolites foliaires chez des plantules de blé préalablement soumis à une inoculation avec <i>Fm</i> ou/ et à un traitement foliaire avec BioA (BioA 187) puis infecté ou non par <i>B. graminis</i>	147
Figure 45 : Effets des traitements (<i>Fm</i> , BioA 187 et BioA187+ <i>Fm</i>) sur la teneur totale des dérivés Caffeoylelagmatine1 (A), Caffeoylelagmatine2 (B) et Caffeoyleputrescine (C) dans les tissus foliaires en absence (- <i>B.graminis</i>) ou en présence de <i>B. graminis</i> (+ <i>B.graminis</i>).	149
Figure 46 : Effets des traitements (<i>Fm</i> , BioA 187 et BioA187+ <i>Fm</i>) sur la teneur totale des dérivés Hydroxylferuloalagmatine (A) et Hydroxylferuloyleputrescine (B) dans les tissus foliaires en absence (- <i>B.graminis</i>) ou en présence de <i>B. graminis</i> (+ <i>B.graminis</i>).....	150

Liste des figures

Figure 47 : Effets des traitements (*Fm*, BioA 187 et BioA187+*Fm*) sur la teneur totale des dérivés Coumaroylagmatine 1 (A) et Coumaroylagmatine 2 (B) dans les tissus foliaires en absence (-*B.graminis*) ou en présence de *B. graminis* (+*B.graminis*)..... 152

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales maladies cryptogamiques affectant le blé.....	15
Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'effet de la colonisation mycorhizienne à arbuscules sur les agents phytopathogènes aériens	33
Tableau 3 : : Les 17 classes de protéines PR (d'après <i>Adi et al.</i> , 2018 ; <i>Sels et al.</i> , 2018, <i>Wang et al.</i> , 2018).....	57
Tableau 4 : Indicateur de fréquence de traitement (IFT) total, selon les espèces, par ancienne région en 2017.....	60
Tableau 5 : Evolution du nombre moyen de traitements fongicides en grandes cultures entre 2011 et 2017, à champ géographique commun (nd: non diffusé).....	60
Tableau 6 : Familles et noms des molécules testées	89
Tableau 7 : Taux de colonisation des racines de blé inoculé avec <i>Fm</i> après 8 semaines de culture. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.....	100
Tableau 8.a. : Impact de l'inoculation mycorhizienne sur le nombre de colonies de <i>B. graminis</i> et les taux de protection sur la 3 ^{ème} feuille des plantules âgées de près de 8 semaines.	102
Tableau 8.b. : Impact de l'inoculation mycorhizienne sur le nombre de colonies de <i>B. graminis</i> et les taux de protection sur la 3 ^{ème} feuille des plantules cultivées en présence des inoculums commerciaux et âgées de près de 8 semaines.....	102
Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel de la reverse transcriptase.....	125
Tableau 10 : Composition du mélange réactionnel d'amplification d'ADN par PCR	126
Tableau 11 : : Liste des gènes impliqués dans les mécanismes de défense du blé dont l'expression relative a été évaluée par RT-PCR	128
Tableau 12 : Taux de colonisation des racines de blé après 8 semaines de culture en présence de l'inoculum mycorhizien <i>Fm</i>	133

Introduction générale

Introduction générale

Introduction générale

Dans la perspective de répondre à une demande croissante pour l'alimentation humaine et animale, la production céréalière devrait augmenter et avoisiner 2 818 milliards de tonnes à l'horizon 2025 et atteindre 3 000 milliards de tonnes d'ici 2050 (FAO, 2009 ; OCDE, 2016). Cette forte demande impliquera une hausse de 70% de la production agricole à l'échelle mondiale (Guyomard H., 2009). Selon les estimations de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, 2016), la production mondiale en céréales devrait augmenter de 12% et notamment celle du blé qui devrait progresser de 10% à l'horizon 2025 par rapport à la période de référence (2013/2015). Ce défi représente le principal enjeu pour la sécurité alimentaire en particulier pour le blé, deuxième culture céréalière dans le monde après le maïs et la première en France (Agreste, GRAPH'AGRI 2020). Cependant, la production de blé est particulièrement sensible aux différents stress environnementaux abiotiques (salinité, sécheresse, fluctuations des températures, métaux lourds) et biotiques, notamment les maladies fongiques (Kong et al., 2020, Chen et al., 2019). En effet, en Europe, les principales maladies du blé sont causées par des agents pathogènes fongiques. A eux seuls, ils sont responsables d'environ 15 à 20% de pertes substantielles annuelles de la production mondiale de blé, estimées à plusieurs milliards de dollars (Dean et al., 2012, Figueroa et al., 2018, Twamley et al., 2019, Savary et al., 2017, 2019).

Parmi les maladies fongiques du blé, l'oïdium, causé par l'agent pathogène biotrophe *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, est susceptible d'attaquer le blé à tous les stades de son développement (fiches.arvalis-infos). La gestion des maladies fongiques, et notamment de l'oïdium du blé, repose non seulement sur l'utilisation des variétés résistantes et l'adaptation des pratiques, mais principalement sur l'usage des fongicides conventionnels de synthèse tels que les inhibiteurs de déméthylation des stérols, de la quinone et les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase en plus des fongicides aza-naphtalènes dont deux principes actifs sont enregistrés, le quinoxifène et le proquinazide (Vielba-Fernández et al., 2020). Toutefois, l'usage systématique et intensif des produits phytosanitaires conventionnels, dont les programmes de pulvérisation impliquaient plusieurs applications par saison, a montré ses limites et est souvent entravé par l'émergence d'isolats résistants aux fongicides. En effet, le Comité d'Action contre la Résistance aux Fongicides (FRAC) et l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) ont classé l'oïdium du blé (*B. graminis*) comme un agent pathogène présentant un risque de développer des souches résistantes (FRAC Pathogen Risk List 2019). Des fréquences d'apparition des souches résistantes de *B. graminis* f. sp. *tritici* aux principales classes chimiques des fongicides ont été rapportées dans l'Hexagone, le même constat est

Introduction générale

dressé à l'échelle européenne et mondiale (Vielba-Fernández et al., 2020). De plus, les effets délétères des fongicides chimiques sur la santé humaine et l'environnement sont largement décrits (Garron et al., 2012, Caylak et Tokar, 2012, Itoiz et al., 2012, Ritter et al., 2006).

Afin de réduire leur usage, différents plans nationaux et internationaux ont été mis en œuvre, visant à soutenir le développement des moyens alternatifs et complémentaires à la lutte conventionnelle afin de garantir un niveau de production agricole avec une rentabilité suffisante et ce dans le cadre de systèmes de production plus durables et plus respectueux de l'environnement et de la santé humaine (Maya et Matsubara ; 2013). En effet, depuis 2008, la France s'est engagée à réduire sa consommation en produits phytosanitaires conventionnels et a instauré plusieurs plans nationaux dont Ecophyto, Ecophyto I, II, II+ sous la directive cadre européenne 2009/128/CE sur l'utilisation durable des pesticides. L'objectif était de développer une agriculture moins dépendante des produits phytosanitaires chimiques, de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse à l'horizon 2025 et à accroître la protection des populations. Une mobilisation de l'ensemble des acteurs scientifiques et professionnels a été ainsi mise en œuvre pour promouvoir l'identification, le développement et la diffusion des produits de biocontrôle.

Le développement des moyens de lutte alternatifs aux fongicides, telles que des molécules biosourcées à activités antifongiques et/ou des stimulateurs de défense des plantes (SDP) constituent une solution prometteuse. En effet, dans le second cas, ces substances telles que le tréhalose, la silice et le Milsana® appliquées par pulvérisation foliaire permettent de réduire le développement de l'agent pathogène *B. graminis* f. sp. *tritici* grâce à la stimulation des mécanismes de défense du blé (Tayeh et al., 2012 ; Guével et al., 2007, Randoux, et al., 2006). D'autres méthodes alternatives de biocontrôle, s'appuyant sur l'utilisation de microorganismes vivants bénéfiques, sont également explorées. Parmi les microorganismes symbiotiques, les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) sont décrits comme de potentiels agents de lutte contre les maladies des plantes (Pozo et al., 2013). En effet, l'établissement de la symbiose mycorhizienne procure de nombreux bénéfices à la plante hôte, dont une amélioration des nutriments hydrique et minérale mais aussi une meilleure tolérance aux stress environnementaux comme les agents pathogènes (Cameron et al. 2013, Comby et al., 2017, Kadam et al., 2020). C'est pourquoi, les CMA ont suscité une attention particulière ces dernières années du fait de leur potentiel effet protecteur. Leur efficacité a été le plus souvent mise en évidence dans le cas des infections racinaires mais rarement contre les maladies foliaires et plus rarement dans le cas des agents pathogènes biotrophes (Castellanos-Morales et al., 2012, Maffei et al., 2014, Mustafa

Introduction générale

et al., 2016 ; 2017, Miozzi et al., 2019, Comby et al., 2017). Toutefois, récemment, il a été montré que certains inoculum mycorhiziens à base de CMA pouvaient protéger le blé contre l'oïdium en stimulant les réactions de défense de la plante par la mise en place d'une résistance induite, MIR (Mycorrhiza Induced Resistance) (Mustafa et al., 2016, 2017).

Ainsi, dans le cadre de la lutte contre l'oïdium du blé, les deux moyens de biocontrôle (SDP et CMA) ont été jusqu'à maintenant souvent étudiés séparément. Dans l'optique d'optimiser la protection contre cette maladie impactante, mon projet de thèse a pour objectif de tester l'efficacité de l'association d'un stimulateur de défense bio-sourcée en traitement foliaire avec un inoculum mycorhizien à base de CMA appliqué au niveau racinaire dans le cadre du pathosystème blé/oïdium et d'élucider les mécanismes de défense sous-jacents impliqués dans cette protection.

Ainsi, mon travail de thèse qui s'inscrit dans le cadre du projet INTERREG V BioScreen, vise à :

- 1- Réaliser un criblage de molécules et d'inoculum fongiques présentant un effet protecteur contre l'oïdium du blé. Quatorze molécules issues de diverses familles chimiques ainsi que six inoculum fongiques ont été testés, contre *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) chez le blé (*Triticum aestivum* L.) et ce dans des conditions contrôlées via des essais *in vitro* (germination des spores de *Bgt*, effet direct) et *in planta* (taux de protection, effet SDP).
- 2- Rechercher une éventuelle amélioration de l'effet protecteur en associant un SDP et un inoculum mycorhizien sélectionnés sur la base de leur efficacité de protection
- 3- Comprendre les mécanismes de défense impliqués dans la protection du blé contre l'oïdium suite à l'application foliaire d'un SDP pré-sélectionné, et de l'inoculum mycorhizien additionné au substrat de culture du blé, utilisés séparément ou en combinaison en étudiant la réponse du blé aux traitements (SDP seul, CMA seul, combinaison SDP+CMA) en conditions infectieuses et non infectieuses par : (i) le suivi de l'expression de différents gènes marqueurs de défense du blé (telles que les protéines «*Pathogenesis-Related*», la voie des phénylpropanoïdes, le système anti-oxydant...) ii) l'analyse globale, puis ciblée du métabolome foliaire et (iii) le dosage de l'activité enzymatique peroxydase (POX).

Projet SMARTBIOCONTROL -BIOSCREEN

Mon projet de thèse s’inscrit dans le contexte général du portefeuille de projets SMARTBIOCONTROL – INTERREG V, financé par le Fond Européen de développement régional, qui avait pour objectif de présenter des solutions de biocontrôle d’origine biologique et multifonctionnelles efficaces contre divers agents pathogènes de différentes espèces végétales. Des travaux collaboratifs ont été répartis sur cinq projets constitutifs regroupant 26 partenaires de la région transfrontalière issus des centres de recherche, de laboratoires universitaires et des syndicats d’agriculture. Le but principal étant d’évaluer le potentiel des produits de biocontrôle sur les plantes d’intérêt agronomique en Belgique et en France.

Mon travail de thèse entre plus exactement dans le cadre du projet BIOSCREEN qui vise à développer une plateforme de screening à haut débit de 200 nouveaux produits à activité fongique et/ou inducteurs de la résistance des plantes (Figure 1).

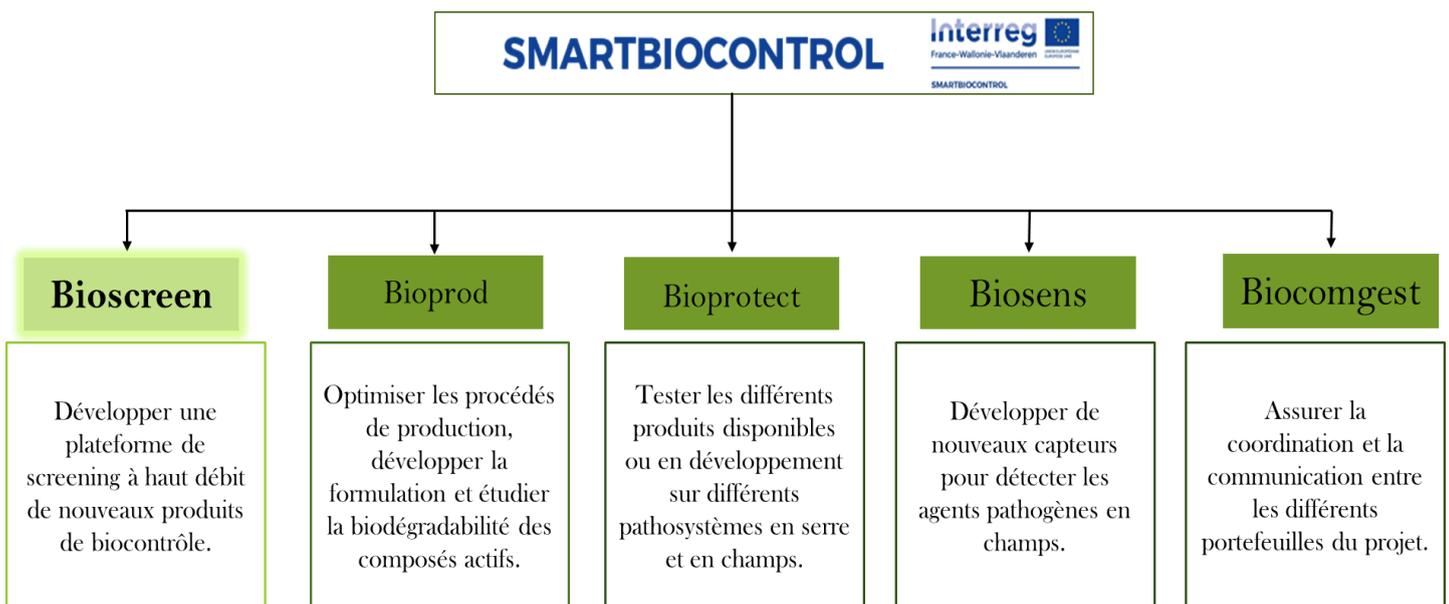


Figure 1 : Présentation des cinq projets de SMARTBIOCONTROL et de leurs principaux objectifs.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

I. Pathosystème Blé-Oïdium

1. Le blé

1.1. Historique et taxonomie

Le blé (genre *Triticum*) est une céréale originaire du croissant fertile (qui s'étend de l'Irak jusqu'au Nil en Egypte). La domestication du blé (tendre et dur) a été un élément fondateur des premières civilisations humaines. Initialement, récolté sous sa forme sauvage, la culture du blé s'est ensuite répandue entre 8900 et 7500 ans avant Jésus-Christ. Sa domestication a commencé avec la sédentarisation de l'Homme lors du Dyras, un épisode de sécheresse et de refroidissement climatique, où la constitution de stock alimentaire fut vitale (Bonjean, 2001). La culture du blé s'est alors étendue à l'Asie centrale, à l'Europe du sud et à l'Egypte entre 7500 et 6200 ans avant Jésus-Christ (Feldman & Millet, 2001). La première hybridation entre *Triticum urartu* Thum. Ex Gandil (AA; $2n = 14$) et *Aegilops speltoides* (BB ; $2n = 14$), il y a environ 0,2 Millions d'années, a conduit à une nouvelle espèce l'allotétraploïde *T. turgidum*L (AABB) (Figure2). Ensuite, l'hybridation des blés tétraploïdes (AABB) avec *A. Tauschii* Coss a conduit à l'obtention des blés allohexaploïdes ($2n=42$, AABBDD) il y a environ 9000 ans (Feldman et Levy, 2005).

Synthèse bibliographique

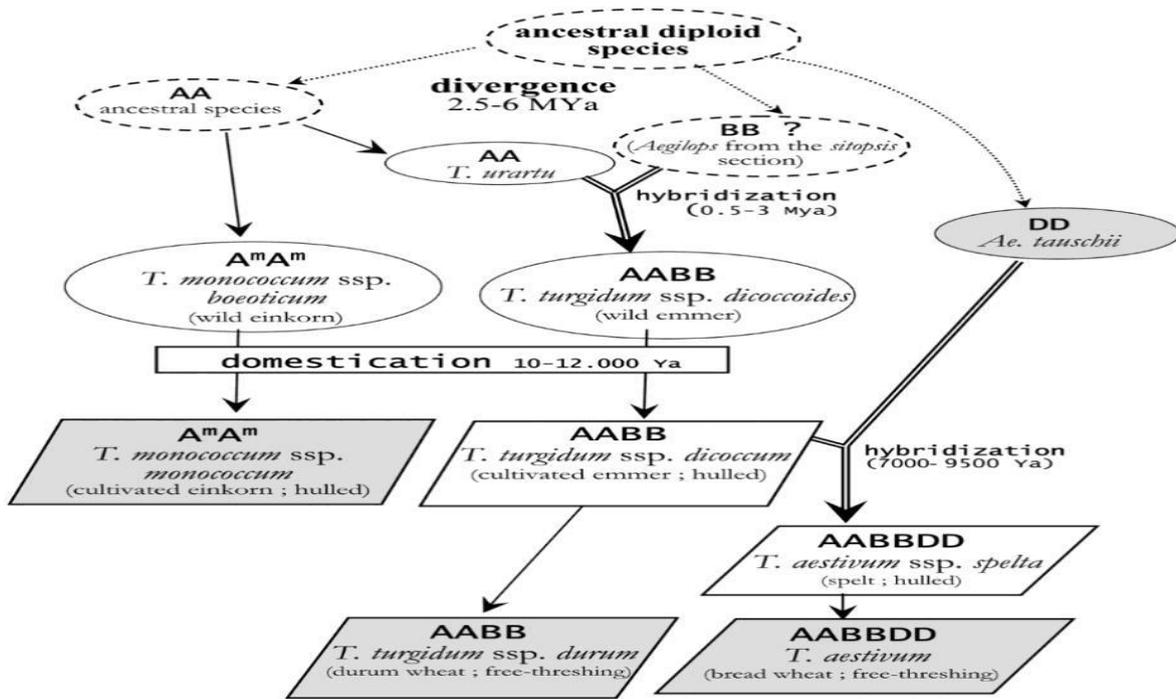


Figure 2 : Représentation schématique de l'évolution historique des espèces de blé

(Chantret *et al.*, 2005).

Le blé est une monocotylédone, il fait partie du règne des *Plantae*, du sous règne des *Tracheobionta*, de la classe des *Liliopsida*, de la famille des *Poaceae* (autrefois appelée Graminées), de la tribu des *Triticeae* et du genre des *Triticum* qui contient à peu près 300 espèces (Matsuoka, 2011).

Aujourd'hui, deux espèces majeures sont communément cultivées: le blé tendre (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*, $2n = 42$, AABBDD) et le blé dur (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*, $2n = 28$, AABB). Le blé tendre constitue la matière première pour la fabrication du pain, et le blé dur est utilisé pour la fabrication des semoules et des pâtes alimentaires. Hormis ces deux espèces, il en existe également d'autres plus rustiques, cultivées localement dans différentes régions du monde. Cette diversité génétique est une ressource particulièrement intéressante pour les sélectionneurs, le brassage de tout ce patrimoine génétique ayant permis des améliorations variétales à l'origine des cultivars ou variétés constituant actuellement la sole française de blé.

1.2. Cycle de développement

Le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est une graminée annuelle à feuilles alternes. Elle est formée d'une tige appelée chaume qui porte un épi renfermant deux rangées d'épillets. L'échelle de croissance du blé, décrite par Zadoks et al. (1974), est composée d'une succession de stades de croissance allant de la germination à la production de nouveaux grains et leur maturation. Principalement, trois grandes étapes sont distinguées au cours du développement du blé (Figure 3) :

(i) la phase végétative : cette phase correspond à la germination jusqu'au stade 3 feuilles. La germination nécessite une hydratation des grains et une température d'au moins 3 à 4 °C. Elle aboutit à l'apparition de la radicule et du coléoptile qui émergent de la graine. Dès que la première feuille a percé l'extrémité du coléoptile, celui-ci s'arrête de croître et se dessèche peu à peu. Cette première feuille s'allonge, une deuxième apparaît, puis une troisième. Chacune d'elles est imbriquée dans la précédente. Le stade "3 feuilles" qui suit, est une étape déterminante dans le développement de la plante. En effet, durant cette étape, les bourgeons se forment à l'aisselle des 3 feuilles déjà présentes, initiant ainsi la formation de tiges secondaires, les talles.

(ii) la phase reproductrice : elle débute avec le tallage. Cette étape est caractérisée par l'émission de talles au même niveau que le maître brin. Parallèlement, l'ébauche de l'épi apparaît à l'intérieur de la tige principale. Lors de la montaison, l'élongation des entre-nœuds et le développement de l'épi s'activent et les dernières feuilles apparaissent. Au moment de l'épiaison, l'épi sort de la gaine protectrice de la feuille "drapeau". Lorsque les températures dépassent 14°C, la floraison est possible. Elle s'observe à partir du moment où les étamines sont visibles en dehors des glumelles.

(iii) la phase de maturation : le cycle de développement s'achève par cette phase qui correspond à la formation et à la maturation des grains. Au cours de ces stades, il y aura l'accumulation des réserves (amidon, matières protéiques). Cette période se traduit par une première phase de multiplication cellulaire intense, correspondant au stade laiteux de la graine. Cette étape est suivie par une phase d'accumulation des glucides et des protéines. Elle est appelée maturité pâteuse ou stade pâteux de la graine. La maturité complète est acquise lors de la phase de dessiccation au cours de laquelle la teneur en eau du grain diminue. L'épi mûr acquiert une couleur jaune.

Synthèse bibliographique

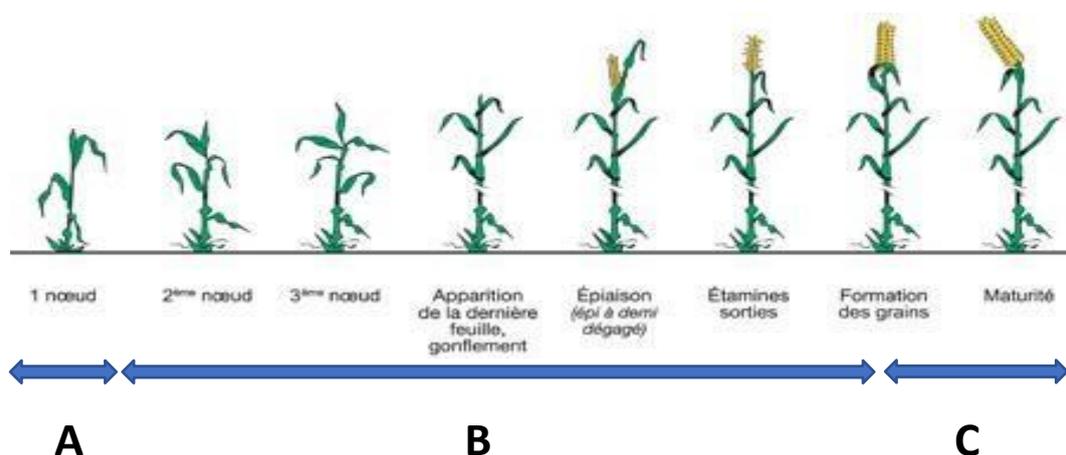


Figure 3 : Echelle de Zadoks indiquant les stades de développement repères du blé

(<https://www.terre-net.fr>) A : phase végétative ; B : phase reproductive ; C : phase de maturation.

1.3. Importance économique

Selon un rapport publié en 2019 par l'Organisation des Nations Unies, la population mondiale devrait passer de 7.7 milliards aujourd'hui à 9.7 milliards d'habitants en 2050 et pourrait atteindre 11 milliards d'ici 2100 (<https://www.un.org/fr/sections/issues-depth/population/index.html>), ce qui nécessiterait une augmentation d'au moins 70% de la production agricole (FAO). La production céréalière, ressource alimentaire la plus importante au monde, devra dépasser les 2.1 milliard de tonnes et s'accroître de près de 1 milliard de tonnes d'ici 2050 (FAO) (<http://www.fao.org/news/story/fr/item/35656/icode/>). Aujourd'hui, le blé est parmi les trois principales céréales vivrières cultivées à travers le monde, aussi bien sur le plan de l'alimentation que sur le plan économique (Shewry, 2009). Le blé est la deuxième céréale produite après le maïs représentant 29% et 40 % de la production de céréales, respectivement, suivi du riz à 19% (UDSA, 2016). Il occupe plus de 220 millions d'hectares des terres cultivées et sert de source d'alimentation de base à 30% de la population humaine du monde entier (Meyer *et al.*, 2014 ; Henry *et al.*, 2016).

Les enjeux économiques autour de cette céréale sont donc d'une grande importance. D'après les prévisions de la FAO sur la production mondiale de blé, celle-ci devrait atteindre 762.6 millions de tonnes (Mt) en 2020 (<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>).

Les céréales les plus cultivées dans l'Union Européenne (UE) sont le blé tendre et l'épeautre avec 43.8%, représentant ainsi la principale culture céréalière dans plus de 111 régions de l'UE

Synthèse bibliographique

(Eurostat, 2017) (Figure 4). Ainsi, l'UE est le premier producteur mondial de blé suivie par la Chine, l'Inde, la Russie et les Etats-Unis avec une production de blé tendre de 138 Mt en 2018-2019 (Statista, 2020). La France est le 5^{ème} producteur mondial de blé tendre et le 1^{er} producteur Européen, en totalisant 27% de la production totale de l'UE, avec une superficie de 9.1 millions d'hectares (Figure 5). Au niveau national, la production des céréales en France a été évaluée à 71 Mt et celle du blé tendre à 39.7Mt (soit 79,2 q/ha) en 2019 avoisinant le record de 40.9 Mt enregistré en 2015 (soit 79,3 q/ha) (Agreste 2019).

La production céréalière de l'Union Européenne (28 pays) en 2018

Le blé tendre, l'orge et le maïs grain représentent 86 % de la production

Source : Eurostat

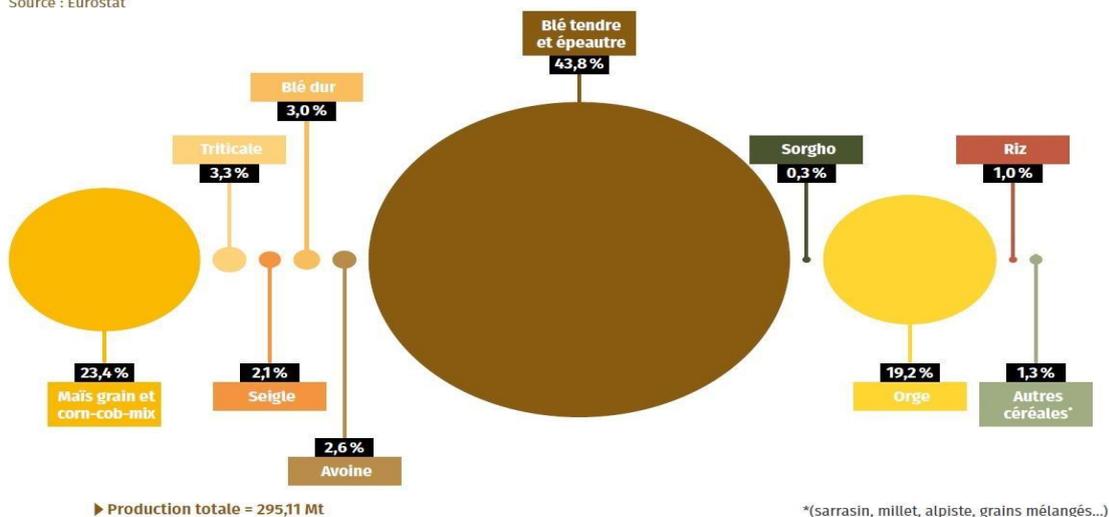


Figure 4 : Production céréalière de l'Union Européenne en 2018 (Passion Céréales, <https://www.passioncereales.fr>)

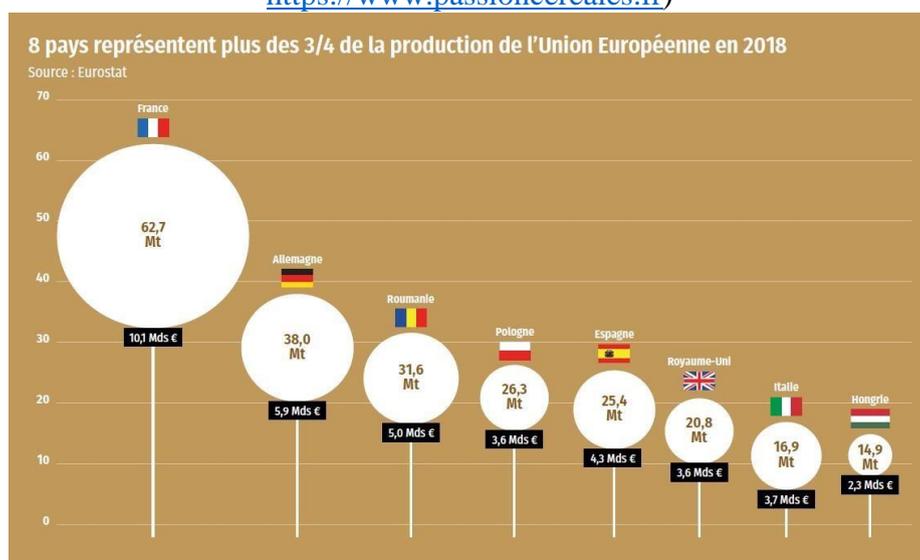


Figure 5 : Principaux pays de l'Union Européenne producteurs de blé (Passion Céréales, <https://www.passioncereales.fr>)

2. Maladies cryptogamiques aériennes du blé

Le blé est sensible à divers stress biotiques tout au long de sa culture. Ces derniers sont liés à des maladies d'origines fongiques, bactériennes ou virales. Les maladies les plus dommageables sont d'origine fongique et sont dites cryptogamiques. Elles sont responsables, chaque année, de pertes importantes de rendement et de qualité, voire de problèmes sanitaires. Ces agents pathogènes attaquent la plante à tous les stades de son développement au champ et sont capables d'atteindre différentes parties de la plante, telles que les feuilles ou les grains (Tableau 1 & Figure 6). La colonisation de la plante hôte par les champignons phytopathogènes peut s'effectuer selon deux modes de vie principaux :

- biotrophe, l'agent pathogène colonise des tissus vivants d'une plante hôte. Il n'est pas dans l'intérêt biologique de ce pathogène de provoquer la mort de sa plante hôte, ni de déclencher des réactions de défense; son génome contient une grande proportion de gènes codant des petites protéines sécrétées considérées comme des effecteurs putatifs par rapport à la proportion de gènes codant des enzymes de dégradation de la paroi végétale ou impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Nemri *et al.*, 2014 ; Lo Presti *et al.*, 2015).
- nécrotrophe infecte les tissus vivants et provoque la nécrose des cellules de l'hôte et se développe sur les tissus nécrosés. C'est un pathogène non obligatoire qui tue les cellules avant de s'en nourrir. Sa stratégie d'infection est basée sur l'utilisation de toxines et des enzymes lytiques responsables de la déliquescence des tissus végétaux (Le poivre, 2003, Petit, 2017). Une catégorie intermédiaire est celle des champignons hémibiotrophes (Mendeng et Hahn, 2002). Le cycle de vie de ces derniers comporte les deux formes d'acquisition d'éléments nutritifs, passant d'une phase initiale biotrophe au cours de laquelle il se développe sans dégrader les cellules végétales, à une phase nécrotrophe à des stades ultérieurs de la maladie (Laluk et Mengiste, 2010).

Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Principales maladies cryptogamiques affectant le blé
(<http://www.syngenta.com/>).

Nom commun de la maladie	Principales espèces pathogènes responsables	Organes affectés	Symptômes observés	Période principale de contamination
Oïdium	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Feuilles, tiges et épis	Feutrage blanc poudreux à la surface des feuilles	Epis 1 cm à 1er nœud
Helminthosporiose	<i>Helminthosporium tritici-repentis</i>	Feuilles	Tâches foliaires, nécroses, découpage du limbe	1 ^{er} nœud à floraison
Septoriose	<i>Mycosphaerella graminicola</i> , <i>Phaeosphaeria nodorum</i> , <i>Phaeosphaeria avenaria</i> f.sp. <i>triticea</i> , <i>Septoria nodorum</i>	Feuilles, épis, gaine, glumes	Tâches chlorotiques du limbe, nécroses, pycnides	1 ^{er} nœud à floraison
Rouille jaune	<i>Puccinia striiformis</i>	Feuilles, épis	Petites pustules jaunes pulvérulentes alignées et groupées en stries suivant les nervures	1er nœud à floraison
Rouille brune	<i>Puccinia graminis</i>	Feuilles, tiges, glumes	Pustules orangées puis noires	1er nœud à floraison
Piétin verse	<i>Cercospora herpotrichoides</i>	Base des plantes, gaines, tiges	Taches brunes sur la gaine des feuilles, à la base de la tige	Epis 1 cm à 1er nœud
Rhizoctone	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Gainés et tiges	Tâches ovales claires nettement délimitées par un liseré brun	Tous les stades
Charbon nu	<i>Ustilago tritici</i>	Epis	Hypertrophie des ovaires, production de spores noires	Floraison
Fusariose	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Microdochium nivale</i>	Epis	Dessèchement prématuré des épillets,	A partir de la floraison

Synthèse bibliographique

			apparition de mucilage rosé formé d'une multitude de spores	
Carie	<i>Tilletia tritici</i>	Grains	Aspect ébouriffé de l'épi, Intérieur du grain remplacé par des spores	De la levée au stade 2 feuilles

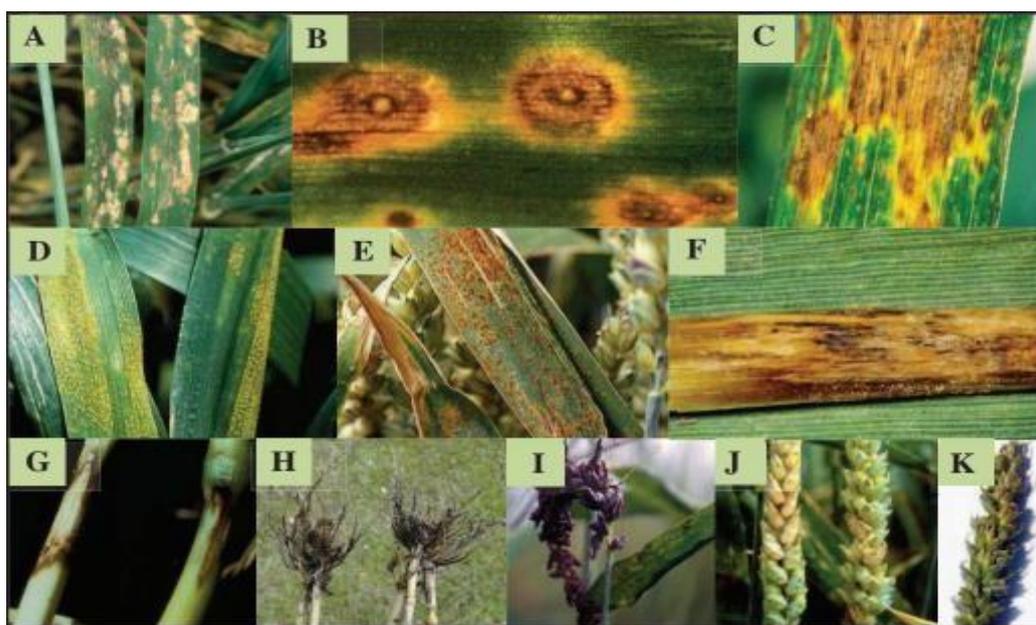


Figure 6 : Symptômes des principales maladies du blé : oïdium (A), helminthosporiose (B), septoriose (C), rouille jaune (D), rouille brune (E), piétin verse (F), rhizoctone (G), piétin échaudage (H), charbon nu (I), fusariose des épis (J), carie (K) (<http://www3.syngenta.com/> ; <http://www.fiches.arvalis-infos.fr/>).

2.1. Oïdium du blé

Les champignons responsables des maladies désignées sous le nom d'oïdiums ou encore appelées maladies « du blanc » appartiennent à l'ordre des *Erysiphales*, famille des *Erysiphaceae*. Ces maladies sont exprimées suite à la multiplication asexuée de certains Ascomycètes (Bolay, 2005). Auparavant appelé *Erysiphe graminis*, *Oïdium monilioides* ou *Oïdium tritici*, *Blumeria graminis* est la seule espèce du genre *Blumeria*. Cependant, *B.graminis* a développé quatre formes spéciales distinctes (f. sp.) qui sont adaptées à des hôtes spécifiques (Marchal, 1902 ; Oku *et al.*, 1985). En effet, l'oïdium du blé n'affecte pas les autres céréales et la forme infectant le blé est nommée *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bgt) (Tosa *et*

al., 1990). Trois autres formes spéciales de *Blumeria graminis* ont été définies en fonction de l'hôte qu'il infecte : *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) chez l'orge, *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* chez l'avoine et *Blumeria graminis* f. sp. *secalis* (Bgs) chez le seigle (Tosa *et al.*, 1990 ; Takamatsu, 2004).

L'oïdium provoque chez le blé des altérations de la cuticule des feuilles, une diminution de la photosynthèse, une augmentation de la respiration ainsi qu'une réduction de la croissance et un affaiblissement général de la plante (Rabbinge *et al.*, 1985). Selon Czembor (2002), ces perturbations peuvent occasionner des pertes du rendement pouvant atteindre 20%. Celles-ci sont liées à une diminution du nombre de grains par épi et une chute du poids de mille grains (PMG). L'installation de la maladie est favorisée par des températures optimales de 15 à 20°C, une hygrométrie élevée de 90%, une densité de semis élevée et un excès de fertilisation azotée (Newman et Pottorf, 2012). Le symptôme caractéristique de l'oïdium est la formation d'un feutrage mycélien blanc cotonneux sur les deux faces des feuilles, les gaines foliaires et les épis entraînant des réductions de rendement généralisées dans de nombreuses régions productrices de blé (Singh *et al.*, 2016).

2.2. Cycle de développement de *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*

A la fin de l'été, lorsque les conditions deviennent défavorables, la reproduction sexuée du champignon débute avec la formation des cléistothèces, qui correspondent à une forme de résistance à la sécheresse et aux basses températures ; ils permettent ainsi au pathogène d'hiverner en absence de l'hôte. Néanmoins, en hiver et lorsque l'humidité devient importante, les cléistothèces peuvent libérer les ascospores responsables d'infections automnales sur les plantations des blés d'hiver.

Au printemps, les ascospores libérées sont disséminées sur de nouvelles plantes. La formation du mycélium et des spores par voie asexuée sont favorisées par l'augmentation des températures. Ainsi, dans des conditions favorables, de nouvelles conidies peuvent être formées en 7 jours ce qui contribue à la propagation rapide de la maladie au champ. A la surface de la feuille, la germination des conidies débute par l'émergence d'un tube germinatif primaire (TGP) puis celle d'un second tube germinatif nommé tube germinatif appressorial (TGA) (Green *et al.*, 2002) (Figure 7). Ce dernier se forme 5 à 8 heures après la perception de la surface de la feuille par le champignon (Giese *et al.*, 1997). Suite à l'hydrolyse enzymatique de la cuticule, le TGA traverse la paroi végétale et forme un appressorium (Pryce-Jones *et al.*, 1999).

Synthèse bibliographique

L'appressorium se différencie ensuite en haustorium au niveau de la membrane plasmique. Ce dernier assure le transfert des nutriments de la plante au champignon, comme le glucose (Sutton *et al.*, 1999). A la surface du végétal, un mycélium se développe. Des conidiophores sont alors formés, assurant la libération de nouvelles spores asexuées permettant la dissémination de l'agent pathogène (Figure 7).

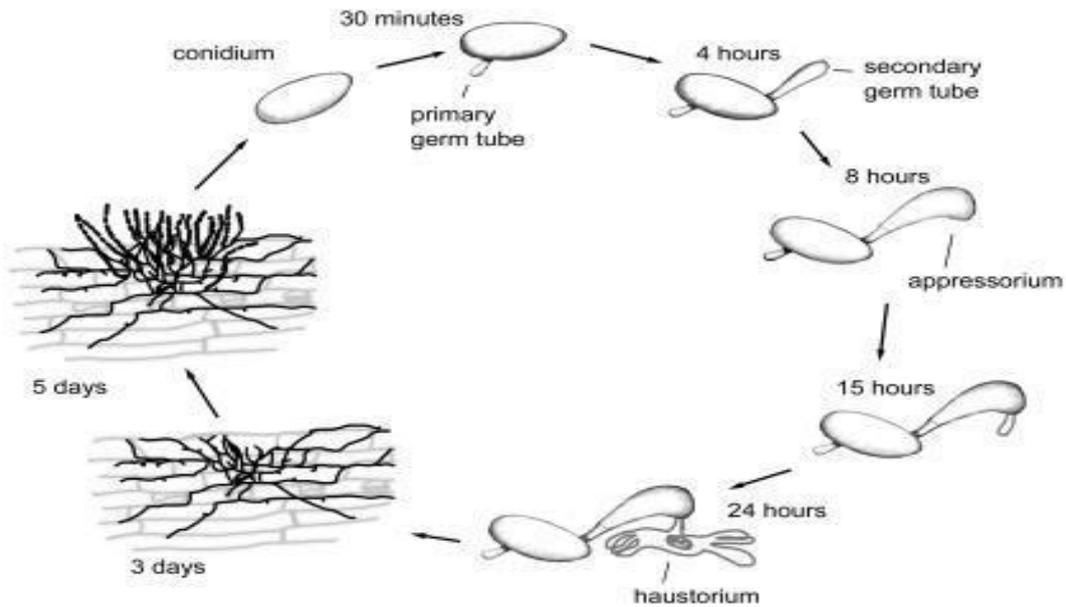


Figure 7 : Phase asexuée du cycle de développement de *B. graminis* f. sp. *hordei* (Both *et al.*, 2005).

II. Mécanismes de défenses des plantes

1. Relations et interactions parasites

Durant leur cycle de développement, les plantes subissent différents stress, non seulement, abiotiques à savoir les variations de températures, la sécheresse, les disponibilités altérées en nutriments, mais aussi des stress biotiques tels que des attaques d'un large éventail de phytopathogènes et d'herbivores (Wilkinson *et al.*, 2019, Hilker et Schmölling, 2019). En effet, les plantes présentent une niche offrant un apport constant de carbone et de nutriments pour certains phytopathogènes y compris les virus, les bactéries, les champignons et les nématodes (Biere et Goverse, 2016). Pour accéder à cette source, les mécanismes de défense des plantes allant des barrières passives aux réactions de défense induites qui doivent être surmontées. En effet, les plantes ont développé un arsenal de mécanismes de détection et de signalisation pour percevoir et réagir d'une manière appropriée et efficace à chaque type de stress (Romera *et al.*, 2019). Ainsi, les plantes peuvent être résistantes à certains microorganismes nuisibles. Cependant, un nombre restreint de bioagresseurs peut engendrer des maladies ayant des conséquences économiques et écologiques majeures (Gill *et al.*, 2015; Lipka *et al.*, 2008). A cet égard, les interactions entre les plantes–agents pathogènes se distinguent en 3 types de relations différentes selon les deux partenaires :

- La relation dite non-hôte correspond à une incompatibilité fondamentale entre la plante et l'agent pathogène. Ce dernier est incapable de pénétrer et de se développer au dépend de la plante. En effet, les barrières passives de la plante sont suffisantes pour stopper le bioagresseur, cette relation se définit par une incompatibilité entre tous les cultivars d'une espèce végétale et tous les biotypes d'un agent pathogène déterminé (Lepoivre, 2003).
- Dans une relation hôte, pour une espèce végétale particulière, la relation parasitaire peut aboutir soit à :
 - (i) Une interaction incompatible pour les biotypes avirulents des champignons : bien que l'agent pathogène parvienne à dépasser les barrières passives et pénétrer dans la plante, son installation et son développement au sein de la plante hôte sont immédiatement arrêtés grâce à la mise en place de réponses de défense appropriées et efficaces. Ainsi la plante est dite résistante, l'agent pathogène avirulent est donc

Synthèse bibliographique

incapable de causer la maladie (Reignault et Sancholle, 2005). Cette résistance est le plus souvent caractérisée par une réaction de type « hypersensible » (*hypersensitive response*, HR) (Agrios, 2005; Lepoivre, 2003).

(ii) Une interaction compatible est suivie par une prolifération active de l'agent pathogène virulent. Les défenses mises en place par la plante sont inefficaces pour bloquer le développement du parasite. La colonisation totale ou partielle de la plante est suivie par l'apparition de symptômes chez les plantes dites sensibles. En effet, la relation compatible est plus ou moins marquée selon les génotypes des plantes sensibles ou tolérants (Reignault et Sancholle, 2005).

2. Mécanisme d'induction de la résistance chez les plantes

Dans le cas d'une relation hôte compatible, les phases précoces de contact entre la plante et l'agent pathogène fongique vont déterminer la capacité de l'agent pathogène à infecter la plante. Après la pénétration de l'agent phytopathogène à travers la paroi végétale ou *via* une blessure, sa présence peut être perçue par la plante et peut conduire à l'induction des réactions de défenses (Boulenouar *et al.*, 2011).

La résistance des plantes est obtenue par l'induction de la défense qui se met en place dès l'attaque de l'agent pathogène. En 2006, Jones et Dangl ont proposé un modèle dit « en zig-zag » décrivant les phases de reconnaissances successives qui peuvent avoir lieu lors de l'interaction entre une plante et un agent pathogène (Figure 8).

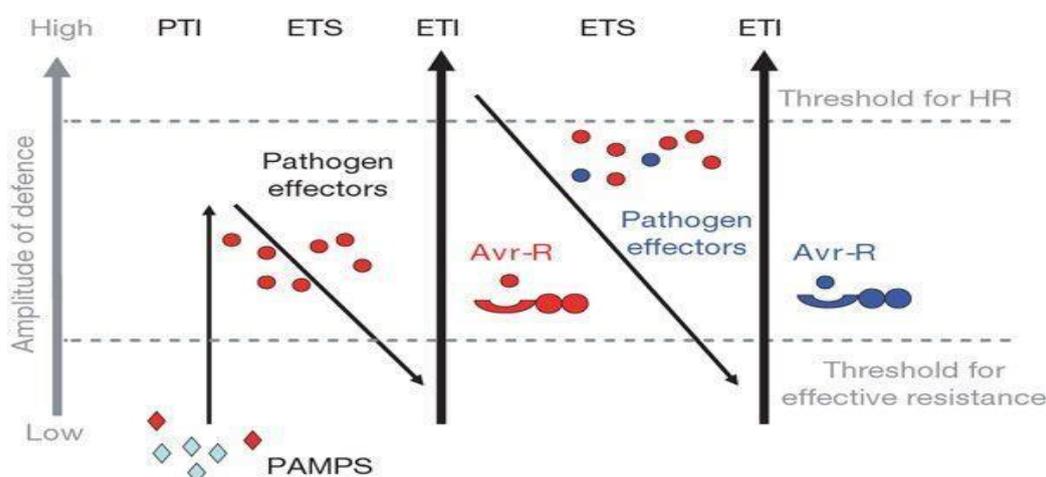


Figure 8 : Schéma du modèle « en zig-zag » illustrant l'évolution de l'immunité de la plante, l'agressivité et la virulence des agents pathogènes (Jones et Dangl, 2006). PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern, PRR: pattern recognition receptor, PTI: PAMP-Triggered Immunity, ETI: Effector Triggered Immunity.

- Phase 1 : Cette étape correspond à la résistance basale. La plante détecte les motifs moléculaires PAMP produits par tous les agents pathogènes par le biais des récepteurs de reconnaissance des motifs PRR, entraînant l'établissement de la PTI.
- Phase 2 : Certains agents pathogènes adaptés sont capables de contourner la PTI en produisant des molécules qualifiées d'effecteurs, déclenchant ainsi la deuxième phase de ce modèle : l'ETS (Effector-Triggered Susceptibility).
- Phase 3 : De son côté, la plante réagit par une deuxième ligne de défense amplifiée de la PTI, appelée ETI et pouvant induire une réaction d'hypersensibilité où un effecteur donné produit par l'agent pathogène (*Avr*) est spécifiquement reconnu par une protéine R. Cette reconnaissance permet le développement d'un niveau élevé de résistance, associé à la HR. En réponse, l'agent pathogène peut contourner l'ETI en produisant de nouveaux effecteurs qui ne seront pas reconnus par la première protéine R, et la plante redevient sensible donc à l'ETS.

2.1. Reconnaissance du stimulus d'attaque et induction de la résistance basale : la PTI

La première étape de la signalisation de défense correspond à la reconnaissance par la plante des éliciteurs moléculaires exogènes associés aux agents pathogènes appelés PAMPs

(Pathogen-Associated Molecular Patterns), plus généralement appelés MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) (Chisholm *et al.*, 2006). Les PAMPs peuvent être des glycopeptides, des oligosaccharides ou des peptides, issus de la paroi, comme la chitine chez les champignons pathogènes ou la flagelline chez les bactéries (Boller et Felix, 2009 ; Henry *et al.*, 2012 ; Jones et Dangl, 2006). A ces molécules s'ajoutent des motifs endogènes à la plante dites DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), résultant de la dégradation des parois végétales par les enzymes de l'agent pathogène (Henry *et al.*, 2012). Ces motifs peuvent être de nature protéique, glucidique ou lipidique (Boller et Felix 2009, Nürnberger *et al.*, 2004). Ils sont reconnus par des récepteurs membranaires PRR (Pathogenic-Related Receptors) et induisent une résistance basale (appelée aussi résistance non-spécifique) sous le nom de PTI (PAMP-Triggered Immunity) (Jones et Dangl 2006 ; Jung *et al.*, 2009 ; Nürnberger *et al.*, 2004). Cette réponse est mise en place pour stopper la prolifération de l'agent pathogène (Figure8).

2.2. Réponse de l'agent pathogène : l'ETS

En retour, l'agent pathogène peut augmenter son armement contre la PTI dans le but de contourner cette première ligne de défense basale et d'infecter la plante (Göhre et Robatzek, 2008). Une phase de sensibilité en découle ; elle est dite ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*). En effet, l'agent pathogène secrète donc des effecteurs correspondant à des protéines souvent riches en cystéines (Oliva *et al.*, 2010). Ces effecteurs peuvent être apoplastiques ou cytoplasmiques. Ces effecteurs sont impliqués dans la manipulation du métabolisme de la cellule végétale (perturbation de la balance hormonale, activité photosynthétique ou modification de la transcription de gènes impliqués dans les voies de défense), permettant à l'agent pathogène de coloniser les tissus de la plante et installation de la maladie (Kamoun, 2006 ; Lo Presti *et al.*, 2017). Les effecteurs apoplastiques vont agir dans l'apoplasme pour protéger la chitine fongique contre les chitinases végétales ou contre la reconnaissance des PAMPs (Lo Presti *et al.*, 2017). Les agents pathogènes filamenteux sécrètent leurs effecteurs dans l'apoplasme au niveau d'une interface étroite avec la cellule végétale, grâce à leurs haustoria (Ökmen et Doehlemann, 2014). Par exemple, le champignon biotrophe *Ustilago maydis*, responsable de la maladie du carbon du maïs, est capable de sécréter un effecteur apoplastique Pep1 capable de supprimer les réponses de défense de la plante en inhibant la peroxydase (POX12) (Hemetsberger *et al.*, 2012). Toutefois, il n'a pas été

décrit de quelle façon les effecteurs de ces agents pathogènes sont internalisés dans la cellule végétale (Lo Presti et Kahmann, 2017).

2.3. Induction de la résistance spécifique : l'ETI

En réponse à l'ETS, la plante peut mettre en place une deuxième vague de défense plus rapide, prolongée et amplifiée par rapport à la PTI (Figure 5). Cette réaction est décrite comme une immunité déclenchée par la reconnaissance des effecteurs et est appelée ETI (*Effector-Triggered Immunity*). Les effecteurs sont définis en tant que des protéines d'avirulence, codés par des gènes d'avirulence *avr* qui sont reconnus par la plante grâce à des récepteurs des gènes de résistance *R* de type NB-LRRs (à domaines *Nucleotide Binding Site* et *Leucine Rich Repeat*) (Elmore *et al.*, 2011). Cette complémentarité intracellulaire entre les produits des gènes *avr* de l'agent pathogène et les produits des gènes *R* de la plante correspond à une résistance génétique dite « gène pour gène » (Flor, 1971). Cette interaction est indispensable pour assurer une résistance spécifique contre le bio-agresseur. L'ETI est également appelée résistance spécifique/verticale. Elle caractérise les interactions de type incompatible entraînant une résistance de la plante au pathogène et au cours de laquelle peut intervenir la HR, se caractérisant par une mort cellulaire rapide au site d'infection (Jones et Dangl, 2006 ; Benhamou et Rey, 2012) (Figure 1). Par exemple, une HR est observée chez le blé et découle de la reconnaissance des protéines effectrices appelées *AVRPM2* produites par *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) reconnu par un récepteur de la plante codé par des gènes de résistance nommés *Pm* (Bourras *et al.*, 2018). Cette interaction, entre les produits des gènes *R* et *avr*, conduit à la résistance totale du blé contre *Bgt* (Das et Griffey, 1995). Dans certains cas, l'agent pathogène peut arriver à contourner l'ETI déclenchée en acquérant des effecteurs supplémentaires (Jones et Dangl, 2006).

3. Résistance locale et résistance systémique

3.1. Résistance locale acquise

La résistance locale acquise (*Local Acquired Resistance*, LAR) se manifeste dans les cellules situées au niveau du site d'infection par une augmentation de la résistance des tissus adjacents, mais qui ne s'étend pas aux tissus distants du point d'infection. La LAR conduit à une HR au

niveau des cellules avoisinantes du site d'infection et donc à un arrêt de pénétration de l'agent phytopathogène. Une accumulation des protéines PRs (*pathogenesis-related protein*) tels que la PR9, PR15 et l'accumulation de la POX qui conduit à un renforcement de la paroi cellulaire et à la production des phytoalexines (Jones et Dangl, 2006).

3.2. Résistance systémique acquise

En plus de la mort cellulaire au niveau du site de l'infection et donc de l'inhibition directe de l'agent pathogène biotrophe, la HR peut libérer des signaux conditionnant les cellules distantes à devenir plus réactives et activer des réponses dans les tissus distaux du site de l'infection (Kombrink *et al.*, 2001). C'est ce qui conduit à la résistance systémique acquise (*Systemic Acquired Resistance, SAR*) qui est une forme généralisée de LAR ayant comme point de départ le site de pénétration de l'agresseur et qui se développe dans l'ensemble de la plante (Durrant *et al.*, 2004). Les premières études sur la SAR chez les monocotylédones ont fait état d'une résistance contre une souche de *B. graminis* f. sp. *hordei* virulente au niveau des feuilles d'orge non infectées et pré-infectées avec des isolats virulents ou avirulents du même agent pathogène (Hwang et Heitefuss, 1982) et d'une résistance accrue contre *Pyricularia oryzae* dans des tissus de riz pré-infecté avec la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Smith et Metraux, 1991).

La SAR est généralement induite suite à l'infection par des agents pathogènes foliaires biotrophes (Vlot *et al.*, 2009 ; Fu et Dong, 2013), mais aussi en réponse à des traitements par des activateurs chimiques connus pour « mimer » la mise en place de la SAR : acide salicylique (*salicylic acid, AS*) et ses analogues fonctionnels tels que l'acide β -amino-butyrique (β -*Amino-Butyrique Acid, BABA*), l'acide 2,6-dichloro-isonicotinique (INA) ou acibenzolar-S-méthyl (ASM) ou le benzothiadiazole (BTH) (Sticher *et al.*, 1997; Mandal, 2010, Wang *et al.* 2018). Suite à un traitement au BTH, une résistance induite généralisée a été observée chez le blé contre l'oïdium du blé (*Bgt*) et la rouille causée par *Puccinia triticina* (*Pt*). Cette résistance est liée à l'induction de gènes codant pour la lipoxygénase (LOX) et une protéine riche en soufre (Görlach *et al.*, 1996 ; Hafez *et al.*, 2014). La résistance conférée à la plante est efficace contre un large panel d'agents pathogènes incluant virus, bactéries, champignons et nématodes (Durrant et Dong 2004, Jourdan *et al.*, 2008). Pour ce faire, la SAR implique des modifications de la paroi du site de l'infection provoquant la nécrose, une accumulation de phytoalexines et une induction de l'expression des gènes codant pour les protéines PR dans les tissus éloignés

du site de l'infection (Durrant et Dong 2004 ; Ebrahim *et al.*, 2011). La surexpression du facteur protéique NPR1 (*Non-expressor of Pathogenesis-Related Genes1*), connu comme un régulateur important de la voie de l'AS, aboutit à la mise en place de la SAR et entraîne une augmentation de la résistance vis-à-vis à plusieurs pathogènes (Dong, 2004 ; Hofte, 2003 ; Grant et Lamb, 2006). En effet, suite à l'infection par l'agent pathogène, des oligomères de NPR1 seraient convertis en monomères et transférés du cytoplasme au noyau où ils interagissent avec des facteurs de transcription TGA et WRKY pour activer l'expression de multiples gènes *PR* (Cao *et al.*, 1994 ; Delaney *et al.*, 1995 ; Ryals *et al.*, 1997 ; Shah *et al.*, 1997 ; Mou *et al.*, 2003, Fobert *et al.*, 2005, Pieterse *et al.*, 2014).

L'activation de la SAR est associée par une accumulation locale d'AS au site de l'infection et de manière systémique à des concentrations plus faibles dans les tissus plus distants de la plante (Bostock, 2005). Néanmoins, Vlot *et al.* (2008), ont démontré qu'un autre signal lipidique, l'acide jasmonique (jasmonic acid, AJ) semble être impliqué dans les voies de signalisation de cette résistance. En effet, une accumulation de l'AJ et l'expression des gènes en dépendant sont corrélés avec l'induction de la SAR (Truman *et al.*, 2007). La SAR observée chez l'orge et mise en place suite à une infection primaire par *Pseudomonas syringae* pv *japonica* (*Psj*) ou *Xanthomonas translucens* pv *cerealis* (*Xtc*), confère une résistance à une infection secondaire par *Xtc*. Selon Dey *et al.* (2014), cette résistance n'est pas associée à l'accumulation locale ou systémique de l'AS. Elle serait plutôt associée à une accumulation locale non systémique de l'acide abscissique (ABA). En effet, des applications locales de MeJA (methyl ester jasmonic acid) ou ABA ont déclenché une résistance contre *Xtc*. De même, cette résistance n'était pas médiée par NPR1 mais plutôt par deux types de facteurs de transcription de type WRKY et ERF (Ethylene Responsive Factor).

4. Résistances suite à l'interaction plantes-microorganismes du sol

4.1. Résistance systémique induite: ISR

Les microorganismes tels que les PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) ou les PGPF (*Plant Growth-Promoting Fungi*), ont la capacité de moduler la PTI afin de pouvoir coloniser la plante et de déclencher une résistance induite (Zamioudis et Pieterse, 2012). En 1991, différents travaux ont montré, pour la première fois, que la colonisation des racines par des rhizobactéries promotrices de croissance connues sous l'appellation PGPR, stimulait le système

Synthèse bibliographique

immunitaire des plantes en mettant en place une résistance systémique induite ISR (*Induced Systemic Resistance*) (revue Pieterse *et al.*, 2014 ; Van Loon *et al.*, 1998). L'ISR a été observée chez les plantes monocotylédones et dicotylédones en réponse à la présence de PGPR tels que *Pseudomonas*, *Serratia*, et *Bacillus* sp. Cette résistance se révèle bien systémique car l'inoculation des plantes par les rhizobactéries au niveau racinaire permet la protection des parties aériennes *via* l'induction des mécanismes de défense lors d'une attaque ultérieure par un pathogène (Pieterse *et al.*, 2014 ; Van Peer *et al.*, 1991 ; Wei *et al.*, 1991). L'ISR est déclenchée également par des champignons de la rhizosphère (PGPF) comme *Trichoderma* spp. ou *Piriformospora indica* et encore la forme avirulente de *Fusarium* spp. (Segarra *et al.*, 2009 ; Alizadeh *et al.*, 2013 ; Pieterse *et al.*, 2014) et confère une résistance à un large spectre de pathogènes des parties aériennes de la plante (Hossain *et al.*, 2007 ; Pieterse *et al.*, 2014). Dans la littérature, plusieurs souches de *Trichoderma* spp. ont été décrites pour leurs capacités à induire une ISR. La souche T39 de *T. harzianum* induit une résistance systémique contre l'oïdium sur vigne causé par *Erysiphe necator* (Perazzolli *et al.*, 2008) et contre *Botrytis cinerea* sur la tomate et le tabac (De Meyer *et al.*, 1998) (Figure 9).

Contrairement à la SAR, la voie de signalisation de l'ISR n'est pas associée à l'accumulation de l'AS (Pieterse *et al.*, 2000). L'ISR semble plutôt médiée par la voie de signalisation de l'AJ et de l'éthylène (ET) (Pieterse *et al.*, 1998 ; Kloepper *et al.*, 2004 ; Kishimoto *et al.*, 2006 ; Heinen *et al.* 2018). L'utilisation de mutants chez *Arabidopsis thaliana*, dont les voies de signalisation de l'AJ (*jar1-1*) ou de l'ET (*etr1-1*) sont altérées, a permis de démontrer l'implication de ces hormones dans l'ISR (Pieterse *et al.*, 1998 ; van Wees *et al.*, 2000 ; van Loon *et al.*, 2006 ; Pieterse *et al.*, 2014). Toutefois, certaines PGPR semblent capables de déclencher une ISR qui est dépendante de l'AS. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, une souche mutante de PGPR produisant l'AS, a assuré une résistance chez la tomate et le haricot contre *B. cinerea* mais pas chez la tomate NahG transgénique non accumulatrice de l'AS (De Meyer *et al.*, 1999 ; Audenaert *et al.*, 2002). Cette résistance induite dépend du génotype de la plante hôte, du microorganisme inducteur mais aussi du mode de vie de l'agent pathogène (Suty, 2010). En effet, l'ISR semble être efficace contre les bioagresseurs qui sont sensibles aux réactions de défense dépendantes aux voies de l'AJ /ET tels que les agents pathogènes nécrotrophes et les insectes ravageurs (Van Wees *et al.*, 2008 ; Pineda *et al.*, 2010) (Figure 9).

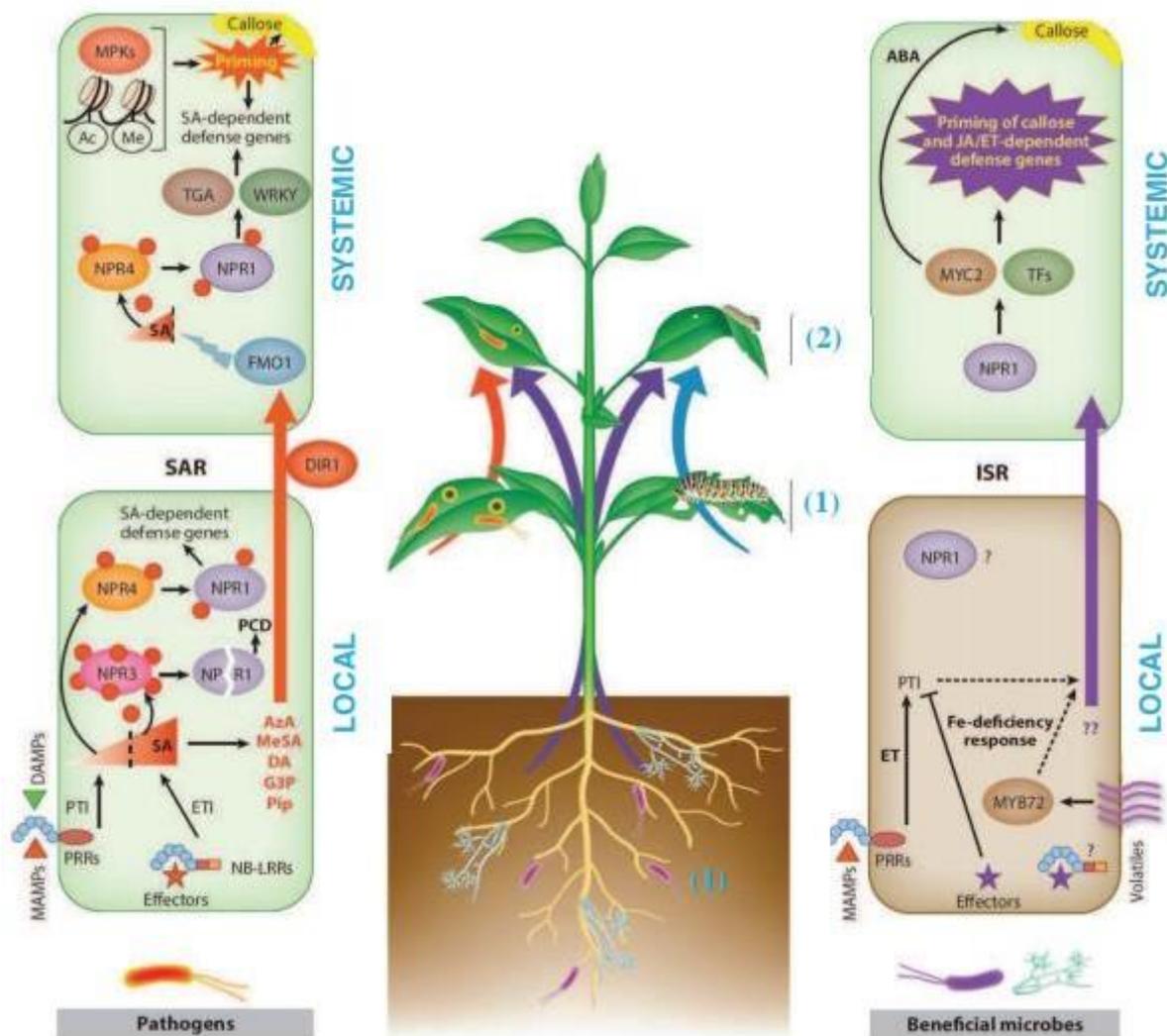


Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans la résistance systémique acquise (SAR) induite par un agent pathogène et la résistance systémique induite (ISR) déclenchée par les microorganismes bénéfiques du sol (Modifié de Pieterse *et al.* (2014)).

4.2. Résistance induite par les champignons mycorhiziens arbusculaires

Les réactions impliquées dans la protection des plantes par les CMA restent peu connues (Basu *et al.*, 2018). Elles ne sont pas reliées uniquement à l'amélioration de la nutrition minérale ou au changement dans la morphologie racinaire de la plante et à la concurrence avec des agents pathogènes pour les carbohydrates, mais elles s'avèrent être également liées à la synthèse des substances biochimiques végétales telles que les composés phénoliques et l'expression de gènes liés à la défense (Feldmann et Boyle 1998 ; Ruiz-Lozano *et al.*, 1999 ; Jung *et al.*, 2012). Les

Synthèse bibliographique

CMA, champignons du sol du sous-phylum *Glomeromycotina* (Spatafora *et al.*, 2016), confèrent à la plante une tolérance aux stress abiotiques et biotiques (Fiorilli *et al.*, 2018).

La résistance induite par les CMA est appelée MIR (mycorrhizal induced resistance) (Pozo et Azcón-Aguilar, 2007), elle est similaire à l'ISR déclenchée par les microorganismes bénéfiques du sol. Cette résistance est bien systémique puisqu'elle est observée au niveau des tissus aériens des plantes mycorhizées (Bruisson *et al.*, 2016). Certains travaux suggéreraient que la protection observée chez les plantes mycorhizées contre des pathogènes du sol serait due à une compétition directe entre le CMA et les organismes phytopathogènes pour la disponibilité des nutriments (Bødker *et al.*, 2002). Cependant, certaines études menées en système des racines séparées (*split root*) ont démontré qu'une résistance systémique contre *Phytophthora parasitica* a bien été observée au niveau du compartiment des racines de tomate non mycorhizée par le CMA *Funneliformis mosseae* (Cordier *et al.*, 1998 ; Pozo *et al.*, 2002). L'induction de la résistance est caractérisée par un épaissement des parois des cellules de l'hôte contenant des pectines non estérifiées, l'accumulation des composés phénoliques, de β -1,3-glucanases ainsi que des protéines de défense PR1a au niveau des racines de tomate non mycorhizées (Cordier *et al.*, 1998 ; Pozo *et al.*, 1999 ; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008). De plus, Fritz *et al.* (2006) ont indiqué que la colonisation des plants de tomate par le CMA réduisait d'une manière significative les symptômes précoces de l'alternariose causée par *Alternaria solani*. Ceci serait dû en partie à un mécanisme semblable à l'ISR (De la Noval *et al.*, 2007 ; Pozo et Azcón-Aguilar, 2007).

Les MAMPs issus des CMA reconnus par la plante déclenchent une MTI (MAMP-Triggered Immunity) et pourraient amorcer des réactions de défenses dépendantes de l'AS (Zamioudis et Pieterse, 2012). L'augmentation de l'activité des enzymes telles que les β -1,3-glucanases et les chitinases, la surproduction des phytoalexines, des composés phénoliques et l'activation de la voie des phénylpropanoïdes au niveau des racines de la plante hôte sont impliqués lors de la MTI déclenchée par les CMA (Cameron *et al.*, 2013). Ces réactions de défense sont efficaces à protéger contre un panel d'agents pathogènes : virus, bactéries, oomycètes, champignons et nématodes (Al-Karaki, 2013 ; Yang *et al.*, 2014, Sun *et al.*, 2018). Plusieurs travaux ont rapporté l'apport de la symbiose mycorhizienne dans la réduction des dommages causés par les agents pathogènes du sol tels que *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Phytophthora* et *Pythium* (Pinochet *et al.* 1996, Whipps 2004, De la Peña *et al.* 2006, Li *et al.* 2006, Elsen *et al.* 2008 ; Vos *et al.*, 2011 ; Vos *et al.*, 2013, Comby *et al.*, 2017). Cependant, ces réactions de

Synthèse bibliographique

défense varient selon les espèces de CMA, la plante hôte, l'agent pathogène et les conditions environnementales (Whipps, 2004 ; Azcón-Aguilar et Barea, 1997).

La mise en place de la symbiose mycorhizienne implique une reprogrammation des fonctions chez les deux symbiotes. Plusieurs mécanismes sont déclenchés lors de la mise en place de la MIR dans des tissus foliaires, tels que l'augmentation des activités de la chitinase, la β -1,3-glucanase, de la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL) et de la lipoxigénase (LOX) dans les feuilles de tomate mycorhizée par *F. mosseae* lors de l'inoculation par *Alternaria solani* (Song *et al.*, 2015). L'induction de l'expression de divers gènes de la plante sont également observées, tels que des gènes codant des protéines impliquées dans la transduction du signal (*OsDUF26* et *OsMPK6*) et la signalisation médiée par le calcium (*OsCBP*, *OsCaM* et *OsCML4*) chez les plantes de riz mycorhizées par *Rhizophagus irregularis* puis infectées par *M. oryzae* (Campos-Soriano *et al.*, 2012).

De plus, la protection obtenue par la MIR semble être fortement dépendante du mode de vie de l'agent pathogène fongique (biotrophe, nécrophe ou hémibiotrophe) (Shaul *et al.*, 1999 ; Fiorilli *et al.*, 2011; Miozzi *et al.*, 2011; Campos-Soriano *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; 2015; Sanchez-Bel *et al.* 2016). En effet, les plantes mycorhizées présentent une protection accrue contre les agents pathogènes foliaires nécrotrophes, tels que *A. solani* et *B. cinerea* chez la tomate colonisée par *R. irregularis* ou *F. mosseae* (Fritz *et al.*, 2006 ; De la Noval *et al.*, 2007; Fiorilli *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015), *Fusarium* sp. chez le fraisier et le lin mycorhizés respectivement par *F. mosseae* et *R. irregularis* (Dugassa *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2010; Sikes 2010) et *Fusarium oxysporum* chez le concombre colonisé par *R. irregularis* ou *Glomus versiforme* (Wang *et al.*, 2012).

Plusieurs travaux ont montré que les effets de la symbiose mycorhizienne sur les maladies foliaires causées par différents pathogènes hémibiotrophes sont partagés et peuvent varier entre une absence de résistance induite à une réduction de la maladie (Lee Song *et al.*, 2005 ; Chandanie *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2010). Concernant les agents pathogènes biotrophes, l'effet des CMA varie d'une augmentation d'incidence de la maladie, à une protection. Ainsi, il a été démontré que l'infection par *Oidium lini* chez les plantes de lin mycorhizées par *R. irregularis* a été plus importante, mais elles ont moins souffert que les plantes non mycorhizées en termes de poids frais des pousses, d'assimilation du CO₂ et de la teneur en saccharose des apex (Dugassa *et al.*, 1996). Dans le cas des plantes de l'orge mycorhizées par *G. etunicatum*, une plus forte sensibilité à l'oïdium a été constatée puisque le taux de sporulation du champignon

Synthèse bibliographique

de l'oidium était deux fois plus important que sur les plantes témoins (Gernns, 2001). A l'inverse, l'inoculation du blé avec *F. mosseae* et *R. irregularis* a réduit le nombre d'haustoria de *B. graminis*, au niveau des cellules épidermiques des feuilles de blé, atténuant ainsi l'apparition des symptômes avec une protection évaluée à 74% et 34% chez les blés inoculés par *F. mosseae* et *R. irregularis* respectivement. En réponse à la mycorhization du blé par ces deux CMA, une accumulation accrue de composés polyphénoliques et de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été observée au niveau des sites d'infection de *Bgt*, soit localement, soit au niveau de la cellule entière en comparaison des plantes non-mycorhizées (Mustafa *et al.*, 2016, 2017) (Tableau 2).

Certaines réponses similaires à celles mises en place lors de l'interaction plante et agent pathogène, ont été rapportées dans le cadre de la symbiose mycorhizienne arbusculaire. Allant de la perception du champignon mycorhizien, à la transduction du signal jusqu'à l'induction des gènes de défenses chez la plante hôte, ces étapes ont été étudiées et les mécanismes de défense qui en découlent augmentent d'une manière transitoire lors de l'interaction CMA-plante hôte (García-Garrido et Ocampo, 2002 ; Zamioudis et Pieterse, 2012). Cependant, les protéines effectrices qui sont émises par le CMA dans le cadre de la symbiose mycorhizienne afin d'atténuer les premières réactions de défenses de la plante restent peu connues. Plett *et al.* (2011) ont souligné le rôle des effecteurs qui semblent être essentiels dans la régulation de la réponse immunitaire des plantes et donc dans l'issue de l'interaction symbiotique. Klopffholz *et al.* (2011) ont démontré, pour la première fois, que lors de l'interaction avec la plante hôte, le CMA *R. irregularis* sécrète une protéine effectrice appelée SP7 au niveau des racines de *Medicago truncatula*, qui interagit avec le facteur de transcription ERF19, fortement induit au niveau du noyau dans les racines infestées par *Colletotrichum trifolii* d'une manière transitoire durant la colonisation du mycorhize. Ce dernier est généralement impliqué dans la régulation des mécanismes de défenses induits en réponse aux applications de l'Ethylène. SP7 interfère donc avec la voie de signalisation de l'ET, une hormone clé dans l'immunité déclenchée par les MAMP (Boutrot *et al.*, 2010 ; Clay *et al.*, 2009). En effet, l'expression constitutive de SP7 dans les racines déjà mycorhizées de *Medicago truncatula* conduit à une mycorhisation plus élevée et une réduction de l'expression des gènes de défense des plantes contre *C. trifolii*. Ces protéines effectrices impliquées dans la symbiose semblent être conservées dans le phylum des *Glomeromycota* (Toro et Brachmann, 2016).

L'initiation de la relation symbiotique entre le CMA et la plante hôte implique des modifications au niveau des gènes, d'hormones et des exsudats racinaires tels que les

Synthèse bibliographique

strigolactones et des lipochito-oligosaccharides qui jouent un rôle clé dans l'activation de la cascade de signalisation des défenses en aval (Mohanta et Bae, 2015). L'induction de la résistance systémique dans les plantes mycorhizées suggère l'implication d'un signal induit par les CMA. Cependant, le mécanisme sous-jacent des réponses de défense mis en place lors de la MIR reste peu connu (Basu *et al.*, 2018 ; Song *et al.*, 2015). Il a été démontré que les plantes de tomate colonisées par *R. irregularis* et *F. mosseae* ont développé une résistance contre *B. cinerea* et *A. solani* en impliquant l'induction de la voie des oxylipines, notamment l'accumulation de l'AJ, avec une nette réduction des teneurs en AS (Sanchez-Bel *et al.*, 2016). Chez les plantes de tomate pré-inoculées par *F. mosseae* et infectées par *A. solani*, une stimulation des activités enzymatiques de la β -1,3-glucanase, la chitinase, la PAL (Phénylalanine ammonia-lyase) et de la LOX (Lipoxygénase) a été enregistrée. Tandis qu'en condition non infectieuse, la symbiose mycorhizienne seule n'a pas induit de modification sur le profil des gènes étudiés.

Hors contexte infectieux, l'inoculation mycorhizienne des plantes de *Medicago truncatula* par *R. irregularis*, est capable d'induire une accumulation des transcrits des gènes codant des protéines impliquées dans les réponses de défense (Liu *et al.*, 2007). Song *et al.* (2015) ont démontré que l'inoculation des plantes de tomate avec *F. mosseae*, ne provoque pas de changement de l'activité enzymatique mais une faible induction des transcrits des gènes codant l'AOC, *PR1* et *PR2*. La MIR aurait un effet de potentialisation ou *priming* qui prépare, localement et de façon systématique, tous les tissus de la plante à une éventuelle infection avec un agent pathogène. Dans le cas d'une potentialisation, les mécanismes de défense se mettent en place uniquement lorsque les plantes sont attaquées par un agent pathogène (Song *et al.*, 2015). L'induction des réponses de défense dans les plantes pré-inoculées par le CMA était plus rapide que celle des plantes non inoculées en présence d'une infection par un agent pathogène (Pieterse *et al.*, 2009 ; Song *et al.*, 2015). Néanmoins, chez le blé pré-inoculé avec *F. mosseae*, une élévation systémique de l'expression de gènes codant des marqueurs de défense tels que la peroxydase (*POX*), une protéine à activité chitinase (*CH11*), *PAL* et *NPR1* est observée dans les feuilles de plants de blé mycorhizés et ce uniquement avant l'infection par *Bgt* (Mustafa *et al.*, 2017). Dans cette étude, les résultats montrent que la mise en place de la MIR s'était traduit par une élévation systémique des défenses de la plante plutôt qu'un effet *priming*. Campos - Soriano *et al.* (2012) suggèrent que la MIR dans le cas de la mycorhization du riz par *R. irregularis* peut avoir une double activité, un effet *priming* ainsi qu'un effet éléveur en induisant l'expression de gènes de défense au niveau des tissus foliaires en l'absence du

Synthèse bibliographique

pathogène. En effet, l'établissement de la symbiose mycorhizienne chez le riz a été marquée par une induction systémique des gènes impliqués dans les réponses de la plante (*OsNPR1*, *OsAP2*, *OsEREBP* et *OsJAmyb*) au niveau des racines. Au niveau des feuilles du riz mycorhizé, des gènes impliqués dans la transduction du signal (*OsDUF26* et *OsMPK6*) et dans le processus de signalisation médiés par le calcium (*OsCBP*, *OsCaM* et *OsCML4*) ont été induits en absence de l'infection. En présence de l'agent pathogène *P. oryzae*, l'inoculation mycorhizienne s'est avérée efficace pour conférer une protection tout en induisant certains gènes liés à la pathogénèse (*OsPRIa*, *OsPR5*, *OsPBZI* et *OsPRI0*). D'après ces résultats, il semble que les gènes jouant un rôle régulateur dans la réponse du riz à l'infection par des agents pathogènes, qui fonctionnent de manière dépendante de l'AS (*OsNPR1*) ou l'AJ (*OsJAmyb*), ainsi que le gène *OsAOC* impliqué dans la biosynthèse de l'AJ, sont tous régulés à la hausse dans les feuilles des plants de riz mycorhizés. Cette étude soulève la possibilité d'une éventuelle modulation de la défense régulée par les mycorhizes et dépendante des voies à la défense l'AS et / ou l'AJ dans les plants de riz.

Cependant, selon Cameron *et al.* (2014), la MIR se distingue de la SAR, elle semble être indépendante de l'AS et serait plutôt médiée par l'AJ. En effet, la MIR partage certaines caractéristiques avec la SAR telle que l'induction de la voie de l'AS mais aussi avec l'ISR, induite par des PGPR, souvent dépendante de la voie de l'AJ (van Wess *et al.*, 2008).

Synthèse bibliographique

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'effet de la colonisation mycorhizienne à arbuscules sur les agents phytopathogènes aériens ((+) : protection, (-) : sensibilité à la maladie et (Ø) : Absence de protection, (nd) : non décrit).

CMA	Agent pathogène Aérien	Nom de la maladie	Plante	Effet	Mécanismes de défense	Références
<i>Funneliformis</i> <i>Mosseae</i>	<i>Cladosporium fulvum</i> (Biotrophe)	Moisissure de la tomate	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	+	Augmentation significative des activités superoxyde dismutase et peroxydase, ainsi qu'une diminution des taux de H ₂ O ₂	Wang <i>et al.</i> (2017)
	<i>Blumeria graminis f.sp. tritici</i> (Biotrophe)	Oïdium du blé	Blé tendre (<i>Triticum aestivum</i> L.)	+	Mise en place de la MIR Surexpression de la <i>POX</i> , <i>CHI1</i> , <i>PAL</i> et <i>NPR1</i>	Mustafa <i>et al.</i> (2016,2017)
	<i>Alternaria solani</i> (Nécrotrophe)	Alternariose	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.)	+	Effet priming Augmentation de l'activité β-1,3-glucanase, chitinase, phénylalanine ammoniac-lyase (PAL) et lipoxygénase (LOX) Accumulation des transcrits des gènes <i>PR1</i> , <i>PR2</i> et <i>PR3</i>	Song <i>et al.</i> (2015)
	<i>Botrytis cinerea</i> (Nécrotrophe)	Pourriture grise	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	+	Augmentation des teneurs en ABA liée à la protection	Fiorilli <i>et al.</i> (2011)
	<i>Alternaria triticina</i> (Nécrotrophe)	Alternariose du blé	Blé (<i>Triticum aestivum</i> L.)	+	nd	Siddiqui et Singh (2005)
	<i>Phytophthora parasitica</i> (Hémibiotrophe)	Mildiou	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	+	Mise en place de la MIR Dépôt de callose, induction de PR1a	Cordier <i>et al.</i> (1998)

Synthèse bibliographique

Suite du tableau						
<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>Phytophthora sojae</i> (Hémibiotrophe) (oomycète)	Pourriture phytophthoéenne	Soja (<i>Glycine max</i>)	+	Libération de H ₂ O ₂ et accumulation d'AJ	Li <i>et al.</i> , (2013)
	<i>Magnaporthe oryzae</i> (Hémibiotrophe)	Pyriculariose	Riz (<i>Oryza sativa</i>)	+	Priming Surexpression des gènes liés à la défense du riz <i>OsNPR1</i> , <i>OsAP2</i> , <i>OsEREBP</i> et <i>OsJAmyb</i>	Campos-soriano <i>et al.</i> , (2012)
	<i>Fusarium oxysporum</i> (Hémibiotrophe)	Flétrissement	Lin (<i>Linum usitatissimum</i> L)	+	Accumulation de phytohormones (auxines, gibberelline-like)	Sikes (2010), Dugassa <i>et al.</i> (1996)
	<i>Alternaria solani</i> (Nécrotrophe)	Alternariose	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	+	nd	Fritz, (2006)
	<i>Podosphaera xanthi</i> (Biotrophe)	Oïdium	Concombre (<i>Cucumis sativus</i>)	∅	nd	Larsen <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Botrytis cinerea</i> (Nécrotrophe)	Pourriture grise	Tabac (<i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>Xanthinc</i>)	-	nd	Shaul <i>et al.</i> , (1999)
<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> . (Biotrophe)	Oidium de l'orge	Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	-	nd	<i>Gernns</i> , (2001)
<i>G. mosseae</i>, <i>G. etunicatum</i>, <i>G. fasciculatum</i>, <i>G. margarita</i>	<i>Phytophthora</i> <i>Capsici</i> (oomycète)	Pourriture du poivron	Poivron (<i>Capsicum</i> spp.)	+	Augmentation significative des activités β-1,3-glucanase et chitinase	Ozgonen et Erkilic (2007), Pereira <i>et al.</i> , (2016) Ozgonen <i>et al.</i> (2009)

5. Réponses cellulaires précoces dans la transduction du signal

Lors d'une interaction plante-agent pathogène, les éliciteurs (PAMPs, DAMPs) sont libérés. La perception de ces éliciteurs est suivie par la mise en place d'une cascade d'évènements de signalisation (Gracia-Burgger *et al.*, 2006). Les réponses cellulaires précoces et tardives conduisent à la transduction du signal d'attaque.

5.1. Flux ioniques

La modification la plus précoce observée et impliquée dans la transduction du signal est liée à une altération de la perméabilité membranaire aux ions. En effet, suite à la reconnaissance de PAMP, la modification des influx/efflux d'ions, mobilisant des transporteurs et des canaux cationiques/anioniques sont observés (Yan *et al.*, 2015) et vont entraîner une dépolarisation rapide et transitoire de la membrane plasmique. Un premier influx de H^+ provoque une augmentation du pH dans le cytoplasme, accompagné par une forte élévation cytosolique de Ca^{2+} . L'accumulation de Ca^{2+} intracellulaire induit l'activation des canaux anioniques au niveau de la membrane plasmique ainsi que l'inhibition de l'entrée de K^+ dans la cellule avec une sortie de Cl^- et de K^+ de la cellule vers l'apoplasme (Yan *et al.*, 2015). Ces flux ioniques agissent dans un délai de 5 min après la perception du PAMP, en amont d'autres événements de signalisation intracellulaire (Steal *et al.*, 2015). Le Ca^{2+} en particulier a un rôle essentiel dans la cascade de signalisation puisqu'il intervient en tant que second messenger et est impliqué dans la majorité des événements de transduction du signal (Ali *et al.*, 2007). La signalisation du Ca^{2+} dépend également des CaM (capteurs intracellulaires de Ca^{2+} comprenant les calmodulines), ainsi que d'un groupe de protéines liées à la CNB (calcineurine B), appelées protéines de type CNB-Like (CBL) (Batistič et Kudla, 2009 ; Tena *et al.*, 2011). Ces protéines sont capables de lier, décoder et relayer le message du Ca^{2+} induisant des interactions protéines/protéines ou cascades de phosphorylation. En effet, Takezawa (1999) a montré le rôle important du Ca^{2+} dans la cascade de signalisation de la MAP kinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) chez les plantes de blé en contrôlant les niveaux des transcrits de la MAPK.

5.2. Phosphorylation et déphosphorylation des protéines

Les protéines kinases MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), présentes dans le cytoplasme et le noyau, participent à différents processus tels que la croissance, le développement cellulaire et les réponses aux différents stress (Pitzschke *et al.*, 2009 ; Gupta et Chakrabarty, 2013 ; Sheikh *et al.*, 2013 ; Danquah *et al.*, 2015; Wang. *et al.*, 2015). Ces protéines kinases, impliquées dans les cascades de phosphorylation, sont conservées de manière évolutive et retrouvées aussi bien chez les insectes, les mammifères que chez les plantes (Nürnbergger *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2017).

La phosphorylation des protéines kinases à Sérine-Thréonine active plusieurs protéines effectrices dans le cytoplasme ou le noyau y compris d'autres kinases, protéines du cytosquelette ou facteurs de transcription en entraînant des changements de leurs localisations et des modifications de leur activité biologique ou de leur durée de vie (Khokhlatchev *et al.*, 1998 ; Xing *et al.*, 2002 ; Rodriguez *et al.*, 2010). Ces cascades impliquent généralement trois sous-familles de protéines kinases qui interagissent de manière séquentielle : les MAPK, les MAPK kinases (MAPKK), les MAPK kinases kinases (MAPKKK) (Hamel *et al.*, 2006 ; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010). D'autres MAPK kinases kinases kinases (MAPKKKK) ont également été identifiées chez les plantes (Colcombet et Hirt, 2008 ; Raja *et al.*, 2017) (Figure 10).

En réponse à un stress, les MAPKKK activent par phosphorylation deux résidus Ser / Thr situés dans la boucle d'activation des MAPKK. Les MAPKK activées déclenchent à leur tour *via* une double phosphorylation les MAPK. Les MAPK transmettent à leur tour le signal (Hamel *et al.*, 2012) et activent en aval l'expression des gènes codant pour des PR-protéines et encore divers mécanismes qui contribuent à la mise en place d'une HR et d'une SAR (Gao *et al.*, 2011). La famille MAPKKK est la plus hétérogène et la plus importante qui agit en amont de la cascade de phosphorylation (Danquah *et al.*, 2014). Les génomes de monocotylédones, tel que riz (*Oryza sativa*) et le maïs (*Zea mays*) contiennent respectivement 75 et 74 gènes MAPKKK (Rao *et al.*, 2010 ; Kong *et al.*, 2013) tandis que chez le blé 155 gènes MAPKKK ont été identifiés (Wang *et al.*, 2016).

Synthèse bibliographique

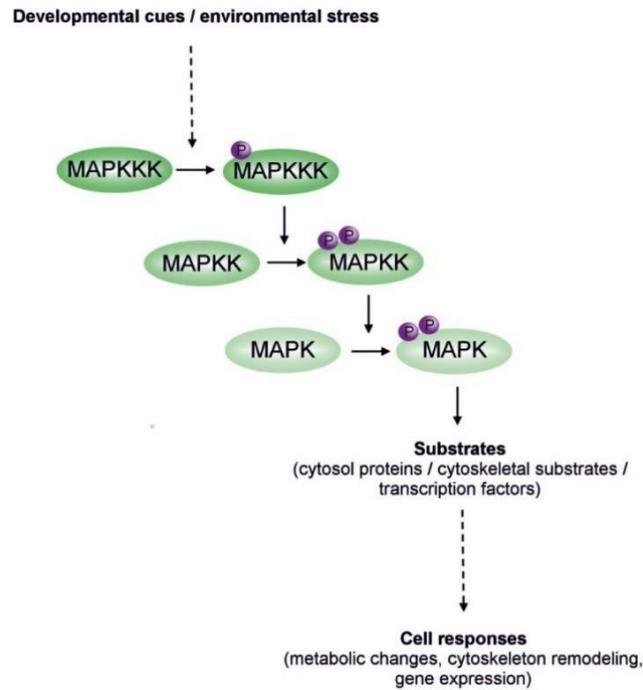


Figure 10 : Cascade d'activation des MAPK en réponse à un stimulus et réponse des cellules suite à l'activation des MAPK. MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases; MAPKK: MAPK-kinase; MAPKKK: MAPKK-kinase (Jagodzick *et al.*, 2018).

Chez la plante modèle, *Arabidopsis thaliana*, près de 110 gènes codant pour ces familles de kinases ont été identifiés. Ils codent pour 20 protéines MAPK, 10 MAPKK et 80 MAPKKK (Colcombet et Hirt, 2008; De Zelicourt *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2017). Les études réalisées sur les MAPKs d'*A. thaliana* se sont focalisées sur les MAPK3, MAPK4 et MAPK6 qui interviennent après la détection de PAMPs (Pitzschke *et al.*, 2009). Après traitement d'une molécule élicitrice dérivée de la flagelline, flg22, la MAPKKK (MEKK1) phosphoryle MKK4 et MMK5 (des MAPKKs) qui sont responsables de l'activation de la MAPK3 et MAPK6 (Ren *et al.*, 2008) avec une activation exacerbée des MAPK3/6 et MAPK4 sur une culture cellulaire d'*A. thaliana* (Droillard *et al.*, 2004).

En 1999, Takezawa a décrit pour la première fois le gène *TaMAPK3* chez le blé, précédemment connu sous le nom de *WCK-1*, gène activé par un éliciteur d'origine fongique. Les MAPK de blé caractérisées en réponse à des stress biotiques et abiotiques, sont MPK 3 et 6 (Rudd *et al.*, 2008 ; Gao *et al.*, 2011 ; Alsaïari, 2012 ; Cevher-Keskin, 2015). Rudd *et al.* (2008) ont identifié *TaMAPK3* comme l'un des gènes codant pour une MAPK chez le blé et ont montré son rôle déterminant dans le déclenchement de la PTI lors de la phase nécrotrophe du cycle de vie de l'agent pathogène hémibiotrophe *Z. tritici*.

Plus récemment, Wang *et al.* (2018) ont souligné le rôle de régulateur positif de MPK4 dans la résistance du blé à *Puccinia striiformis*. En effet, l'infection du blé dont le gène *TaMAPK4* est rendu silencieux, par une souche avirulente de *P. striiformis* induit une accumulation moins importante de SA et de transcrits des gènes codant des protéines PR, TaPR1, TaPR2 et TaPR5 par rapport aux plantes de blé témoins. Toutefois, la famille des protéines kinases bien qu'elle soit impliquée dans les voies de transduction de signaux responsables de nombreux processus biologiques chez les plantes, demeure peu étudiée chez les céréales (Goyal *et al.*, 2018).

5.3. Accumulation des formes activées d'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS)

Les plantes utilisent l'oxygène afin de fournir l'énergie nécessaire à leur développement. Lors de la chaîne respiratoire, la réduction de l'oxygène est accompagnée par la production des radicaux oxygénés. En effet, des molécules hautement réactives, dérivées de l'oxygène sont produites lorsque la réduction est incomplète, parmi lesquelles des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot}), le radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$), le radical peroxy (RO_2^{\cdot}) et le radical alkoxy (RO) ainsi qu'une forme non radicale comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Parmi ces espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS), il existe des formes phytotoxiques telles que l'anion hydroxyle ($l^{\cdot}OH$) et le O_2 . Ce dernier est produit dans l'apoplasme, et peut être converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) (Hammond-Kosack et Jones 1996, Malecka *et al.*, 2001). Comme tous les radicaux libres, les ROS sont délétères et agissent sur la structure des protéines, l'ADN et sur les lipides membranaires. Cependant, elles sont également impliquées dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Baxter *et al.*, 2014; Mittler, 2017; Parent *et al.*, 2008).

En absence de stress, les plantes produisent des ROS en faible quantité au cours du métabolisme aérobie grâce à plusieurs enzymes notamment des NADPH-oxydases (Nicotinanide Adenine Dinucleotide Phosphate), des peroxydases de type III (Camejo *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2006) et l'oxalate oxydase (OXO) chez le blé (Hu *et al.*, 2003). Ces faibles teneurs sont maintenus grâce à une balance pro-oxydant /antioxydant dans laquelle intervient diverses enzymes antioxydantes, telles que les superoxydases dismutases (SOD) (MnSOD ; FeSOD ; Cu/ZnSOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX), et la glutathion peroxydase (GPX) (Benhamou et Rey, 2012a; Parent *et al.*, 2008, Sharma *et al.*, 2012). Il existe aussi un système non-enzymatique regroupant différentes molécules comme la proline, ou des

oligoéléments comme le sélénium, le cuivre ou le zinc qui sont des co-facteurs des enzymes antioxydantes (Benhamou et Rey, 2012a; Mendoza, 2011). Cet équilibre est essentiel pour réguler les voies métaboliques de la plante et assurer les processus cellulaires (Czarnocka et Karpiński, 2018). Lors d'un stress, une accumulation de ROS, liée à l'apparition d'un « déséquilibre » du ratio ROS/ enzymes antioxydantes en faveur des ROS, est constatée. Dans le cadre d'une ETI (résistance génétique), cette accumulation importante est appelée burst oxydatif ou stress oxydant (Benhamou et Rey, 2012). Il se présente comme un acteur essentiel de l'immunité qui conduira en particulier à la régulation de l'expression de gènes de défense (Benhamou et Rey, 2012; Bolwell, 1999; Mittler 2017; Torres *et al.*, 2006) (Figure 11).

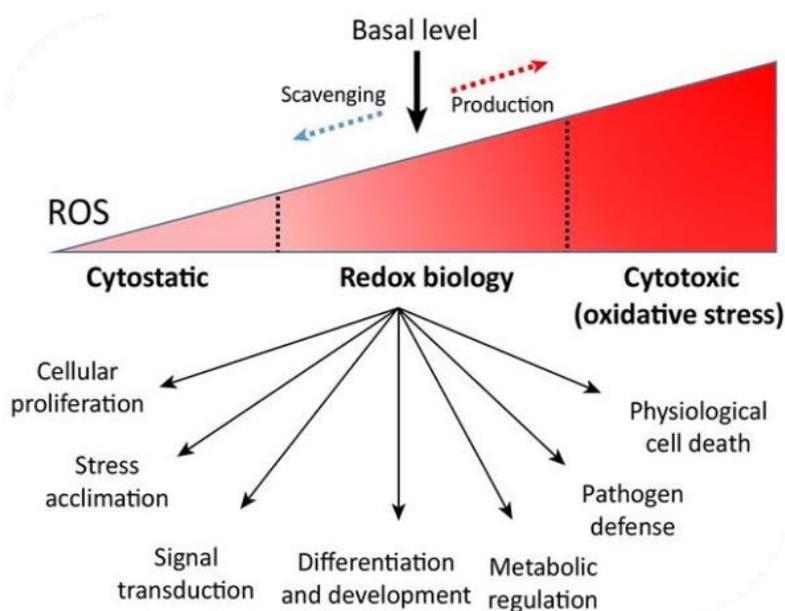


Figure 11 : Les différents seuils et effets des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mittler, 2017).

Lors de la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante, les ions relâchés dans l'apoplasme (K^+) contribuent à l'alcalinisation du milieu extracellulaire et favorisent la production d' H_2O_2 par la cellule végétale. Les taux élevés des ROS apoplasmiques, médiés par des enzymes membranaires NADPH oxydases et des peroxydases, sont généralement atténués avant qu'ils n'atteignent le noyau (Torres et Dangl, 2005 ; Suzuki *et al.*, 2011 ; Mittler 2017). Le H_2O_2 agit souvent comme un signal transducteur pour déclencher des réponses en aval (Wrzaczek *et al.*, 2013 ; Baxter *et al.* 2014 ; Camejo *et al.*, 2016). En effet, la propagation sous forme de 'vagues' des signaux ROS est similaire à celle rapportée pour le Ca^{2+} (Mittler *et al.*, 2011 ; Suzuki *et al.*, 2013 ; Toyota *et al.*, 2018 ; Fichman *et al.*, 2019). Des chercheurs ont démontré qu'un peptide

Synthèse bibliographique

éliciteur de la flagelline, flg22, connu pour activer les MAPK, la phosphorylation de diverse protéines membranaires (canaux ioniques...), des protéines kinases ou des protéines phosphatases, induit également dans un délai de 5 à 10 min d'exposition la RBOHD (Respiratory burst oxydase homologue protein D), une NADPH oxydase calcium-dépendante, dans des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* (Benschop *et al.*, 2007).

Les ROS, et particulièrement le H₂O₂, sont également connus pour avoir un effet antimicrobien direct sur l'agent pathogène. Ils peuvent également ainsi inhiber directement la germination des spores de nombreux agents pathogènes (Low et Merida, 1996 ; Lamb et Dixon, 1997). De plus, les ROS participent au renforcement des barrières physiques de défense au niveau de la paroi de la cellule végétale par pontages oxydatifs de protéines et de glycoprotéines comme les HRGPs (glycoprotéines structurales riches en hydroxyproline) ou par l'oxydation de polysaccharides et de composés phénoliques (Lamb et Dixon, 1997 ; Mellersh *et al.*, 2002; Mendoza, 2011) (Figure 11).

Les ROS interviennent dans les réactions de défense et voies de signalisation en aval de leur synthèse (Foyer *et al.*, 2005). En effet, les signaux de ROS peuvent se propager du tissu stimulé aux tissus systémiques non stimulés (Mittler *et al.*, 2011). Le H₂O₂ est capable de traverser les canaux aqueux de la membrane plasmique et par la suite d'oxyder des protéines à distance de son site de synthèse conduisant ainsi à une modification des flux ioniques, la phosphorylation des protéines, l'expression de gènes de défense et de la mise en place de la mort cellulaire programmée (programmed cell death ou PCD) lors de la HR (Low et Merida 1996, Agrios, 2005 ; Miller *et al.*, 2010 ; Benhamou et Rey, 2012) et la réponse systémique acquise (SAR) (Parent *et al.*, 2008). En effet, les signaux systémiques de ROS font partie d'un réseau de signalisation important qui coordonne les réponses physiologiques et moléculaires entre différentes parties distales de la plante (Devireddy *et al.*, 2018) (Figure12).

Une étude récente sur blé a démontré que les ROS étaient impliqués dans la PCD chez le blé infecté par l'oïdium accompagnée d'une accumulation de l'AS (Cheng-yang *et al.*, 2018). Xiao *et al.* (2013) ont observé une activation plus importante des voies conduisant au burst oxydatif chez un cultivar sensible par rapport à un cultivar résistant pendant la phase nécrotrophe de *F. graminearum*. A l'inverse, Shetty *et al.* (2003) ont montré que l'infection d'un cultivar résistant du blé par un champignon hémibiotrophe, *Zymoseptoria tritici* était accompagnée par une forte et précoce accumulation d'H₂O₂ pendant la phase biotrophe. Cette réaction, observée dans le cadre d'une réaction incompatible, n'était pas retrouvée lors d'une réaction compatible chez un cultivar sensible.

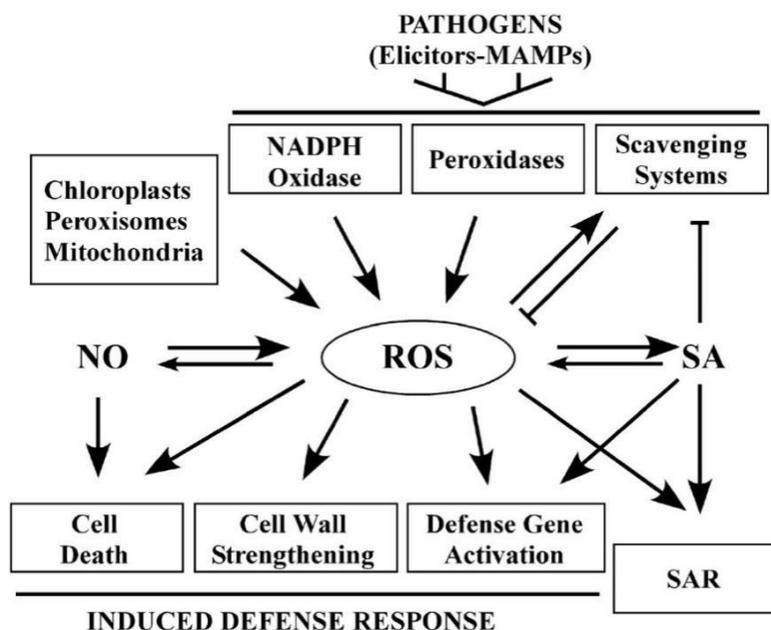


Figure 12 : Production et implication des espèces réactives de l'oxygène dans les mécanismes de défense des plantes (Torres *et al.*, 2006).

Bien que l'accumulation des ROS a principalement été décrite dans de nombreuses études se focalisant sur les interactions entre plantes et agents pathogènes, elle a été également observée plus récemment lors d'interactions de plantes avec des organismes non-pathogènes de type symbiotiques et plus largement bénéfiques, CMA et bactéries PGPR (Torres, 2010). En effet, lors de l'association mycorhizienne, les ROS sont considérés comme des messagers secondaires de ce type d'interactions (Garcia-Garrido et Ocampo, 2002). Li *et al.* (2013) ont observé une libération de H_2O_2 en parallèle à la stimulation des activités antioxydantes dans les feuilles de soja dont les racines étaient colonisées par *R. irregularis*.

6. Voies de signalisation intercellulaires

Les phytohormones sont des messagers chimiques essentiels à la régulation des processus biologiques de la plante tels que la croissance et le développement mais également les mécanismes de défense en réponse à des stress biotiques (Bari et Jones, 2009). En effet, les plantes sollicitent des réseaux hormonaux complexes pour relayer les stress biotiques et reprogrammer leur métabolisme de croissance (primaire) vers des réponses de défense (secondaire) (Heitz, 2019). L'attaque par un agent pathogène met en place une cascade de réactions entraînant des modifications hormonales et par la suite, module l'expression des gènes liés à la défense (Adie *et al.*, 2007 ; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007 ; Denancé *et al.*, 2013 ;

Synthèse bibliographique

Heitz, 2019). Trois voies de signalisation sont particulièrement impliquées dans ces interactions, chacune liée à une phytohormone : la voie de l'acide salicylique (AS), la voie de l'acide jasmonique (AJ), et la voie de l'éthylène (ET) (Yang *et al.*, 2013 ; Dar *et al.*, 2015).

D'autres phytohormones plutôt associées à la croissance de la plante, telles que les auxines, l'acide gibbérellique (GA), les cytokinines, les brassinostéroïdes ainsi qu'une hormone de stress l'acide abscissique (ABA), pourraient également être impliquées dans le contrôle des mécanismes de défense des plantes (Pieterse *et al.*, 2009, 2012) bien que leurs contributions soient peu détaillées. Ces phytohormones peuvent agir seules ou en combinaison avec l'AS, l'AJ et ou l'ET (Kazan et Lyons 2014 ; Torres-Vera *et al.*, 2014). Les trois hormones principales du stress (AS, AJ et ET) sont impliquées dans des voies de signalisation menant à des réponses de défense de la plante adaptées au mode de vie de l'agent pathogène, que ce dernier soit biotrophe, hémibiotrophe ou nécrotrophe (Bari et Jones, 2009). En général, les mécanismes de défense efficaces contre les agents pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes sont induits par la voie de signalisation de l'AS. A l'inverse, les réponses de défense efficaces contre les agents pathogènes nécrotrophes semblent majoritairement dépendre de la voie de signalisation faisant intervenir l'AJ et l'ET (Glazebrook 2005 ; Van der Ent *et al.*, 2009 ; Pieterse *et al.*, 2012) (Figure 13).

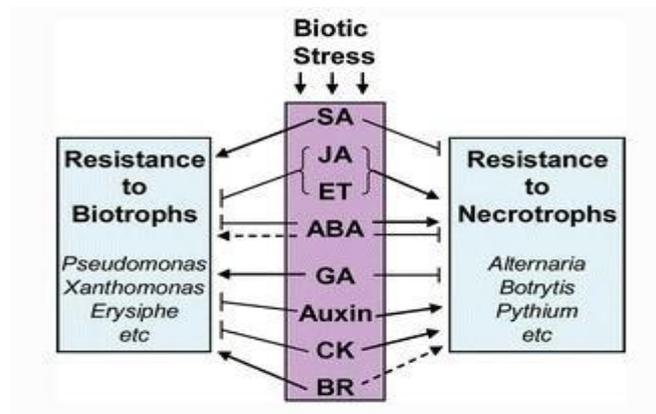


Figure 13 : Implication de différentes hormones dans la régulation positive ou négative de la résistance des plantes à divers agents pathogènes biotrophes et nécrotrophes. Les flèches indiquent une activation ou une interaction positive et les lignes bloquées indiquent une interaction négative ou une inhibition (Bari et Jones 2009). SA : acide salicylique, AJ : acide jasmonique, ET : éthylène, ABA : acide abscissique, GA : acide gibbérellique, AUX : auxines, BR : brassinostéroïdes, Cks : cytokinines.

6.1. L'acide salicylique (AS)

L'acide salicylique (2-hydroxy benzoic acid) est un dérivé aromatique qui joue un rôle crucial dans la mise en place de la résistance (PTI et ETI) contre les agents pathogènes biotrophes (Glazebrook, 2005). L'accumulation d'AS est souvent observée au niveau du site de l'infection mais aussi dans des tissus distants du site d'infection. Elle est aussi associée à la mise en place de la HR avec une surexpression des gènes PR et l'induction d'une résistance systémique acquise (SAR) (Nawrath et Métraux, 1999 ; An et Mou, 2011).

La biosynthèse d'AS, composé phénolique, débute par l'accumulation d'acide chorismique, produit à partir de l'acide shikimique (Lefevre *et al.*, 2020). Deux voies de biosynthèse sont possibles : la voie de la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL) et la voie de l'isochorismate synthase (IC) (Vidhyasekaran, 2015, Maruri-López *et al.*, 2019) (Figure 14).

Dans le deuxième cas, la biosynthèse de l'AS a lieu au niveau des chloroplastes par la voie de l'IC. En effet, le chorismate est transformé en isochorismate grâce à une isochorismate synthase (ICS). L'isochorismate est ensuite transformé en AS par une isochorismate pyruvate lyase (Per *et al.*, 2017). L'AS, une fois synthétisé, est exporté vers le cytosol (Fragnière *et al.*, 2011).

La deuxième voie de la production de l'AS, plus complexe que celle de l'IC, se fait dans le cytosol par le biais de la voie des phénylpropanoïdes grâce à une mutase. La PAL convertit la phénylalanine (Phe) en acide transcinnamique (tCA). A son tour le tCA est transformé en acide ortho-coumarique et benzaldéhyde. Ce dernier est transformé par l'enzyme aldéhyde oxydase (AAO) en acide benzoïque (BA). Ensuite, BA est converti en AS par une hydroxylase (BA2H). Une fois produit, l'AS peut être modifié par glucosylation ou méthylation afin d'être stocké sous ses formes inactives : le salicyloyl glucose ester (SGE), le SA O- β -glucoside (SAG), le méthyl salicylate (MeSA) et le méthyl salicylate O- β -glucoside (MeSAG) (Klessig *et al.*, 2018 ; Maruri-López *et al.*, 2019).

L'AS produit dans le chloroplaste passe au cytosol par le biais des transporteurs EDS5. Il est ensuite glycolysé par une UDP-glucose SA-glucosyltransferase et transféré dans les vacuoles par des transporteur ABC / d'antiporteur H^+ pour être stocké sous sa forme inactive (SAG). Ensuite, l'AS est hydrolysé sous l'action d'une AS-glucosidase. Il retrouve sa forme active et ensuite réparti dans toute la plante pour participer à la SAR et ainsi qu'au niveau du tissu infecté (Per *et al.*, 2017 ; Maruri-López *et al.*, 2019).

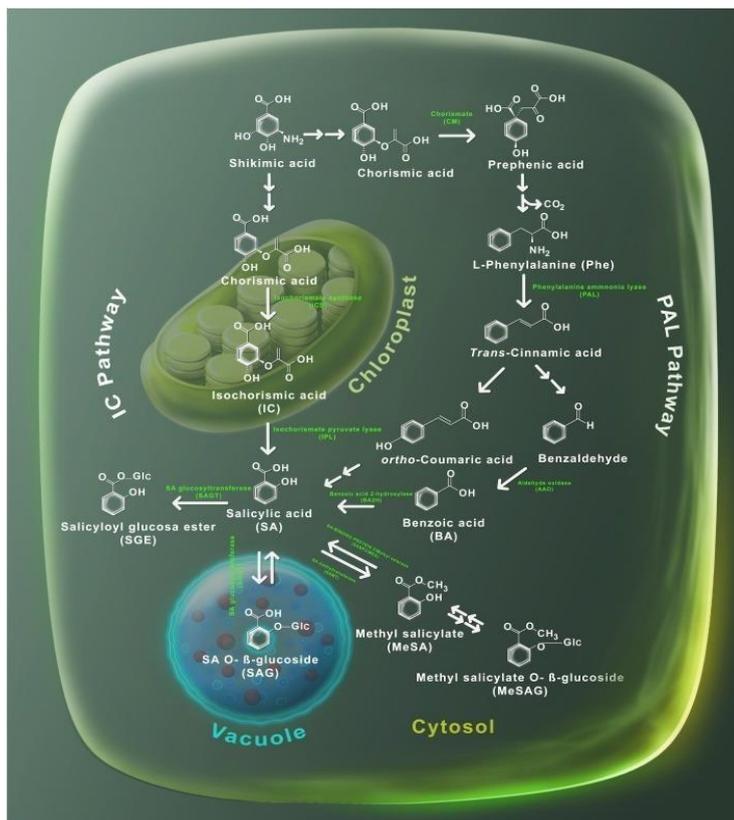


Figure 14 : Voies de la biosynthèse de l'AS. Les plantes utilisent deux voies pour produire de l'AS, la voie de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et la voie de l'isochorismate (IC) (Maruri-López *et al.*, 2019).

6.2. L'acide jasmonique (AJ)

L'acide jasmonique, appartenant au groupe des oxylipines, est connu pour son rôle dans la régulation de la croissance et du développement de la plante ainsi que dans les mécanismes de défense en réponse aux stress biotiques et abiotiques (Schaller et Stintzi, 2009). La biosynthèse de cette hormone est mieux décrite chez les dicotylédones tels que *A. thaliana* et le tabac que chez les monocotylédones comme le riz, le maïs ou le blé (Lyons *et al.*, 2013 ; Lui *et al.*, 2016).

La biosynthèse de l'AJ et de ses métabolites s'effectue successivement dans les chloroplastes et les peroxysomes *via* la voie des octadécanoïdes (également appelée voie des lipoxygénases). La lipoxygénase impliquée dans la production de l'AJ est la LOX 13. Elle permet l'oxygénation de l'acide linoléique pour former l'acide 13(S)-hydroxy linoléique (13-HPOT). Ce dernier est converti en acide 12-oxophytodienoïc (OPDA) sous l'action des deux enzymes, l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC). Ensuite, l'AJ est formé à partir de 12-OPDA et du dn-OPDA par une β -oxydation multiple dans le peroxysome. L'AJ peut aussi être modifié

Synthèse bibliographique

par méthylation (par la JA carboxyl MethylTransferase : JMT) afin d'obtenir un dérivé méthylé important, le jasmonate de méthyle (MeJA) (Seo *et al.*, 2001 ; Dar *et al.*, 2015). L'acide 12-hydroxyjasmonique (12-OH-JA) et la jasmonoyl-isoleucine, résultante de la combinaison de l'AJ – et l'isoleucine (AJ – Ile), sont formés à partir de l'AJ dans le cytoplasme. Suite à une infection, l'AJ est transformé en AJ-Ile par une enzyme GH3 appelée JA-conjugate synthase (JAR1) (Dar *et al.*, 2015). Cette combinaison AJ – Ile représente la forme biologique active de JA dans les plantes (Fonseca *et al.*, 2009 ; Wasternack et Strnad, 2016). Une fois l'AJ – Ile, générée, elle favorise l'interaction entre la protéine de type F-box CORONATINE INSENSITIVE1 COI1 et JAZ. Une fois que le complexe AJ – Ile/ COI1/ JAZ va se fixer au répresseur JAZ1, les facteurs de transcription vont être libérés et permettront ainsi l'expression des gènes cibles de l'AJ (Heitz, 2019 ; Ruan *et al.*, 2019) (Figure 15).

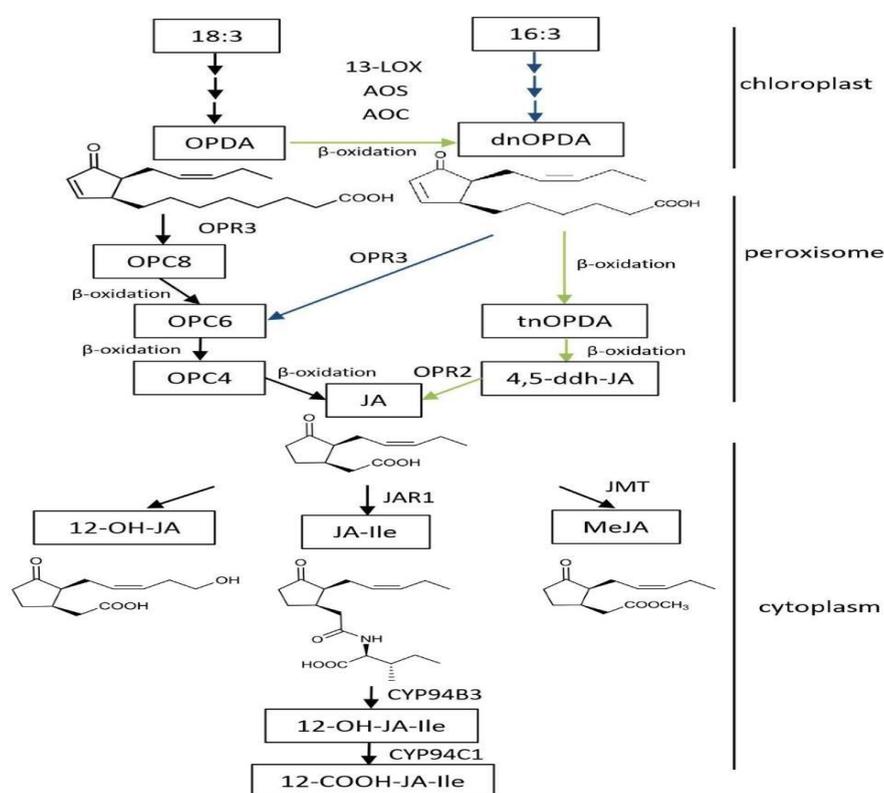


Figure 15 : Voies de biosynthèse des jasmonates chez *Arabidopsis thaliana* (Ruan *et al.*, 2019). Les enzymes et les intermédiaires sont indiqués comme suit: LOX : lipoxygénase, AOS : allène oxyde synthase, AOC : allène oxyde cyclase, OPR3 : OPDA réductase, JAR1 : jasmonate résistant 1, JMT : JA carboxyl méthyltransférase; 18: 3 : l'acide α -linoléique, 16: 3 : l'acide hexadécatriénoïque, OPDA : l'acide 12-oxo-phytodiénoïque, dnOPDA : l'acide dinor-12-oxo-phytodiénoïque, OPC8 : 8- (3-oxo-2- (pent- Acide 2-ényl) cyclopentyl) octanoïque, OPC6 : acide 6- (3-oxo-2- (pent-2-ényl) cyclopentyl) hexanoïque, OPC4 : 4- (3-oxo-2- (pent-2-ényl) acide cyclopentyl) butanoïque, tnOPDA : tetranor-OPDA, 4,5-ddh-JA : 4,5-didehydrjasmonate, JA : acide jasmonique, JA-Ile : jasmonoyl-L-isoleucine et MeJA : jasmonate de méthyle.

Synthèse bibliographique

En absence d'AJ – Ile, les gènes de défenses sont maintenus silencieux grâce aux protéines jasmonates (des protéines répressives) du domaine ZIM (JAZ). Ces JAZ, marquées par l'ubiquitine et destinées à la dégradation par le protéasome 26S, agissent comme des répresseurs de la voie de transduction de l'AJ en bloquant les facteurs de transcription (Chini *et al.*, 2007 ; Thines *et al.*, 2007 ; Yan *et al.*, 2007). La protéine NINJA (*NOVEL INTERACTOR OF JAZ*) interagit avec le domaine ZIM. Elle s'associe au corépresseur TPL (*TOPLESS*) grâce à des motifs appelés EAR (*ERF-ASSOCIATED AMPHIPHILIC REPRESSION*) afin d'empêcher l'activation précoce de la voie de l'AJ (Pauwels *et al.*, 2010 ; Kazan, 2006) (Figure 15).

Deux voies majeures interviennent en aval dans la signalisation de l'AJ impliquant deux régulateurs transcriptionnels clés : la voie ERF, associée à la résistance contre les agents pathogènes nécrotrophes, et la voie MYC, associée à la réponse d'une blessure et contre les envahisseurs herbivores (Pieterse *et al.*, 2012). Les facteurs de transcription de AP2/ERF (*APETALA2 / ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR*) déterminent l'expression du gène marqueur PDF1.2 (*PLANT DEFENSIN1.2*) et interviennent dans la voie ERF. La voie MYC est médiée par les facteurs de transcription de type MYC qui régulent la transcription de *VSP2* (*Vegetative Storage Protein 2*), un gène marqueur de la voie de l'AJ. En résumé, l'interaction de JAZ, COI1 et JA-Ile conduit à la dégradation des protéines JAZ, MYC2 libéré à son tour active l'expression des gènes en aval (Gális *et al.*, 2009) (Figure 16).

En absence de stress, les protéines JAZ agissent comme des répresseurs de la signalisation JA en se fixant sur des régulateurs positifs comme MYC2, 3, 4. Chez *Arabidopsis*, 12 protéines JAZ ont été rapportées. Tandis que, le riz en contient 15, le sorgho et le maïs comprennent 16 et 23 gènes codant pour JAZ, respectivement (Ye *et al.*, 2009 ; Chung *et al.*, 2010) (Figure 16).

Des mutants *JAR1* d'*Arabidopsis* ont présenté une sensibilité accrue à *Pythium irregulare*. En effet, les gènes de défense, y compris le gène codant une VSP, étaient faiblement exprimés chez les plantes mutantes comparées aux plantes sauvages (Staswick *et al.*, 1998). De même chez le riz où deux gènes codant pour les enzymes GH3 de type *JAR1*, *OsJAR1* et *OsJAR2*, sont connus et présentent des schémas d'expression différents en réponse à différents stress (Wakuta *et al.*, 2011). Cependant, il a été démontré que la formation de JA-Ile induite par *Magnaporthe grisea* est médiée seulement par l'activité du *OsJAR1* (Zhang *et al.*, 2018). La voie de signalisation de l'AJ, régulée par COI1-JAZ, est fondamentale pour la défense des plantes contre les agents pathogènes. En effet, la région C-terminale des récepteurs JAZ contenant le domaine JAS (*JA-associated*) est nécessaire et déterminante à l'interaction avec COI1 (Katsir *et al.*, 2008b).

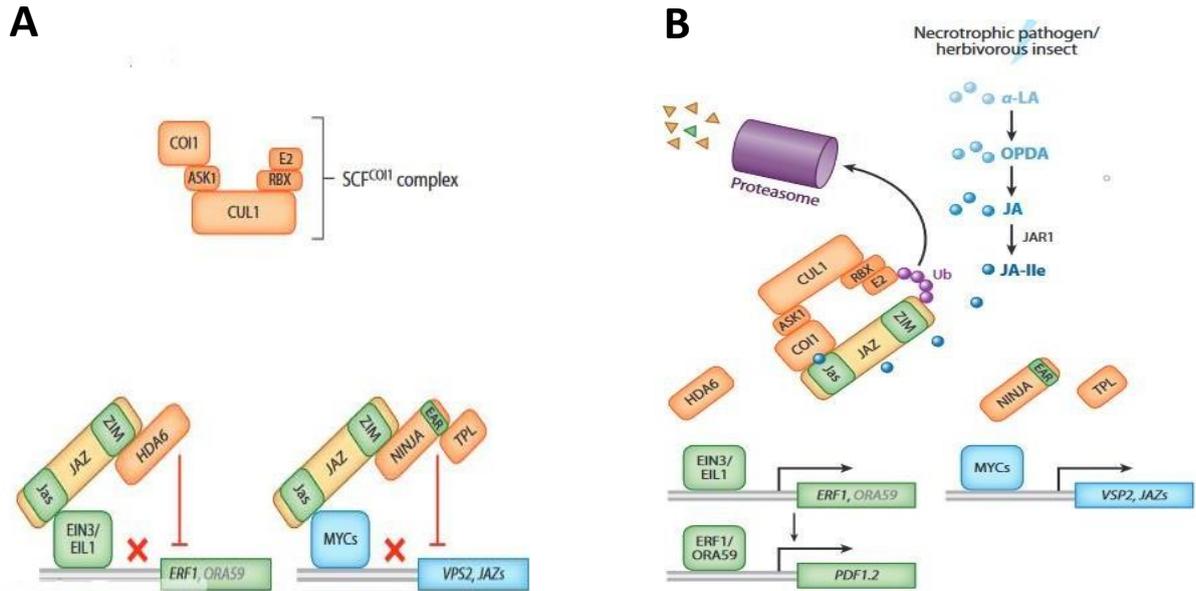


Figure 16 : Voie de signalisation de l’AJ au niveau (a) d’une cellule non stimulée et (b) une cellule suite à l’attaque par un agent pathogène (Pieterse *et al.*, 2012). (Les flèches pleines indiquent les activités établies ou l’accumulation de composés, les lignes et croix indiquent la répression de la transcription).

6.3. L’éthylène

L’éthylène (ET) est une hormone volatile secrétée lors de différentes interactions plantes-agents pathogènes. La synthèse de ce gaz (C_2H_4) se fait en trois étapes enzymatiques à partir de la méthionine. Cette dernière est convertie en S-Adénosine-L-Méthionine (S-AdoMet) par une S-adénylméthionine (SAM) synthase au détriment d’une molécule d’ATP. Le S-AdoMet est transformé en 1- aminocyclopropane-1-acide carboxylique (ACC) suite à l’action d’une ACC synthase (ACS), une enzyme clé de la voie de biosynthèse de l’éthylène (Muday *et al.*, 2012). Enfin, l’ACC est oxydé par une ACC oxydase (ACO) pour libérer l’éthylène (Houben et Van de Poel, 2019) (Figure 17).

Synthèse bibliographique

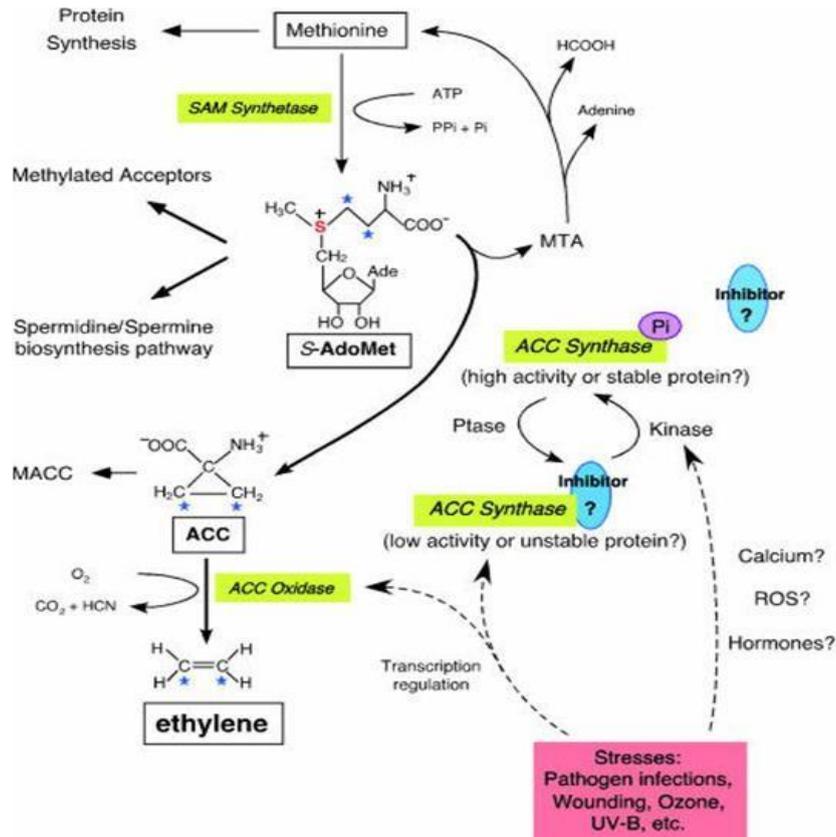


Figure 17 : Voie biosynthétique et régulation de l'éthylène (Wang *et al.*, 2002). ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, MACC : malonyl-ACC ; MTA : 5' -methylthioadénosine ; ROS : formes actives de l'oxygène, SAM : S- AdoMet.

L'éthylène chez *Arabidopsis* est médié par cinq récepteurs, situés au niveau du réticulum endoplasmique appelés ETR1, ETR2 (ETHYLENE RESPONSE 1 & 2), EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4), ERS1 et ERS2 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 & 2) (Chang *et al.*, 1993 ; Schaller et Bleecker, 1995 ; Hua et Meyerowitz, 1998 ; Sakai *et al.*, 1998). Des mutations dans l'un de ces récepteurs peut empêcher la liaison à l'ET, la plante devient donc insensible à l'Ethylène. La signalisation par l'ET débute au niveau des récepteurs ETR1, ERS1, ETR2, EIN4 et ERS2, la protéine kinase à sérine/ thréonine de type *Raf-like* CTR1 (Constitutive Triple Response 1) et la protéine transmembranaire EIN2, une fois activées elles régulent les facteurs de transcription EIN3, EIL1 et EIL2. Ces derniers activent à leur tour d'autres facteurs tels que les ERF qui induisent des réponses liées à l'ET (Binder, 2020) (Figure18).

Synthèse bibliographique

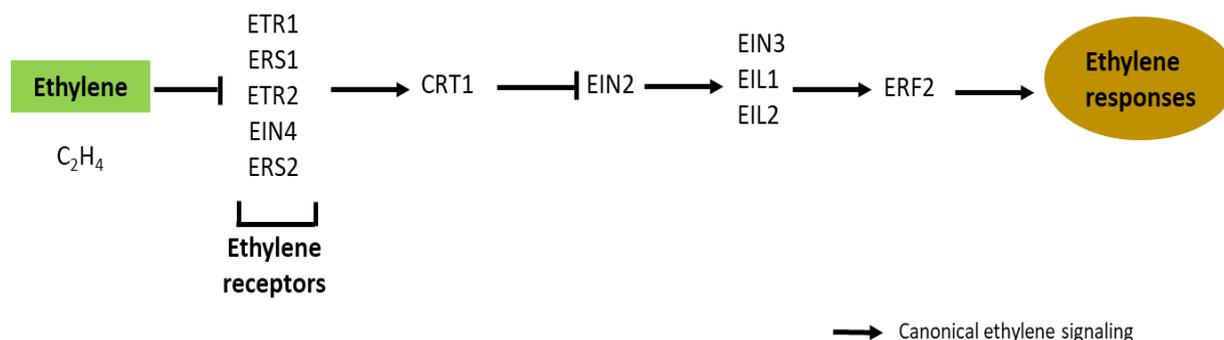


Figure 18 : Modèle de signalisation de l'éthylène chez *Arabidopsis thaliana* (Binder, 2020).

Il a été démontré que les Raf-kinases agissent dans les cascades de signalisation des protéines activées par les MAPK (Peleg et Sanghera, 1992). Le traitement par flg22 déclenche la biosynthèse de l'ET *via* la phosphorylation de l'ACS par MPK6 (Liu et Zhang, 2004). Ce dernier agit avec ERF104, un facteur de transcription agissant comme un régulateur positif de l'ET (Bethke *et al.*, 2009).

Le facteur de transcription EIN3 régule les voies de la photosynthèse ainsi que l'expression des gènes cibles tels que *ORA59* et *ERF1* impliqués dans la réaction de défense des plantes contre les agents pathogènes nécrotrophes (Riechmann *et al.*, 2000 ; Pre *et al.*, 2008). En effet, *ERF1* et *ORA59* sont impliqués dans les deux voies de signalisation de l'AJ et de l'ET ainsi que dans la régulation de l'expression du gène *PDF1.2* (Lorenzo *et al.*, 2004). La voie de l'ET est impliquée dans la stimulation des protéines PR (Martinez *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis*, la surexpression de *ERF1* a renforcé la résistance contre les champignons nécrotrophes *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *B. cinerea* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002 , 2004). Cependant, l'activation des réponses liées à l'ET et la surexpression de *ERF1* a augmenté la sensibilité contre la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC3000* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Zhu *et al.* (2014) ont montré que le blé transgénique surexprimant *TaPIE1* (*Triticum aestivum* Pathogen-Induced ERF1 ethylene response factor 1) possède une résistance améliorée contre le champignon nécrotrophe *Rhizoctonia cerealis* contrairement aux plantes de blé sous-exprimant le même gène. De même, la surexpression de *TaPIE1* a conféré une résistance significativement accrue contre l'agent pathogène hémibiotrophe *Bipolaris sorokiniana* chez le blé transgénique (Dong *et al.*, 2010). L'ET peut donc avoir un impact négatif ou positif sur la résistance aux maladies en fonction du mode de vie des agents pathogènes (De Vleeschauwer *et al.*, 2013). Il est admis que les réponses induites par l'ET sont déclenchées suite à une blessure, un traitement par une PGPR ou suite à une infection par un agent pathogène (Lorenzo

et al., 2003 ; Broekaert *et al.*, 2006 ; Mersmann *et al.*, 2010 ; Gouws *et al.*, 2012 ; Wen, 2015). L'ET a été défini comme un facteur de l'établissement de la PTI et un régulateur négatif des réponses SA-dépendantes. En effet, Il existe de nombreuses interactions antagonistes ou synergiques entre les voies de signalisation de l'AS, l'AJ et l'ET (Glazebrook, 2001; Melotto *et al.*, 2006). De plus, suite à l'infection par un agent pathogène qui induit la voie ERF et la répression de la voie MYC, l'ET conditionne les réponses de l'AJ et la production simultanée de l'ET et l'AJ.

7. Les réponses de défense tardives

Les cascades de signalisation mis en place par la plante après la perception d'un agent pathogène induisent l'expression de gènes de défense, nécessaire à l'établissement des réponses tardives telles que l'accumulation de métabolites secondaires, de protéines PR pour contrecarrer l'invasion de l'agent pathogène.

7.1. Renforcement de la paroi cellulaire

La paroi des cellules végétales présente la première ligne de défense et forme une barrière physique à la pénétration des bioagresseurs. Cependant, de nombreux champignons pathogènes peuvent adhérer aux surfaces cellulaires de la plante grâce à leur appressorium fongique et les traverser par hydrolyse enzymatique ou simple pression mécanique. Afin d'empêcher l'avancée de l'agent pathogène, les plantes ont mis en place un mécanisme qui vise à modifier la structure et à renforcer la paroi. Le renforcement pariétal résulte d'une réorganisation structurale et chimique grâce à l'incrustation des molécules polysaccharidiques telles que la callose, la lignine et des divers composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, des protéines et des glycoprotéines structurales telles que les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs) (Benhamou et Rey, 2012).

7.1. a La callose

La compréhension des rôles des papilles callosiques dans le cadre de l'interaction plante-agent pathogène permet de fournir une meilleure description des cibles génétiques de la résistance contre certaines maladies du blé, riz, orge, maïs et sorgho (Fincher *et al.*, 2020). Lors d'une attaque de la plante par un agent pathogène, un dépôt de callose est généralement observé au niveau du point de l'infection (Stone et Clarke, 1992 ; Voigt et Somerville, 2009). La callose

Synthèse bibliographique

constitue ainsi une barrière physique à la pénétration de l'agent pathogène (Aist *et al.*, 1991 ; Voigt et Somerville, 2009). Les appositions callosiques nommés papilles contiennent comme principal composant polysaccharidique le β -1,3-glucane (Jacobs *et al.*, 2003).

Ces dépôts sont contrôlés par la voie de l'AS (Voigt et Somerville, 2009). La callose est considérée comme un marqueur de défense en réponse aux PAMPs (Aspinall et Kessler, 1957 ; Brown *et al.*, 1998 ; Gomez-Gomez *et al.*, 1999). En effet, elle est synthétisée *de novo* en réponse à une attaque d'un agent pathogène (Skou *et al.*, 1984 ; Enkerli *et al.*, 1997 ; Verma et Hong, 2001). La callose est produite par des callose synthases, des enzymes de la membrane plasmique codées par les gènes *CalS* (Callose Synthase) ou *GSL* (Glucan Synthase-Like) (Lepoivre, 2003 ; Ellinger *et al.*, 2013). Il a été démontré chez *Arabidopsis*, que les gènes *GSL5/PMR4/CALS12* codant pour une callose synthase, contrôlent la production de la callose au niveau des papilles en réponse à des agents pathogènes (Chen et Kim, 2009). Aucun dépôt de callose n'a été observé chez des mutants *PMR4* (*POWDERY MILDEW RESISTANT 4*) après traitement avec flg22. En revanche, la surexpression de *PMR4* chez *Arabidopsis* a induit un dépôt élevé et précoce de callose aux sites d'infection et une résistance complète à la pénétration de *Golovinomyces cichoracearum*, agent pathogène responsable de l'oïdium (Ellinger *et al.*, 2013). De même, la surexpression du gène *PMR4* d'*A. thaliana* introduit chez l'orge transformé par une GFP (*Hordeum vulgare*) a entraîné une résistance complète et accrue contre *B. graminis* f. sp. *hordei*. De plus, il a été démontré que le traitement d'un cultivar de blé sensible avec des fragments purifiés des parois cellulaires de *Z. tritici* a protégé le cultivar de blé contre le développement de la maladie. Cette protection a été accompagnée par une augmentation de l'expression du gène codant pour une β -1,3-glucanase et d'un dépôt de callose (Shetty *et al.*, 2009).

7.1. b La lignification

Han *et al.* (2007) ont classé les composés phénoliques en 6 groupes, selon le nombre de noyaux phénoliques et les éléments structurels qui relient ces cycles, à savoir : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les tanins, les lignanes et les lignines polymères. Ces derniers, jouant un rôle structurel majeur de la paroi cellulaire végétale, confèrent une résistance mécanique et une tolérance aux facteurs de stress biotiques et abiotiques (Nguyen *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2018). La lignification se manifeste par la formation de l'apposition et provoque la rigidification de la paroi cellulaire en la rendant plus résistante à la pression mécanique appliquée par les appressoria fongiques lors de la pénétration du champignon, limitant ainsi sa croissance et / ou le confinant (Siegrist *et al.*, 1994 ; Lange *et al.*, 1995 ; Baayen *et al.*, 1996 ;

Synthèse bibliographique

Smit et Dubery, 1997 ; Bonello *et al.*, 2003 ; Hudgins *et al.*, 2004 ; Menden *et al.*, 2007). De plus, le dépôt de la lignine modifie l'hydrophobicité de la paroi, assure une résistance non seulement, à l'eau et aux enzymes de dégradation produites par l'agent pathogène mais aussi à la diffusion des nutriments provenant de la plante vers les bioagresseurs (Nicholson et Hammerschmitt, 1992 ; Vance *et al.*, 1980 ; Zeyen *et al.*, 2002).

En plus de son rôle comme un facteur de défense préformé, l'induction de la lignification a été proposée comme un élément clé des mécanismes de résistance active des plantes contre les champignons (Campbell et Sederoff, 1996 ; Bhuiyan *et al.*, 2009). En effet, lors de l'interaction entre le blé et *F. graminearum*, la lignification et l'accumulation des composés phénoliques sont considérées comme un élément majeur de la résistance de la plante (Mohammadi et Kazemi, 2002).

La lignine est un biopolymère polyphénolique issu de la voie des phénylpropanoïdes (Gallego - Giraldo *et al.*, 2018). La PAL (Phénylalanine Ammonia Lyase) catalyse le *L*- phénylalanine en acide cinnamique. Puis, une série d'hydroxylation et de méthylation consécutives du cycle aromatique conduit à la formation des monomères d'alcool hydroxycinnamylique appelés monolignols : *p*-coumaryl, coniféryl et l'alcool sinapylique (Boerjan *et al.*, 2003 ; Mottiar *et al.*, 2016). Les lignines des graminées sont principalement dérivées de ces trois monolignols, aboutissant à des unités *p*-hydroxyphényle, gâiacyle et syringyle (Menden *et al.*, 2010). Plusieurs enzymes interviennent dans la voie de biosynthèse de ces monolignols telles que : la PAL, la CAD (Cinnamyl Alcool Déshydrogénase), la CCoAMT (Caffeoyl Coenzyme A 3- *O*-MethylTransferase), la F5H (Ferulate/coniferaldehyde 5-Hydroxylase), la COMT (Caffeic Acid *O*-MethylTransferase) (Figure 19). Par la suite, les monolignols sont transportés vers l'apoplasme pour être polymérisés en lignine dans la paroi cellulaire sous l'action des laccases et des POX (Mottiar *et al.*, 2016). La lignine est donc assimilée dans les parois cellulaires avec les protéines structurales, les pectines, les hémicelluloses et la cellulose (Burton *et al.*, 2010).

Menden *et al.* (2007) ont démontré que l'infection d'un cultivar de blé résistant au champignon biotrophe *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* est accompagnée par une accumulation de la lignine riche en syringyle. Chez un cultivar sensible de blé diploïde (*Triticum monococcum*), des transcrits de la PAL, COMT, F5H, CCoAMT et de CAD sont accumulés dans les cellules de l'épiderme en réponse à l'infection par *Bgt*. De même, l'inhibition des activités enzymatiques de la PAL et de la COMT par leurs inhibiteurs spécifiques (acide α -aminoxy- β -

phenylpropanic, acide 2-aminoindan-2-phosphonic, 4-hydroxybenzoic hydrazide pour la PAL, et O-dihydroxybenzene pour la COMT) a provoqué une pénétration plus importante du champignon dans les feuilles par rapport aux plantes de blé témoins non traitées. En effet, l'inhibition de l'expression des gènes *TmPAL*, *TmCAOMT*, *TmCCoAMT*, et *TmCAD*, par silencing, a diminué la taille de la papille, rendant les plants de blé plus sensibles à *Bgt*, et a permis également la pénétration du pathogène non hôte *B. graminis* f. sp. *hordei* (Bhuiyan *et al.*, 2009).

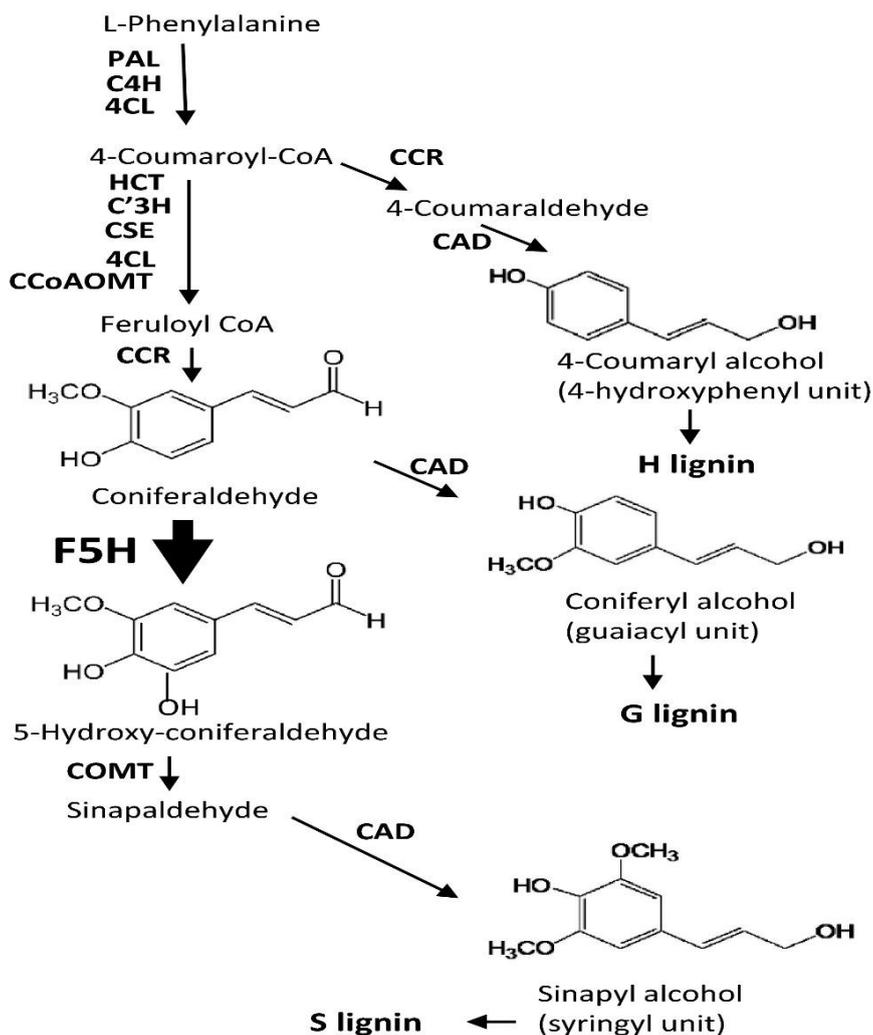


Figure 19 : Voie de biosynthèse de la lignine (Gallego - Giraldo *et al.*, 2018).

7.1. c Les protéines PR (Pathogenesis-Related)

Les protéines liées à la pathogenèse (PRs) ont été décrites pour la première fois dans le cadre d'une infection du tabac par le virus de la mosaïque de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) (Loon et Van Kammen, 1970 ; Gianinazzi, 1970). Ces protéines sont produites par la plante hôte et sont induites en réponse à l'infection de la plante par un agent pathogène d'où le terme *Pathogenesis-*

Synthèse bibliographique

Related proteins (Antoniw *et al.*, 1980). Leurs rôles dans les réactions de défense ont été largement étudiés lors de différentes interactions plantes/pathogènes (Van loon *et al.*, 2006, Chaves *et al.*, 2009, Das *et al.*, 2011, Colas *et al.*, 2012, Agarwal *et al.*, 2014).

Les protéines PR sont détectées dans tous les organes végétaux, les feuilles, les tiges, les racines et les fleurs (Van Loon et Van Strien, 1999). De faibles poids moléculaires (6 à 43 kDa) (Sinha *et al.*, 2014) et résistantes aux protéases apoplastiques et vacuolaires, ces protéines s'accumulent préférentiellement dans l'apoplasme mais certaines protéines PR peuvent également être transportées vers la vacuole grâce à une séquence de signal localisée dans la partie C-terminale (Van Loon et Van Strien, 1999 ; Benhamou et Rey, 2012a ; Ali *et al.*, 2018). Elles sont répertoriées en 17 classes en fonction de leurs activités enzymatiques et leurs séquences en acides aminés (Van loon et Strien, 1999 ; Datta et Muthukrishnan, 1999 ; Van loon *et al.*, 2006, Sinha *et al.*, 2014) (Tableau 3).

La synthèse est particulièrement induite en cas de stress biotique ou abiotique et ces protéines jouent un rôle majeur dans la résistance aux maladies (Ali *et al.*, 2018). Waspi *et al.* (2001) ont remarqué que les gènes de défense codant pour les protéines PR *WIR1* et *WIR2s* ont fortement transcrits 1 heure après l'inoculation du blé par *Bgt*. En effet, les protéines PR sont des composantes clés de la SAR et possèdent diverses fonctions biologiques. Bien que certaines familles de PR n'ont pas encore de fonction biologique connue mais la majorité d'entre elles ont soit un effet toxique direct vis-à-vis de l'agent pathogène, soit une activité hydrolytique des parois fongiques (Adie *et al.*, 2007, Benhamou et Rey, 2012).

Les protéines **PR1** sont les plus étudiées chez les plantes et représentent une famille de 23 protéines chez le blé (Breen *et al.*, 2016). Elles jouent un rôle dans la réponse de la plante au stress biotique (Lincoln *et al.*, 2018). En effet, elles sont régulées à la hausse au début de la réaction de défense et associées aux interactions pathogènes - hôtes incompatibles et compatibles (Gruner *et al.*, 2003 ; Hong *et al.*, 2005 ; Lazniewska et Macioszek, 2010 ; Leon Reyes *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2011 ; Santamaria *et al.*, 2001). Toutefois, l'expression du gène *PR1* (HQ848391) est induite pendant tout le processus infectieux du blé par *Bgt* chez un cultivar sensible (Tayeh *et al.*, 2015). En effet, les PR 1 sont considérées comme des marqueurs spécifiques de la SAR (Jourdan *et al.*, 2008) et donc caractéristiques de l'activation des voies de réponse de la HR et de l'AS (Buchel et Linthorst, 1999 ; van Loon *et al.* , 2006 ; van Loon et van Strien, 1999). Suite à l'attaque d'un agent pathogène biotrophe, la voie de l'AS stimule la transcription de *NPR1* qui à son tour aboutit à l'activation et à l'accumulation locale de *PR1*, *PR2* et *PR5* et aussi à la mise en place de la SAR (Ali *et al.*, 2018). De plus, l'accumulation des

Synthèse bibliographique

transcrits des gènes *PR1* et *PR2* est considérée comme un marqueur moléculaire de la SAR (Ali *et al.*, 2018). Lincoln *et al.* (2018) ont rapporté que la surexpression du gène *PR1* module à la hausse les niveaux des ROS et des mécanismes de signalisation, entraînant une résistance accrue aux maladies chez les plantes de tomate transgéniques. De plus, les protéines PR1 sont accumulées dans les papilles, ce qui suggère qu'elles pourraient empêcher la pénétration de l'agent pathogène en renforçant les parois cellulaires de l'hôte (Santén *et al.* 2005, Egorov et Odintsova, 2012 ; Łazniewska *et al.*, 2012).

Les **PR5** comprennent les protéines thaumatine-like (TLPs), les osmotines et les permatines (Liu *et al.*, 2010). Elles sont identifiées comme des composés présentant des activités antifongiques et qui s'accumulent dans les vacuoles végétales (Anzlovar et Dermastia, 2003 ; van Loon *et al.*, 2006 ; Rather *et al.*, 2015). Il a été prouvé que la surproduction de TLPs offre une tolérance accrue aux agents pathogènes fongiques (Velazhahan et Muthukrishnan, 2003). L'expression des protéines PR5 est généralement induite exclusivement en réponse à une attaque de pathogène ou une blessure (Monteiro *et al.*, 2003). La surexpression de *PR-1*, *TLP* et β 1,3 *glucanase* chez le blé ou de *Zm PR-5* et *Zm 1,3 β -glucanase* chez le maïs, conférerait une résistance contre le champignon *Bipolaris sorokiniana* (Manghwar *et al.*, 2018).

La plupart des PR ont une activité antifongique (Hejgaard *et al.*, 1991 ; Caruso *et al.*, 1996) ou une activité antibactérienne, insecticide, nématocide ou encore antivirale (Cutt *et al.*, 1989, Edreva, 2005). Ainsi, certaines protéines PR possèdent une activité enzymatique β -1,3-glucanase pour PR-2 (Kombrink, 1988) ou chitinase pour PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11 (Heitz *et al.*, 1994 ; Van loon *et al.*, 2006) et sont donc capables de dégrader la paroi fongique de l'agent pathogène et limiter son développement. De plus, l'action de ces enzymes pourrait contribuer à libérer des monomères de glucane et de chitine, qui à leur tour peuvent agir en tant qu'éliciteurs et induire une PTI (van Loon et van Strien, 1999 ; Tuzun, 2006; Prasannath, 2017). En effet, une résistance à l'infection par *Bgt* et à *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* a été observée chez le blé sur-exprimant le gène codant une chitinase de classe II (*PR3*) issu de l'orge en comparaison à des plants de blé non transformés (Oldach *et al.*, 2001).

D'autres protéines, riches en cystéine, possèdent également une activité antimicrobienne, ainsi les protéines **PR6** définies comme des inhibiteurs de protéases, les protéines **PR13** appelées thionines végétales et les protéines PR12 ou défensines (Ali *et al.*, 2018). Les **PR12**, présentant une activité antibactérienne, mais aussi antifongique et insecticide (Wijaya *et al.*, 2000 ; van Loon *et al.*, 2006, Stotz *et al.*, 2009). En plus des défensines, les protéines PR14 appelées protéines de transfert des lipides (LTP : Lipid Transfer Protein) ont une activité antibactérienne

Synthèse bibliographique

et jouent un rôle dans la synthèse de la cutine (Regente *et al.*, 2005 ; Kader, 1996). Il a été démontré que les LTP provoquent une déstabilisation et une perméabilisation de la membrane des agents pathogènes (Sels *et al.*, 2008 ; Finkina *et al.*, 2018).

La famille des **PR9** codent pour des peroxydases (POX). Ces PR9 catalysent les dépôts de la lignine en réponse à l'attaque d'un agent pathogène et renforce ainsi la paroi végétale (Passardi *et al.*, 2004). De plus, elles ont un rôle dans la production de métabolites antimicrobiens comme les phytoalexines (Almagro *et al.*, 2009). Les **PR9** sont induites par plusieurs agents pathogènes du blé et de l'orge tels que *Bgt*, *Bgh* et *Pseudomonas syringae* (Thordal-Christensen *et al.* 1992 ; Gregersen *et al.* 1997 ; Vallélianbindschedler *et al.* 1998). L'expression d'un gène codant une POX est fortement induite en réponse à l'infection d'un cultivar de blé résistant par *Puccinia triticina* (Casassola *et al.*, 2015).

Les protéines **PR 10** de type ribonucléase sont généralement localisées dans les espaces intracellulaires (van Loon et van Strien, 1999). Elles présentent une activité antibactérienne observée contre *P. syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *A. radiobacter*, *P. aureofaciens* et *Serratia marcescens* (Xie *et al.*, 2010 ; Jiang *et al.*, 2015). Wu *et al.* (2016) ont démontré qu'un riz transgénique sur-exprimant le gène codant une PR10 (*JIOsPR10*) présente une résistance à *M. oryzae* par rapport aux blés non transformés.

Deux autres familles **PR15** et **PR16** correspondent à des enzymes à activité oxalate oxydase (OXO) et oxalate oxydase-like respectivement (Van Loon *et al.*, 2006). Ces oxydoréductases catalysent l'acide oxalique (ou l'oxalate, une puissante toxine fongique) en H₂O₂ et CO₂ (Sels *et al.*, 2008). En réponse à une attaque par un agent pathogène, les plantes accumulent des OXO. L'H₂O₂, résultant de l'oxydation de l'oxalate, agit comme un facteur de signalisation dans les mécanismes des défenses des plantes mais aussi comme un antimicrobien direct (Pan *et al.*, 2007). Des plantes de soja et du tournesol exprimant un gène de blé codant une OXO sont plus résistants contre *Sclerotinia sclerotiorum* (Donaldson *et al.*, 2001; Burke et Riesenberg, 2003). Chez les céréales, les germines, des protéines apoplastiques et glycosylées avec une activité oxalate-oxydase, sont principalement étudiées dans le cadre des réactions de défense contre un agent pathogène (Zimmermann *et al.*, 2006). L'induction du gène codant une OXO a été observé parmi les premières réponses lors de l'inoculation du blé par *Bgt* (Tayeh *et al.*, 2015). De plus, Il a été démontré que l'expression des gènes codant des OXO est induite dans le cadre d'interactions compatibles et incompatibles chez le blé en réponse au blé et *Bgt*, entre 12h et 24h post infection (Hurkman et Tanaka, 1996, Wang *et al.*, 2012, Tayeh *et al.*, 2015).

Synthèse bibliographique

Tableau 3 : : Les 17 classes de protéines PR (d'après *Adi et al.*, 2018 ; *Sels et al.*, 2018, *Wang et al.*, 2018).

Bgh : *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*; *Bgt* : *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*; *Pt* : *Puccinia tritici*; *Pst*, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; *Pgt* : *Pucciniagraminis* f. sp. *tritici*; *Fc* : *Fusarium culmorum* / (*nd*) non défini.

Famille	Membre type	Source	Taille typique(kDa)	Description	Cible microbienne	N° d'accession du gène	Accession du blé	Pathogènes	Références
PR-1	Tabac PR-1a	<i>Nicotiana tabacum</i>	15	Antifongique	inconnu	YOO707	TaPR1a_CAA07473 TaPR1b_CAA07474	<i>Bgh</i> , <i>Bgt</i> , <i>Pt</i> ,	Antoniw <i>et al.</i> (1980) Görlach <i>et al.</i> (1996) Vallélianbindschedler <i>et al.</i> (1998) Molina <i>et al.</i> (1999) Lu <i>et al.</i> (2014) Gao <i>et al.</i> (2015) Wang <i>et al.</i> (2016)
PR-2	Tabac PR-2, Q	<i>N. tabacum</i>	30	β -1,3-Glucanase	β -1,3-Glucane	M59443.1	TaPR2_CAA77085	<i>Pst</i> , <i>Pgt</i> , <i>Fc</i>	Antoniw <i>et al.</i> (1980) Sock <i>et al.</i> (1990) Kang et Buchenauer (2002); Liu <i>et al.</i> (2010); Wang <i>et al.</i> (2016)
PR-3	Tabac P, Q	<i>N. tabacum</i>	25-30	Endochitinase (Type I, II, IV, V, VI, VII)	Chitine	X77111.1	TaPR3_Chit2_AAD28730 TaChit4_AAD28733 TaChit1b_CAA53626	<i>Bgh</i> , <i>Bgt</i> , <i>Fg</i>	Van Loon (1982) Yu <i>et al.</i> (1994) Gregersen <i>et al.</i> (1997) Vallélianbindschedler <i>et al.</i> (1998) Li <i>et al.</i> (2001) Shin <i>et al.</i> (2008) Gao <i>et al.</i> (2013) Wang <i>et al.</i> (2016)
PR-4	Tobacco 'R'	<i>N. tabacum</i>	15-20	Chitinase antifongique (class I, II), Liaison Chitine-protéines	Chitine	NW_015888419.1	TaPR4a_CAA06856 TaPR4b_CAA06857	<i>Fc</i>	Van Loon (1982) Caruso <i>et al.</i> (1999); Caruso <i>et al.</i> (2001); Bertini <i>et al.</i> (2003); Wang <i>et al.</i> (2016)
PR-5	Tobacco S	<i>N. tabacum</i>	25	Thaumatine-proteines	Membrane	NW_015793016	TaPR5_AAZ94267	<i>Bgh</i> , <i>Bgt</i> , <i>Pst</i> , <i>Pt</i>	Van Loon (1982) Vallélianbindschedler <i>et al.</i> (1998); Reiss and Horstmann (2001) Wang <i>et al.</i> (2010) Li <i>et al.</i> (2015); Wang <i>et al.</i> (2016)
PR-6	Tomate I	<i>Solanum lycopersicum</i>	8	Inhibiteur Proteinase	nd	NW_004196001.1	TaPR6_DR752088	-	Green and Ryan (1972) Gaddour <i>et al.</i> (2001); Gao <i>et al.</i> (2013)
PR-7	Tomate P69	<i>S. lycopersicum</i>	75	Endoproteinase	nd	NC_015445.2	nd	<i>nd</i>	Vera et Conejero (1988) Jordá <i>et al.</i> (2000)

Synthèse bibliographique

PR-8	Concombre chitinase	<i>Cucumis sativus</i>	28	Chitinase (type III)	Chitine	NC_026660.1	nd	<i>nd</i>	Metraux <i>et al.</i> (1988)
PR-9	Tobac « lignin-forming peroxidase »	<i>N. tabacum</i>	35	Peroxydase	nd	EC 1.11.1.7	nd	<i>Bgh, Bgt, Pss</i>	Lagrimini <i>et al.</i> (1987)
PR-10	Persil « PR1 »	<i>Petroselinum crispum</i>	17	Ribonucléase-like	nd	NC_026940.1	nd	<i>nd</i>	Somssich <i>et al.</i> (1986)
PR-11	Tobac « class V' chitinase »	<i>N. tabacum</i>	40	Chitinase (class I)	Chitine	gi 899342	nd	<i>nd</i>	Melchers <i>et al.</i> (1994)
PR-12	Radis Rs-AFP3	<i>Raphanus raphanistrum</i>	5	Defensine	Membrane	NC_025209.1	nd	<i>nd</i>	Terras <i>et al.</i> (1995)
PR-13	Arabidopsis THI2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5	Thionine	Membrane	gi 1181531	nd	<i>nd</i>	Epple <i>et al.</i> (1995)
PR-14	Orge LTP4	<i>Hordeum vulgare</i>	9	Protéine de transfert des phospholipides et d'acides gras	Membrane	gi 1045201	TaLTP5_DN551584 TaLTP3F1_ABO28527	<i>Bgh</i>	Garcia-Olmedo <i>et al.</i> (1995) Molina et García-Olmedo (1993); Garcíaolmedo <i>et al.</i> (1995); Kirubakaran <i>et al.</i> (2008); Zhu <i>et al.</i> (2012)
PR-15	Orge OxOa (germine)	<i>H. vulgare</i>	20	Oxalate oxidase	nd	gi 2266668	nd	<i>Bgh</i>	Zhang <i>et al.</i> (1995)
PR-16	Orge OxOLP	<i>H. vulgare</i>	20	Oxalate oxidase	nd	gi 1070358	nd	<i>Bgh</i>	Wei <i>et al.</i> 1998)
PR-17	Tobacco PRp27	<i>N. tabacum</i>	27	Non connu	nd	-	nd	<i>Bgh</i>	Okushima <i>et al.</i> (2000)

III. Méthodes de lutte contre l'oïdium du blé

1. Méthodes de lutte actuelles

Pour assurer une production agricole de qualité et en quantité suffisante, la protection des cultures demeure aujourd'hui une nécessité. Les stratégies de gestion des maladies des plantes devraient garantir un système durable et productif pour l'avenir (Russell, 2005, Weller *et al.*, 2014). Les recherches menées sur la lutte et les moyens de prévention contre les maladies fongiques du blé sont parmi les principaux enjeux actuels. En effet, l'identification des maladies et le développement des méthodes alternatives de protection des plantes compatibles avec une agriculture plus durable respectueuse de la santé de l'homme et de son environnement sont des points essentiels à la mise en place des moyens de luttés adéquats qui peuvent être adoptés pour la gestion des maladies.

1.1. Lutte chimique

En Europe, et de par le monde, la protection des cultures, notamment des céréales repose essentiellement sur l'utilisation des produits phytosanitaires issus de la chimie de synthèse (Butault *et al.*, 2011). Le blé fait partie des cultures qui requièrent une utilisation intensive de fongicides (McDougall, 2014 ; Kuck et Gisi, 2008). Selon un rapport publié en 2017 par l'Agreste (le service statistique du ministère de l'Agriculture), l'indice de fréquence de traitement (IFT) du blé tendre est de 6.3 dans la région Nord-Pas-de-Calais dont 2.9 pour les fongicides. (Tableaux 4, 5).

Synthèse bibliographique

Tableau 4 : Indicateur de fréquence de traitement (IFT) total, selon les espèces, par ancienne région en 2017.

Région	Blé tendre	Blé dur	Orge	Triticale	Colza	Tournesol	Pois protéagineux	Maïs fourrage	Maïs grain	Betterave sucrière	Pomme de terre	Canne à sucre	Féverole	Soja	Lin fibre	Lin oléagineux
Alsace	3,4							2,9								
Aquitaine				1,9		3,1	2,2	2,8				1,1	1,7			
Auvergne	3,5			2,3	5,8	2,5		2,1	3,3							
Basse-Normandie	5,1		4,6	3,5	6,7		5,6	2,5		5,1			5,5			
Bourgogne	4,3		4,9	2,4	6,9	2,5	4,0	2,3	2,9					2,1		4,0
Bretagne	4,6		4,4	3,7	3,9			2,5	2,5		17,5		3,4			
Centre	5,3	5,5	4,7	2,9	6,8	3,0	5,5	2,6	3,2	6,1	12,5		3,0			5,0
Champagne-Ardenne	5,7		4,0	3,0	6,4		4,1	2,8	3,0	6,4	18,8		4,1			
Franche-Comté	4,4		4,3			6,2								2,1		
Guadeloupe												1,7				
Haute-Normandie	6,6		5,3		6,6		5,5	2,4		5,2	17,4		4,8		5,5	
Ile-de-France	6,4		4,7		6,5		5,4		2,9	5,7	13,1		4,1			
La Réunion												3,2				
Languedoc-Roussillon		3,2		0,5		2,5	4,3									
Limousin				2,4				1,8								
Lorraine	4,5		3,7	2,5	5,9	2,6	2,8	2,3	2,9							3,7
Martinique												3,2				
Midi-Pyrénées	3,3	4,3	2,8	2,2	5,7	2,6	4,3	2,0	2,6				1,8	1,5		2,1
Nord-Pas-de-Calais	6,3		4,7		5,1		4,7	2,5	2,3	4,7	16,5		4,7		4,5	
Pays de la Loire	4,9	4,3	4,3	3,3	5,7	2,5	4,6	2,4	2,7				2,5			4,2
Picardie	5,8		4,9		6,2		5,3	2,3	2,5	5,2	16,7		4,0		4,6	
Poitou-Charentes	4,9	4,8	4,5	2,8	7,5	2,6	4,6	2,3	2,9				2,4			3,5
Provence-Alpes-Côte d'Azur		2,4														
Rhône-Alpes	3,2	3,0	2,8	2,0	4,5	2,7		2,4	3,0					2,1		
Ensemble	5,1	4,2	4,4	2,6	6,4	2,7	4,6	2,4	2,8	5,5	16,5	2,7	3,2	1,8	5,1	3,8

Tableau 5 : Evolution du nombre moyen de traitements fongicides en grandes cultures entre 2011 et 2017, à champ géographique commun (nd: non diffusé).

	2011	2014	2017
Blé tendre	2,7	3,1	2,9
Blé dur	1,7	2,2	2,2
Orge	2,3	2,2	2,3
Triticale	0,8	1,0	0,9
Colza	1,9	2,0	1,8
Tournesol	nd	0,1	0,1
Pois protéagineux	1,5	1,9	1,9
Maïs fourrage	nd	nd	nd
Maïs grain	nd	nd	nd
Betterave sucrière	1,5	1,6	2,0
Pomme de terre	12,8	15,5	12,7
Canne à sucre	0	nd	0

(SSP - Agreste - Enquête Pratiques culturales en grandes cultures 2017, Pratiques culturales en grandes cultures Agreste Chiffres et Données n° 2019-3)

Synthèse bibliographique

Actuellement, il existe plusieurs fongicides chimiques homologués utilisés pour lutter contre *B. graminis* f. sp. *tritici*, et en particulier des inhibiteurs de biosynthèse des stérols (IBS) (Yang *et al.*, 2013) tels que les triazoles (flutriafole, diniconazole,..) et les amines y compris les morpholines (fenpropimorphe), pipéridines (fenpropidine) et spirocétalamines (spiroxamine) (Walker *et al.*, 2006). A ces IBS s'ajoutent aussi les diaminopyrimidines qui inhibent la synthèse des acides nucléiques. Les strobilurines à base d'acrylate de méthyle, appelés aussi QoI (Quinone outside Inhibitors) ainsi que les phénoxyquinoléines connus pour inhiber, respectivement, la respiration mitochondriale et la germination des spores ainsi que la formation des appressoria (Walker *et al.*, 2004 ; Bernard et Rameil, 2005).

Il a été démontré que ces traitements fongicides contribuent à la réduction des pertes de rendements dans les systèmes de productions actuels (Ridgway *et al.*, 1978 , De Waard *et al.*, 1993; Bartlett *et al.*, 2002; Carvalho, 2006). Cependant, la lutte chimique présente différents inconvénients. En effet, l'utilisation systématique et excessive de ces fongicides peut altérer la qualité des grains de blé, notamment la réduction de la teneur en protéines (Ruske *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation répétée des fongicides conduit à l'apparition de souches d'oïdium résistantes aux produits phytosanitaires (Bélangier et Benyagoub, 1997 ; Ishii *et al.*, 2001). D'après Walker *et al.* (2004), des souches de *B. graminis* résistantes aux fongicides ont été retrouvées sur le territoire français et en particulier dans le Nord du Pays. En effet, le pouvoir d'adaptation de l'agent pathogène est dû à la courte durée de sa reproduction asexuée, le nombre important de conidies produites et leur dissémination anémophile. D'autre part, l'utilisation des fongicides est remise en question après la prise en conscience des risques de contaminations de la chaîne alimentaire, du sol, de l'eau et de l'air qu'ils peuvent générer (Itoiz *et al.*, 2012 ; Caylak et Tokar, 2012 ; Garron *et al.*, 2012). L'emploi répété des fongicides peut engendrer aussi des effets toxiques sur la santé humaine (altération du système immunitaire, troubles neuro-développementaux et maladies respiratoires chroniques) (Ritter *et al.*, 2006, Burns *et al.*, 2016).

Ces contraintes ont réduit l'attrait des produits chimiques. La législation et l'homologation de nouveaux fongicides sont en train d'évoluer. Une réglementation de plus en plus stricte, en particulier en Europe, a entraîné le retrait de nombreuses matières actives (Lucas *et al.*, 2015). De plus, le coût et les contraintes liées à la découverte et à la mise sur le marché des nouveaux produits de traitement ont également entraîné une diminution de la diversification des fongicides. Il devient donc impératif d'explorer des options alternatives éco-compatibles et efficaces contre l'oïdium du blé (Gao *et al.*, 2018).

1.2. Lutte génétique

Bien que l'incidence de la maladie puisse varier d'une année à l'autre, la sensibilité des variétés hôtes joue un rôle majeur (Singh *et al.*, 2016). En effet, le choix variétal est l'un des premiers critères pour réduire l'incidence des pathogènes sur la culture. La lutte contre les maladies foliaires du blé va donc reposer sur la résistance génétique de la variété choisie (Ezzahiri, 2011). Il s'agit d'insérer, par croisements, des gènes de résistance dans des plantes sensibles à partir d'autres plantes résistantes. Depuis 1979, l'introduction du gène de résistance *mlo* (*mildew resistance locus o*) dans des cultivars d'orge sensibles a atténué considérablement les pertes des rendements dues à l'oïdium (Lyngkjær *et al.*, 2000). A ce jour, 54 *loci* de gènes de résistance race-spécifiques (gènes R) à l'oïdium notés *pm1-pm91* ont été identifiés chez le blé (Cao *et al.*, 2012 ; He *et al.*, 2009 ; Tang *et al.*, 2018).

L'usage intensif des variétés résistantes a contribué à la réduction de la diversité génétique chez le blé. Les gènes de résistance ont traditionnellement fourni des niveaux élevés de contrôle des maladies contre l'oïdium bien que les cultivars se sont souvent révélés vulnérables à l'émergence de nouvelles souches virulentes. Toutefois, cette voie pourrait présenter une alternative temporaire, en raison de l'adaptation du pathogène, ce dernier a la capacité de muter le gène d'avirulence *Avr* correspondant au gène *R* de la plante et donc de contourner la résistance de la plante (McDonald et Linde, 2002). Certaines études ont alerté sur le risque de manque de diversification des gènes de résistance (Donini *et al.*, 2000). En effet, les principales limites de cette technique de lutte (la non-durabilité et les contraintes accompagnant la sélection de nouvelles variétés résistantes) ne permettent pas de contrôler efficacement les maladies fongiques, d'où la nécessité de mettre en place d'autres méthodes alternatives.

1.3. Lutte prophylactique

La conduite culturale correcte est la première voie à adopter afin de minimiser les risques de développement de tout agent pathogène. La réduction de l'incidence de la maladie débute par l'adoption de pratiques culturales vertueuses. Hormis l'utilisation de cultivars résistants, la lutte prophylactique contre l'oïdium du blé implique différents volets de la conduite de la culture. En effet, le choix de l'antécédent cultural est essentiel pour limiter la persistance des souches fongiques sur les résidus de culture pouvant être une source de contamination pour les semis suivants. La destruction des repousses, le broyage et l'enfouissement des résidus de récoltes

permettent ainsi de limiter le risque du développement des maladies. De plus, le travail du sol et une fertilisation équilibrée peuvent être des éléments décisifs dans le développement de la maladie. Un apport excessif en azote favorise l'installation de l'oïdium sur le blé. La date et la maîtrise de la densité de semis sont également primordiales. En effet, les semis de blé tardifs sont plus propices au développement de l'oïdium notamment en cas de forte hygrométrie la nuit et de temps sec le jour. De plus, une densité de semis élevée permettra de créer une atmosphère humide favorable à l'installation et à la propagation de l'oïdium.

2. Lutte alternative : les stimulateurs de défense des plantes (SDP)

2.1. Principe

Le biocontrôle ou la lutte biologique repose sur le recours d'organismes vivants ainsi que l'utilisation des produits naturels stimulant les défenses naturelles ou le développement des plantes dans le contexte de la protection contre les bioagresseurs (Herth, 2011).

En 1975, ce sont Albersheim et Anderson qui ont introduit le terme de 'Stimulateurs de Défense des Plantes' ou SDP. Les SDP sont également abrégés SDN pour stimulateur de défense naturelle, mais aussi appelé éliciteur ou inducteur. Un SDP est défini comme toute molécule d'origine naturelle ou non qui, appliqué sur une plante, est capable de mimer l'effet des éliciteurs (PAMPs, DAMPs, MAMPs) et de promouvoir un état de résistance face à un stress biotique causé par un agent pathogène (champignon phytopathogène, insecte phytophage, bactérie ou virus) ou abiotique (Benhamou et Rey, 2012; ELICITRA, <https://elicitra.org>).

En plus de leur effet éliciteur, les SDP peuvent être utilisés comme des potentialisateurs sur les plantes. En effet, un éliciteur active les réponses de défense des plantes et ce même avant l'attaque d'un agent pathogène. Tandis que, lors d'un traitement avec un potentialisateur, les mécanismes de défense ne se mettent en place que si les plantes sont attaquées par un agent pathogène (Benhamou et Rey, 2012).

L'utilisation des SDP pour la protection des plantes a été proposée dès les années 1980. Dans les années 1990, un premier SDP de synthèse (Bion®) a été mis sur le marché comme un produit phytosanitaire. Toutefois, l'approbation et l'enregistrement des produits de biocontrôle sont soumis à la même réglementation européenne des fongicides conventionnels (Faessel *et al.*, 2014). A ce jour, seules deux molécules SDP : le Vacciplant® (ou Iodus 2) de Goëmar et le

Bion50 WGR de Syngenta ont été approuvés pour une utilisation sur blé (Faessel *et al.*, 2014). Les SDP naturels peuvent être d'origines diverses : végétale (algues, spermatophytes), microbienne (bactéries, champignons) ou encore d'origine minérale (calcium...) (Siah *et al.*, 2018). Ils peuvent être également synthétiques tels que le BABA (acide β -aminobutyrique) ou de l'ASM (acibenzolar-S-méthyl, ou BTH pour Benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester) (Siah *et al.*, 2018).

Divers micro-organismes bénéfiques présents dans la rhizosphère ou la phyllosphère sont considérés comme des SDP capables d'induire des réponses de défense chez la plante. Ces micro-organismes sont essentiellement des PGPR, tels que les genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, et *Burkholderia*, et des PGPF (plant growth-promoting fungi) *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Heteroconium* (Siah *et al.*, 2018). Parmi les agents de biocontrôle, les champignons mycorhiziens arbusculaires tels que les genres *Glomus*, *Funneliformis* et *Rhizophagus* ont été décrits comme de potentiels agents de lutte biologique contre divers agents pathogènes (Song *et al.*, 2011, Campos-Soriano *et al.*, 2012, Pozo *et al.*, 2013, Comby *et al.*, 2017 ; Siah *et al.*, 2018).

3. Stimulateurs de défense étudiés dans le cadre de cette thèse

3.1. Chito-oligosaccharides (COS)

De nos jours, le recours aux techniques traditionnelles et aux ressources naturelles gagne de l'importance afin de préserver la production agricole et de limiter les intrants chimiques. À titre d'exemple ; la poudre de coquille de crevette et de crabe, riche en matières chitineuses, a été utilisée comme un amendement du sol, notamment pour limiter les maladies des cultures (Ha et Huang, 2007). Identifiée en 1884, la chitine (poly- β -(1,4)-Nacetyl-D-glucosamine) est le deuxième polymère le plus abondant au monde après la cellulose (Younes et Rinaudo, 2015). À l'état naturel, la chitine est un polysaccharide structurel blanc, elle se présente sous forme de microfibrilles dures formant un constituant structurel des parois cellulaires des champignons, des levures ainsi que de l'exosquelette des arthropodes tels que les crustacés marins (Rinaudo, 2006, Kim et Rajapakse, 2005). Cependant, la chitine ne peut pas être utilisée directement du fait de son degré d'hydrophobicité important (Kim et Rajapakse, 2005). Elle est généralement convertie en chitosan et en chito-oligosaccharides. Le chitosan est synthétisé à partir de la chitine suite à sa désacétylation partielle (Rinaudo, 2008 ; 2012 ; 2014). La chitine

présente plusieurs inconvénients à utiliser dans des applications biologiques, notamment une mauvaise solubilité dans des conditions physiologiques. Par conséquent, un nouvel intérêt est apparu sur le chitosan, qui est synthétisé à partir de la chitine suite à sa désacétylation partielle (Rinaudo, 2008 ; 2012 ; 2014), partiellement hydrolysé, les chito-oligosaccharides ou les oligosaccharides de chitosan (COS). Ils sont des polymères polyvalents issus de l'hydrolyse de la chitine et ou du chitosan (Phil *et al.*, 2018). En effet, les COS résultent de la dégradation enzymatique ou de l'hydrolyse chimique suite à des étapes de désacétylation et de dépolymérisation (Naveed *et al.*, 2019) (Figure 20).

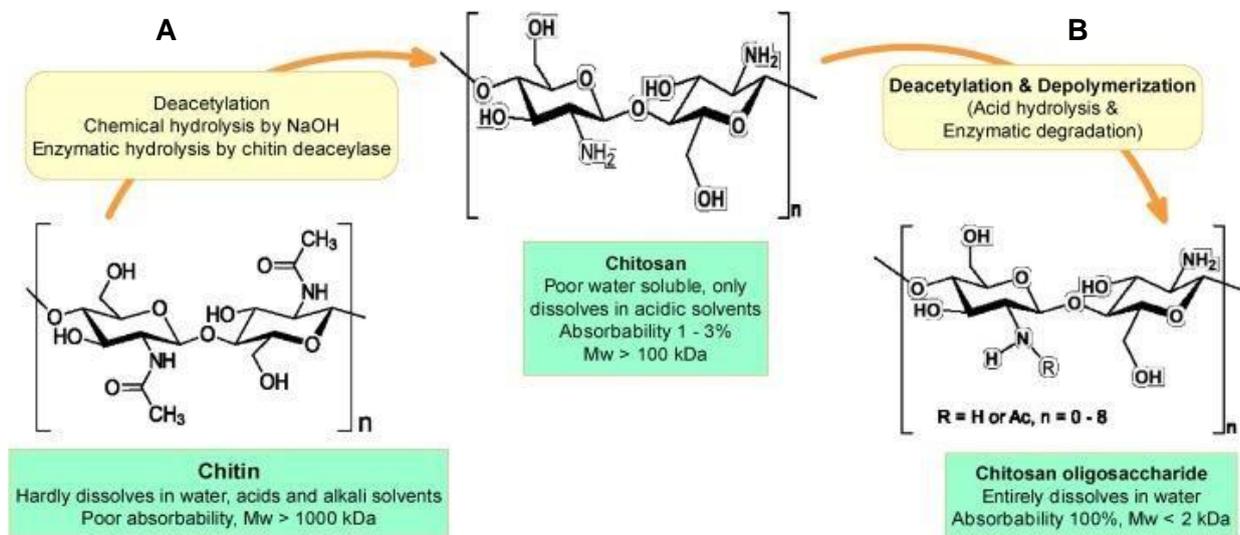


Figure 20 : Structures chimiques de la chitine du chitosan et du COS. (A) Désacétylation de la chitine produisant du chitosan (B) Dépolymérisation du chitosan pour générer du COS (Phil *et al.*, 2018).

Compte tenu de leurs propriétés physicochimiques, les COS sont connus pour avoir plusieurs utilisations dans les secteurs de la biomédecine, l'industrie alimentaire, ou encore dans l'agriculture (Kidibule *et al.*, 2018 ; Naveed *et al.*, 2019). Les COS provoquent plusieurs réponses précoces et tardives chez la plante de la reconnaissance sous forme de PAMP à la transduction du signal éliciteur et jusqu'à l'activation des réponses de défense chez les plantes (Iriti et Faoro *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2019).

Le prétraitement des plantes avec des COS a amélioré la résistance contre *M. oryzae* et *Erysiphe cichoracearum* chez le riz et *Arabidopsis*, respectivement (Tanabe *et al.*, 2006 ; Wan *et al.*, 2008). Tanabe *et al.* (2006) ont observé une accumulation de l'expression des gènes *PR1* et *PR10*, dans les racines riz immergées et les feuilles traitées par un COS, en corrélation avec la mise en place d'une résistance systémique contre *M. oryzae*. De même, Faoro *et al.* (2008) ont

Synthèse bibliographique

montré que la pulvérisation foliaire du chitosan sur l'orge diminuait l'infection par le pathogène de l'oïdium *B. graminis* f. sp. *hordei* via la mise en place d'une résistance locale et systémique. Ainsi, une accumulation plus importante d' H_2O_2 aux sites de pénétration du pathogène et dans les parois cellulaires est observée en comparaison des plantes non-traitées. De plus, Orzali *et al.* (2014) ont démontré que le traitement des semences de blé par le chitosan a réduit la gravité de la maladie causée par *F. graminearum*, et a stimulé les activités enzymatiques telles que la polyphénol oxidase (PPO) et la POX à 4 jours en post infection et traitement par le COS.

Cependant, SCOS (chitooligosaccharide sulfaté) ne possède pas des récepteurs spécifiques dans les plantes. Deux protéines de liaison au SCOS ont été identifiées dans la membrane plasmique du tabac et d'*Arabidopsis*. La protéine du tabac est de 75 kD, est similaire au récepteur CERK1 des oligosaccharides de chitine, mais des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer le rôle de cette protéine. La protéine de l'*Arabidopsis* est assez petite (12 KD), ce qui suggère qu'elle ne peut pas être un récepteur (Yin *et al.*, 2016). Liu *et al.*, (2018) ont identifié trois protéines de liaison des COS sur la surface de la membrane plasmique des protoplastes de blé dont deux d'entre elles (W5HY42_WHEAT et W5I0R4_WHEAT) sont de type sérine / thréonine-protéine kinases qui ont montré une homologie avec (GsSRK) chez *A. thaliana*. La perception de la présence de COS est suivie par une première réaction précoce de la plante, telle que l'accumulation des ROS et la fermeture des stomates à peine 5 minutes après l'ajout de l'éliciteur (Srivastava *et al.*, 2009). Les ROS jouent donc un rôle important dans la transduction du signal des COS. Chez des mutants d'*Arabidopsis nahG*, incapables d'accumuler l'AS, une absence totale de l'induction de réactions de défense, d'accumulation de ROS et de fermeture des stomates a été observé en réponse de l'application de chitosane (Prodhan *et al.*, 2017). Cette étude démontre le rôle crucial de l'AS dans la signalisation de la reconnaissance du COS par la plante et la mise en place des mécanismes de défenses.

De plus, la structure chimique des COS est déterminante dans l'induction des réactions de défense de la plante. En effet, la taille, le degré d'acétylation (DA) et notamment la concentration des COS sont des paramètres clés pour l'accumulation de l' H_2O_2 , l'activation de la voie des phénylpropanoïdes et la mise en place de la mort cellulaire (Cabrera *et al.*, 2006). Par exemple, l'injection des COS avec un DA inférieur à 20%, dans les espaces intercellulaires des feuilles de blé a induit l'activité de PAL mais le POD n'a été que faiblement activé. Avec l'augmentation du DA jusqu'à 35% l'induction de PAL et POD a augmenté. Mais, aucune

augmentation supplémentaire de l'induction du PAL n'a été observée avec des DA de 50% à 60%, alors que l'induction de la POX a continué d'augmenter (Vander *et al.*, 1998).

3.2. Rhamnolipides

Les rhamnolipides (RLs) sont des glycolipides amphiphiles connu pour être produit par des bactéries, des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* (Abdel - Mawgoud *et al.* , 2010). Les RLs sont constitués d'une (mono-rhamnolipides, mono-RL) ou deux molécules (mono-rhamnolipides, mono-RL). Des rhamnoses forment une tête polaire hydrophile reliée par une liaison β -glycosylique à un ou deux acides gras 3-hydroxy (Abbasi *et al.*, 2012) (Figure 21). La diversité des RLs produits est très importante en raison de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras qui varie de 8 à 16 atomes de carbone (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Les RLs sont naturellement synthétisés par les bactéries sous le format d'un mélange de RLs.

En plus de leurs applications industrielles très répandues en tant que biosurfactants, les rhamnolipides sont également utilisés dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et de la bioremédiation en raison de leurs propriétés de biosurfactants (Hoskova *et al.*, 2013 ; Pornsunthorntawee *et al.*, 2010 ; Lawniczak *et al.*, 2013). Différentes utilisations des traitements à base de rhamnolipides ont été rapportées en agriculture, dans le but de contrôler différentes maladies affectant les plantes cultivées (Sanchez *et al.*, 2012). De plus, les RLs présentent également aussi pour des activités antifongiques et antibactériennes (Randhawa et Rhaman, 2014 ; Dos santos *et al.*, 2016, Yan *et al.*, 2015). Enfin, les RLs sont aussi définis comme d'excellents agents mouillants et peuvent ainsi être ajouté à la formulation des traitements phytosanitaires, en augmentant leur adhésion à la surface hydrophobe des feuilles (Liu *et al.*, 2016).

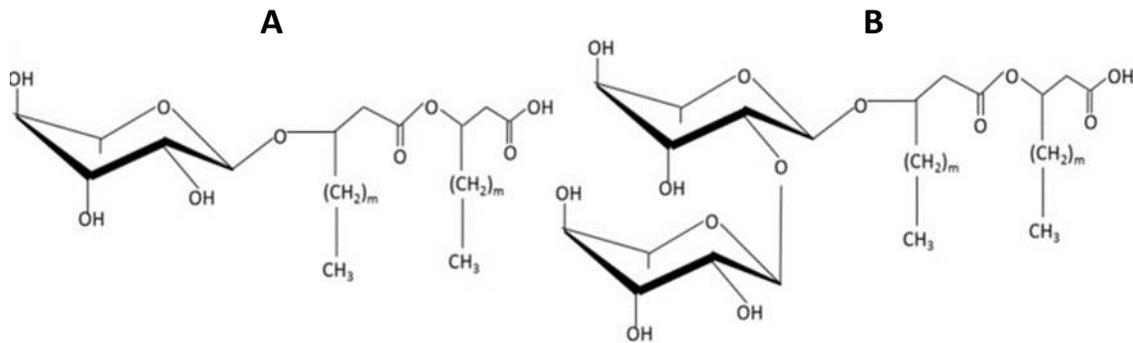


Figure 21 : Structure chimique des principaux rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* (RLs). (A) principal mono-RL ; (B) principal di-RL : 2- *O*- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydécanoyl- β -hydroxydécanoate. (Tan et Li., 2018).

En 2009, Varnier *et al.* ont décrit pour la première fois les RLs comme des MAMPs, faisant d'eux, des substances prometteuses du biocontrôle (Varnier *et al.*, 2009). Compte tenu de leur caractère amphiphile, les RLs pourraient interagir directement avec les lipides de la membrane plasmique végétale et activer ainsi les voies de signalisation de défense chez la plante (Varnier *et al.*, 2009 ; Sanchez *et al.*, 2012). Ces modifications subtiles dans la dynamique des lipides pourraient être liés à l'induction de la résistance chez les plantes (Monnier *et al.*, 2019). Plusieurs études ont démontré que les RLs augmentaient la résistance des plantes contre divers pathogènes, comme *Botrytis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp., *Magnaporthe grisea* ou encore *A. alternata* (Kim *et al.*, 2000 ; De Jonghe *et al.*, 2005 ; Yoo *et al.*, 2005 ; Yan *et al.*, 2015). L'induction de mécanismes de défense par les RLs a été décrite pour la première fois sur la vigne puis sur *A. thaliana* et la tomate (Varnier *et al.*, 2009, Sanchez *et al.*, 2012). Chez la vigne, les trois RLs testés, Rh-C10-C10, Rh-Rh-C10-C10 et Rh-Rh-C14-C14 appliqués à des faibles concentrations sont capables d'induire un afflux de Ca²⁺, la production de ROS, l'activation des MAPK ainsi que la production d'oxylipines et de phytoalexines. Les auteurs ont suggéré que la mise en place d'une PCD dépendait principalement des concentrations des RLs testés (Varnier *et al.*, 2009). Sanchez *et al.* (2012) ont montré qu'un sécrétome de *P. aeruginosa* riche en RLs était susceptible d'induire l'expression des gènes de défense tels que *PR1*, *PR4* et *PDF1.2*, et l'accumulation d'AS et d'AJ dans les feuilles d'*A. thaliana*. L'AS apparaît comme étant essentiel à l'induction de la résistance chez *Arabidopsis* par RLs contre la bactérie hémibiotrophe *Pst DC3000*, l'oomycète biotrophe *H. arabidopsidis* et contre le champignon nécrotrophe *B. cinerea*, tandis que l'ET participe à la protection contre *Pst DC3000* et *H. arabidopsidis*, en revanche, l'AJ semble être

impliqué dans la résistance contre *B. cinerea* (Sanchez *et al.*, 2012). Chez la tomate, le prétraitement avec un mélange de mono et di-RLs, a conféré une protection contre *A. alternata* associée à une augmentation des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la catalase. Néanmoins, en réponse à l'infection par *A. alternata*, une diminution des quantités de ROS et une stimulation des activités de l'ascorbate peroxydase et de la glutathion réductase sont observés chez les plantes prétraités par les RLs, en comparaison des plantes témoins (non-traités) (Yan *et al.*, 2015). Plus récemment, il a été prouvé que les traitements aux RLs confèrent une protection contre *B. cinerea* chez le colza. Cette protection est également associée à l'induction des réactions de défense telles que la production des ROS, le dépôt de callose et notamment l'expression de certains gènes de réponse tardive tels que *PR1*, *PR4* (Monnier *et al.*, 2018). En revanche, aucune étude ne décrit l'utilisation des rhamnolipides dans le cadre de la protection du blé et les céréales contre l'oïdium.

3.3. Lipopeptides

Les lipopeptides (LPs) sont des composés amphiphiles formés généralement d'une ou plusieurs queues acylées et d'un court oligopeptide linéaire ou cyclisé liés à une liaison amide (Hamley, 2011). Ces molécules sont produites par différents microorganismes sous forme de métabolites secondaires notamment par des champignons tels que le genre *Aspergillus* ou des bactéries tels que les genres *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* spp. (Raaijmakers *et al.*, 2010).

Ces LPs formés d'une fraction peptidique cyclique hydrophile et d'une chaîne d'acide gras hydrophobe, sont biosynthétisés par voie non ribosomique impliquant des synthétases peptidiques (NPRS) (Jacques, 2011). Selon leurs séquences d'acides aminés et le type et/ou la liaison de la chaîne acyle grasse, les LPs produits par *B. subtilis* sont répertoriés en trois familles distinctes à savoir les surfactines, les fengycines et les iturines (Figure 22) (Ongena et Jacques 2008, Falardeau *et al.*, 2013, Dimkić *et al.* 2017). Parmi ces LPs synthétisés par *B. subtilis*, Il existe au moins 8 fengycines, 13 surfactines et 14 iturines précédemment décrits (Caulier *et al.*, 2019).

Les bactéries PGPR *Bacillus* spp. à Gram positif, sont considérées comme des usines microbiennes produisant, à grande échelle, une gamme variée de lipopeptides aux propriétés antimicrobiennes à large spectre (Emmert et Handelsman, 1999 ; Ongena et Jacques, 2008, Falardeau *et al.*, 2013 ; Roongsawang *et al.*, 2010, Cochrane et Vederas, 2014, Caulier *et al.*, 2019). En plus de la nature amphiphile qui leur garantit une meilleure interférence avec les membranes végétales et la formation de biofilm, les LPs sont notamment connus comme des inducteurs de résistance systémique (Ongena et Jacques 2008). Plusieurs études suggèrent que les LPs peuvent agir en

Synthèse bibliographique

synergie avec par exemple de la surfactine et l'iturine, la surfactine et la fengycine ainsi que l'iturine et la fengycine (Maget-Dana *et al.*, 1992 ; Koumoutsi *et al.*, 2004 ; Ongena *et al.*, 2007 ; Romero *et al.*, 2007). En effet, les LPs reconnus comme des MAMPs, sont capables de mettre en place une ISR et de déclencher des réponses de défenses des plantes telles que l'afflux du Ca^{2+} , l'accumulation des ROS et des protéines PR, le dépôt de callose et la synthèse des phytoalexines ainsi que l'activation des voies de synthèse de l'AJ et de l'AS et/ou des auxines (Erbs et Newmann 2003 ; Ongena et Jacques, 2008 ; Falardeau *et al.*, 2013, Sun *et al.* 2012 ; Chandler *et al.*, 2015). Bien que les LPs soient connus pour leurs rôles dans la mise en place d'une ISR, les mécanismes de perception et de reconnaissance des LPs par les plantes sont encore peu connus (Newmann *et al.* 2013, Farace *et al.*, 2014, Malviya *et al.*, 2020).

Les LPs sont biodégradables et peu susceptibles d'entraîner l'apparition de souches résistantes aux Lps chez les agents pathogènes ciblés (Mondol *et al.*, 2013). Ces caractéristiques font que les LPs sont considérés comme une alternative prometteuse aux fongicides afin de permettre le développement d'une agriculture plus durable (Penha *et al.*, 2020). Certaines souches de *B.subtilis* produisant des LPs ont été enregistrées et commercialisées telles que SERENADE® (*B. subtilis* str. QST 713) et Kodiak®, en tant qu'agents de lutte biologique très prometteurs (Falardeau *et al.*, 2013).

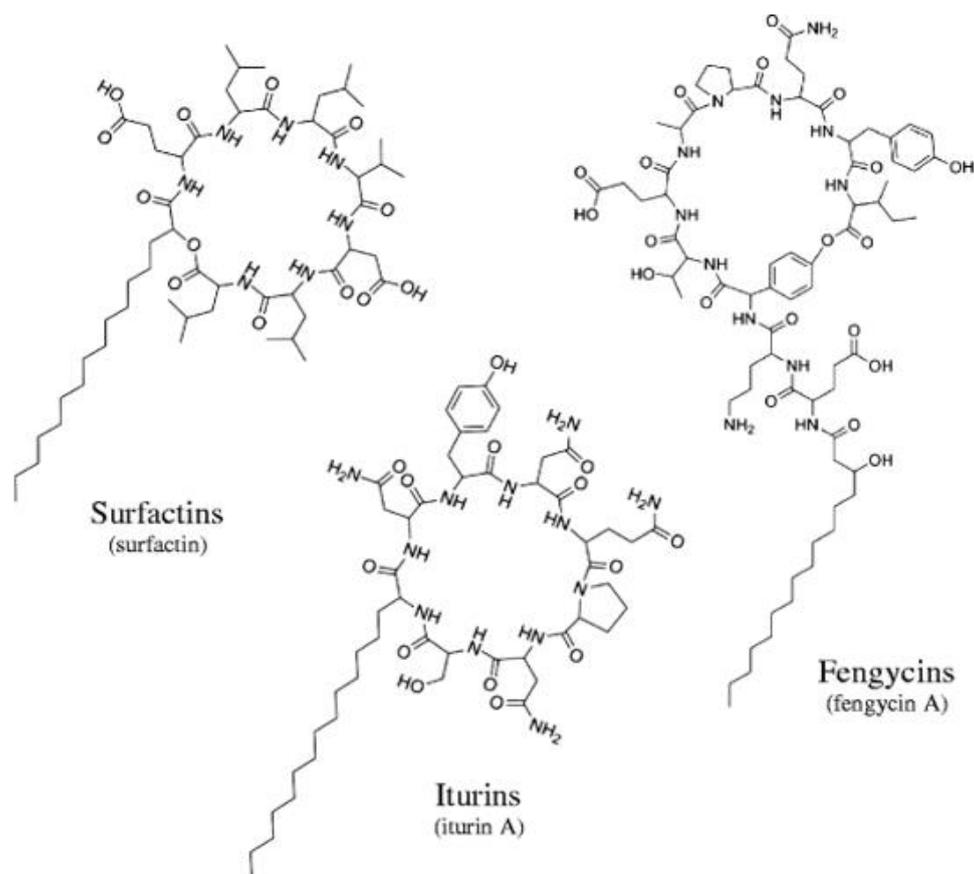


Figure 22 : Structures représentatives des trois principales familles de lipopeptides cycliques : les surfactines, les fengycines et les iturines (d'après de Ongena et Jacques (2008)).

3.3. a Les surfactines

Les surfactines sont des composés heptapeptidiques liés à un acide gras β -hydroxy dont la longueur varie entre 12 et 16 atomes de carbone (Hamley et al., 2013 ; Caulier et al., 2019). Ces LPs sont décrits principalement comme d'excellents tensioactifs d'origine biologique (Ongena et Jacques, 2008 ; Jacques, 2011, Falardeau *et al.*, 2013, Khong *et al.*, 2013). Il a été reporté que les surfactines possèdent des propriétés hémolytiques, antibactériennes et antivirales (Buchoux *et al.*, 2008). Cependant, leur activité antifongique est limitée (Pérez-García *et al.*, 2011). La perception et de la surfactine par la bicouche lipidique de la membrane plasmique végétale induit une ISR (Henry *et al.*, 2011). Le traitement des plants de tabac à la surfactine, induit des réponses précoces de défense telles que l'alcalinisation du milieu extracellulaire et la production des ROS (Henry *et al.* , 2011; Jourdan *et al.* , 2009). Khong *et al.* (2013) ont montré que la surfactine n'avait aucun effet antifongique direct contre *Bgt* quelque soit la concentration testée. La pulvérisation foliaire de la solution de surfactine a assuré une protection de la plante de 41% contre *Bgt*, suggérant un mode d'action lié à une induction des défenses naturelles du blé (Khong *et al.*, 2013). Ainsi en conditions

Synthèse bibliographique

non infectieuses, la surfactine serait capable d'induire l'expression de gènes de défense, tels que les gènes *POX2*, *POX381* codant deux protéines peroxydasiques différentes (Khong *et al.*, 2013). De même, les tests *in vitro* ont révélé que la surfactine n'a pas d'effet sur le développement d'un autre pathogène fongique du blé, *Zymoseptoria tritici* (Le Mire *et al.*, 2018). Le traitement foliaire à la surfactine a conféré une protection du blé de 70% contre *Z. tritici* en induisant les mécanismes de défenses médiés par voies de l'AS et de l'AJ (Le Mire *et al.*, 2018). En effet, la surfactine est capable de stimuler les activités enzymatiques de la PAL et de la POX chez le tabac (Henry *et al.*, 2011 ; Jourdan *et al.*, 2009).

3.3. b Les fengycines

Les fengycines ou les plipastatines sont des lipopeptides composés d'un décapeptide constitué d'une chaîne d'acide gras β -hydroxy de 13 à 19 atomes de carbone (Hamley *et al.*, 2013). Contrairement aux surfactines, les fengycines sont principalement connus pour leur pouvoir antifongique puissant. Cette activité a été particulièrement décrites contre les champignons filamenteux (Deleu *et al.*, 2008). En effet, l'activité antifongique de fengycine a été démontrée contre plusieurs agents pathogènes des plantes : *Plasmodiophora moniliforme*, *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* et *Podosphaera fusca* et *Magnaporthe grisea* (Hu *et al.*, 2007 ; Chan *et al.*, 2009 ; Romero *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2013, Zhang et Sun, 2018). Le traitement des plantes de blé à la fengycine a retardé la croissance de l'agent pathogène *Z. tritici* en diminuant la germination des conidies (Mejri *et al.*, 2018). De plus, il a été démontré que ces LPs peuvent jouer un double rôle dans la protection des plantes contre les agents pathogènes notamment par une activité antimicrobienne directe mais aussi par l'induction d'une résistance systémique contre *B. cinerea* chez la tomate et le haricot (Ongena *et al.*, 2005 ; 2007).

3.3. c Les iturines

La famille des iturines comprenant la bacillomycine, l'iturine et la mycosubtiline, sont des heptapeptides cycliques reliés avec une chaîne latérale β -amino en C14 à C17 (Ongena et Jacques, 2008). Les iturines ont une forte action antifongique *in vitro* mais des activités surfactante et antibactérienne modérées. Cependant, aucun effet antiviral n'a été démontré pour cette famille de LPs (Korenblum *et al.*, 2011, Sachdev *et al.*, 2013). Certaines études ont rapporté la faculté des iturines à provoquer un turgescence et l'éclatement des spores de certains agents pathogènes (Arrebola *et al.*, 2010). En 1949, Walton et Woodruff ont décrit la mycosubtiline comme le premier lipopeptide antifongique produit par *B. subtilis*. La mycosubtiline inhibe la croissance de divers levures et champignons pathogènes, tels que *B. cinerea*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *F. oxysporum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Yarrowiali*

polytica (Nasir et Besson, 2012). L'activation du gène *PRI* chez *A. thaliana* et des gènes *gluc* et *VvI.3* chez la vigne suggère que les voies de signalisation dépendantes de l'AS et l'AJ soient impliquées dans les réponses de défenses induites par la mycosubtiline (Farace *et al.*, 2014).

4. Les Champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

4.1. Généralités

Parmi les micro-organismes telluriques figurent certains champignons qui induisent, au niveau des racines de plantes, des organes nouveaux appelés mycorhizes, les symbioses végétales les plus répandues dans les écosystèmes terrestres (Smith et Read, 2008). Le terme mycorhize fut introduit par Albert Bernhard Frank en 1885, pour désigner l'association des filaments du champignon du sol (du grec : mycos) et les racines (rhiza). Il existe sept types de mycorhizes classés selon leur écologie, leur morphologie et leur structure : les mycorhizes à arbuscules, les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes, les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes, éricoïdes et orchidoïdes (Smith et Read, 1997)

A ce jour, la symbiose mycorhizienne est recensée chez environ 80% à 92% des espèces végétales et ce, dans tous les écosystèmes terrestres y compris les forêts tropicales à tempérées, les déserts, les prairies et les agroécosystèmes (Brundrett, 1991; Read et Perez-Moreno, 2003 ; Wang et Qiu 2006). Cependant, il existe certaines familles de plantes non mycotrophes. En effet, les Brassicacées, Caryophyllacées, Cypéracées, Juncacées, Chénopodiacées et Amarantacées, ne forment pas de mycorhizes (Cardoso et Kuyper, 2006).

L'étude de fossiles du Dévonien supérieur a révélé que les mycorhizes arbusculaires existaient avant même l'apparition des plantes terrestres il y a de ça plus de 460 millions d'années (Stubblefield *et al.*, 1987 ; Remy *et al.*, 1994 ; Redecker *et al.*, 2000). Des données moléculaires ont confirmé leur apparition entre l'Ordovicien et le Dévonien (Simon *et al.*, 1993). Il est désormais admis que leur apparition coïnciderait avec celle des végétaux terrestres il y a 450 millions d'années, suggérant que la symbiose mycorhizienne arbusculaire aurait facilité la transition des plantes du milieu aquatique au milieu terrestre, en promouvant le développement des racines (Brundrett, 2002, Wang et Qui, 2006 ; Humphreys *et al.*, 2010 ; Kenrick & Strullu-Derrien, 2014). Les CMA ont par conséquent directement contribué à l'évolution du monde

vivant, au développement de la biodiversité, à la survie des végétaux et par conséquent à l'équilibre des écosystèmes actuels (Cardon et Whitbeck, 2007).

4.2. Classification des champignons mycorhiziens arbusculaires

Jusqu'en 2001, les champignons mycorhiziens arbusculaires n'appartenaient pas à un groupe monophylétique séparé des autres embranchements de champignons (Morton, 2000). Néanmoins, les analyses moléculaires et phylogénétiques ont permis de classer les champignons mycorhiziens arbusculaires sous le phylum Glomeromycota qui regroupe 18 genres et 4 espèces dont les Glomérales, les Diversisporales, les Paraglomérales et les Archeosporales (Schüßler et Walker, 2011; Redecker *et al.*, 2013).

4.3. Fonctionnement général de la symbiose mycorhizienne arbusculaire

Les CMA sont des biotrophes obligatoires, ils dépendent entièrement de leur plante hôte qui leur fournit les éléments carbonés nécessaires à leur développement (Bonfante et Bianciotto, 1995). L'établissement d'une symbiose mycorhizienne fonctionnelle nécessite une signalisation élaborée entre la plante hôte et le champignon (Genre *et al.*, 2005; Bonfante et Genre, 2010; Choi *et al.*, 2018). La symbiose mycorhizienne est initiée par un échange de molécules de signalisation entre le CMA et la plante (Tamasloukht *et al.*, 2000, Akiyama *et al.*, 2005).

Le cycle de développement des CMA se divise en cinq étapes (Figure 23):

Etape a : Communication pré-symbiotique : les deux symbiotes s'échangent des signaux moléculaires à savoir les buténolides et les oligosaccharides (Waters *et al.*, 2017; Zipfel et Oldroyd, 2017; Limpens *et al.*, 2015). La perception des oligosaccharides fongiques tels que le chitotétraose/chitopentaose (CO4-5) et les mycorhizes-lipooligosaccharides (Myc-LCOs) induit des oscillations calciques dans le rhizoderme pour activer la symbiose (étapes 1,2,3) qui régule l'expression des gènes liés à la pénétration rhizodermique. Elle résulte en la germination des spores et l'émergence d'un mycélium primaire (Tamasloukht *et al.*, 2000; Akiyama *et al.*, 2005). En effet, c'est un dialogue chimique entre le champignon et la racine compatible qui permet la rencontre des deux partenaires. Lors de la détection des exsudats racinaires (*branching factor*) de la plante hôte identifiés comme des strigolactones, le CMA active le métabolisme oxydatif entraînant la croissance du CMA, la germination des spores, la croissance et la ramification de

Synthèse bibliographique

l'hyphes, ce qui augmente les chances du champignon d'entrer en contact avec une racine (Akiyama et Hayashi, 2006; Besserer *et al.*, 2006; 2008; Leonie *et al.*, 2017).

Etape b : Contact racinaire et formation d'un hyphopode (appressoria) : des structures fongiques de fixation, appelées hyphopodes, se forment à la surface des cellules. Les cellules épidermiques sous-jacentes à l'hyphopode subissent un processus particulier spécifique à la mycorhize. Elles forment un appareil de pré-pénétration (PPA) (prepenetration apparatus) qui prédétermine le chemin de la croissance du champignon à travers la cellule végétale de la racine (Genre *et al.*, 2005).

Etape c : Pénétration dans le cortex externe : le mycélium se développe à l'intérieur de la racine pour initier la formation des structures hyper-ramifiées appelées arbuscules, lieu d'échanges entre les deux partenaires (Genre *et al.*, 2005, 2008, 2009).

Etape d : Formation d'arbuscules : la formation des arbuscules permet l'absorption du carbone en échange des éléments minéraux fournis par le champignon. Ces structures ont une durée de vie limitée estimée en moyenne à 8,5 jours (Javot *et al.*, 2007a). Toutefois, ils ne sont actifs que pendant 4 à 5 jours (Taylor, 2010 ; Kobae et Hata, 2010).

Etape e : Formation de vésicules et de spores : d'autres structures telles que les vésicules, structure de stockage riche en triglycérides ou selon les espèces fongiques des spores qui sont des structures de dissémination se forment parfois au sein de la racine (Walker, 1995).

Parallèlement à la colonisation de la racine, le CMA va se développer à l'extérieur de la racine dans le sol. Le mycélium extra-racinaire organisé en un réseau dense d'hyphes, peut explorer le sol environnant afin d'extraire les nutriments au-delà de la rhizosphère (Mikkelsen *et al.*, 2008). C'est aussi à ce niveau-là que le CMA va former de nouvelles spores, ou des chlamydospores complétant ainsi son cycle de vie (Rouphael *et al.*, 2015).

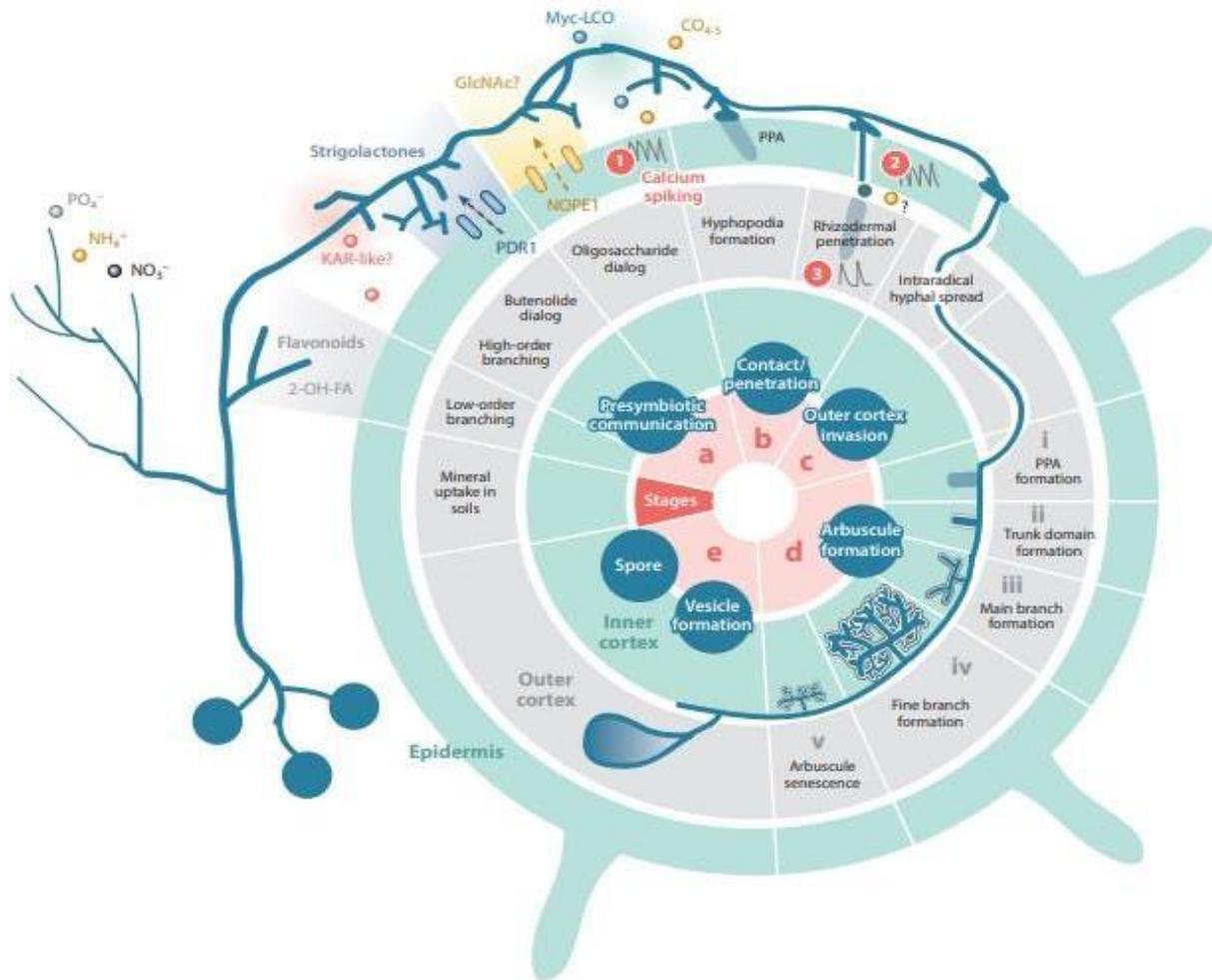


Figure 23 : Cycle de vie d'un champignon mycorhizien à arbuscules (Choi *et al.*, 2018).

4.4. Bénéfices de la symbiose mycorhizienne arbusculaire

Les champignons mycorhiziens à arbuscules peuvent représenter de 5 à 50% de la biomasse microbienne du sol (Cardoso et Kuyper, 2006). La symbiose mycorhizienne est une association mutualiste à bénéfices réciproques entre les deux partenaires de l'association (Harrier et Watson, 2003; Lewis, 1973). Elle est basée sur un échange bi-directionnel de nutriments entre le CMA et la plante hôte. En échange, des photosynthétats apportés par la plante, le CMA améliore la nutrition hydrique et minérale de la plante hôte ainsi que sa tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Les CMA sont également décrits comme des biofertilisants et jouent un rôle important dans la stabilité du sol grâce notamment à la production d'une glycoprotéine, la glomaline (Rajtor et Piotrowska-Sege, 2016) Les interactions mycorhiziennes permettent d'augmenter la productivité de certaines plantes (Jakobsen *et al.*, 1992 ; Cavagnaro *et al.*, 2005).

Par conséquent, la symbiose mycorhizienne apparaît donc comme une stratégie développée par les plantes afin d'assurer leur survie et leur développement (Akinnifesi *et al.*, 2001; Harley et Smith, 1983).

4.5. Bénéfices pour le CMA

En raison de leur faible activité exo-enzymatique, les CMA sont incapables de dégrader les composés organiques du sol (Owen et coll., 2015; Jansa *et al.*, 2019). Ils sont donc essentiellement dépendants des plantes hôtes pour assurer leur cycle complet de développement (Riche *et al.*, 2017).

Les champignons symbiotiques, hétérotrophes, reçoivent des plantes le carbone nécessaire à leur croissance sous forme de glucides et de vitamines (Nagae *et al.*, 2016). Les plantes assurent leur nutrition en leur allouant une part importante de leurs photosynthétats (10 - 20 %) (Leake *et al.*, 2004 ; van der Heijden *et al.*, 2015). En effet, les racines mycorhizées sont des véritables puits de carbone (Douds *et al.*, 2000 ; Bago *et al.*, 2000). La symbiose mycorhizienne entraîne une surexpression des gènes liés aux transporteurs de sucre (SUcrose Transporters (SUTs) et *Sugars Will Eventually Be Exported Transporters (SWEETs)*) ainsi que des gènes codant pour des enzymes de métabolisation du saccharose telles que les saccharoses invertases (Roth et Paszkowski, 2017). Le saccharose est transporté jusqu'aux racines des plantes puis, celui-ci est hydrolysé par les invertases de la paroi cellulaire de l'hôte (Barratt *et al.*, (2009) en monosaccharides à savoir le glucose, le fructose et le mannose (Rich *et al.*, 2017). Le glucose est la principale forme C transférée au CMA à l'interface plante-champignon (Helber *etal.*, 2011 ; Ait Lahmidi *et al.* , 2016) (Figure 24).

Ces hexoses, passent à travers la membrane plasmique végétale jusqu'à l'interface symbiotique grâce à un transport passif (Schaarschmidt *et al.*, 2007). Ils sont ensuite transférés de l'apoplaste aux champignons mycorhiziens par des transporteurs fongiques tel que MST1 et MST2 (monosaccharide transporter) (Schüßler *et al.*, 2006 ; Helber *et al.*, 2011; Mohanta et Bae, 2015). Les hexoses sont stockés au niveau des spores et vésicules sous forme de tréhalose et en quantités plus faibles sous forme de glycogène (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Riche *et al.*, 2017). Ils seront par la suite distribués dans les parties extraracinaires du champignon mycorhizien (Bago *et al.*, 2000).

Synthèse bibliographique

Plus récemment, la découverte d'une voie de biosynthèse lipidique spécifique au CMA dans les cellules contenant des arbuscules suggère qu'outre les glucides, les acides gras sont transportés jusqu'au CMA et représentent une source majeure de carbone organique fournie au champignon (Jiang *et al.*, 2017 ; Luginbuehl *et al.*, 2017).

Des études récentes sur des mutants de *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* ont démontré que plusieurs gènes associés à la biosynthèse et à l'exportation des lipides sous forme d'acides gras sont induits à savoir les thioesterases (*FatM*) et le glycérol-3-phosphate acyltransférase *RAM2* qui sont nécessaires pour l'établissement d'une symbiose mycorhizienne fonctionnelle (Gomez *et al.*, 2009 ; Gobbato *et al.*, 2013 ; Bravo *et al.*, 2016, 2017; Jiang *et al.*, 2017; Keymer *et al.*, 2017; Luginbuehl *et al.*, 2017, Brands *et al.*, 2018). Il a été suggéré que le *FatM* et le *RAM2* régulent en aval la synthèse de l'acide palmitique (C16:0) et du 2- monopalmitine (β -MonoAcylGlycérol) (β -MAG), un monoglycéride (Luginbuehl et Oldroyd, 2017; Luginbuehl *et al.*, 2017). Ce dernier est ensuite transféré à travers la membrane péri- arbusculaire au CMA via des transporteurs lipidiques STR et STR2 (Gutjahr *et al.*, 2012; Bravo *et al.*, 2017; Roth et Paszkowski, 2017). D'autres part, Wang *et al.*, (2017 a, b), ont rapporté que l'expression de ces deux transporteurs (STR et STR2) est réprimée en présence de fortes teneurs en P.

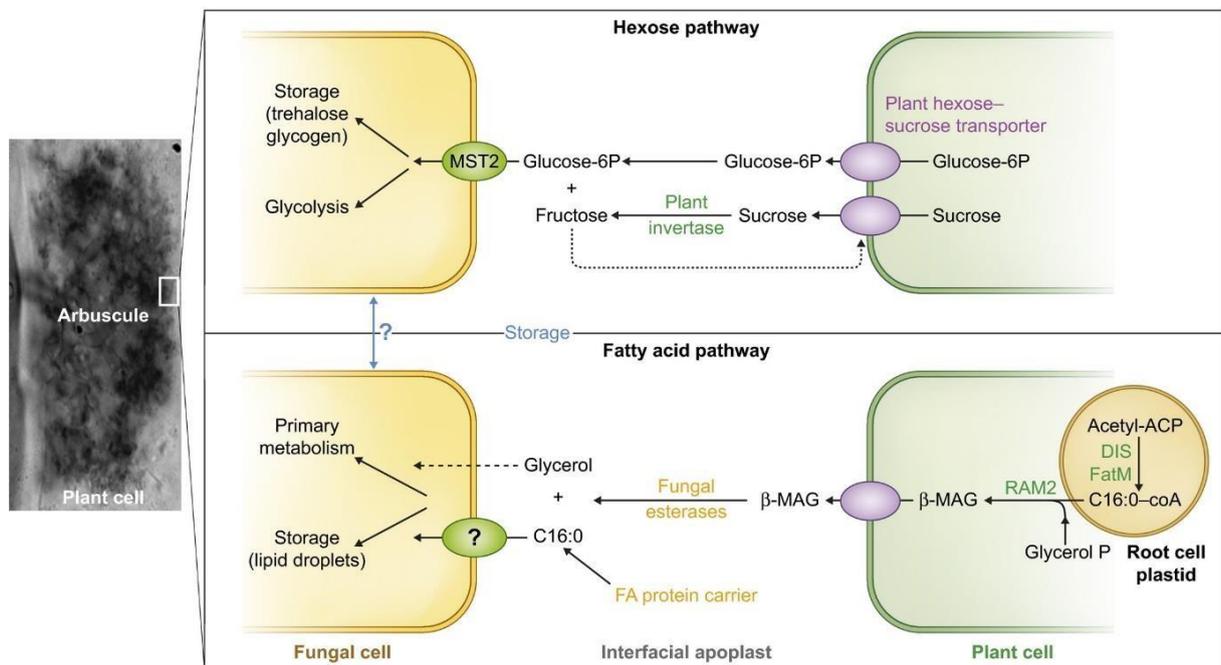


Figure 24 : Transfert du carbone sous forme de sucres et de lipides au niveau de l'interface biotrophique de la plante hôte et le champignon arbusculaire mycorhizien (Wipf *et al.*, 2019).

4.6. Bénéfices pour la plante

4.6. a Nutrition hydrique

Les bénéfices nutritionnels de l'interaction plante-CMA ont été largement examinés notamment sur les niveaux physiologiques et moléculaires (Harrison et al. 2002 ; Paszkowski *et al.*, 2002 ; Nagy *et al.*, 2005; Bucher 2007; Smith et Smith, 2011; 2012). En effet, les CMA ne sont pas qu'une simple extension du système racinaire. Les interactions mycorhiziennes impliquent des changements des caractéristiques structurales et fonctionnelles des racines (Harley et Smith, 1983). Elles sont susceptibles d'affecter l'acquisition des ressources hydriques par la plante de différentes manières telles que : l'amélioration de l'exploitation du sol par les racines, les changements hormonaux et la régulation osmotique (Augé, 2001). En effet, une meilleure disponibilité de phosphore (élément-clef des métabolismes énergétiques) et du potassium (impliqué dans les modifications osmotiques rapides) améliore la photosynthèse et la croissance de la plante (Augé, 2001 ; Bondonga *et al.*, 2011).

4.6. b Nutrition minérale

Outre l'amélioration de la nutrition hydrique, les plantes mycorhizées, présentent une assimilation accrue des nutriments peu mobiles du sol [phosphore (P), zinc (Zn), calcium (Ca), potassium(K) magnésium (Mg), fer (Fe)] (Sjöberg 2005 ; Smith et Read 2008 ; Cornejo *et al.*, 2008a , 2008b , 2009; Kaya *et al.*, 2009 ; Campanelli *et al.*, 2012 ;. Evelin *et al.*, 2012; Garg et Bhandari, 2016).

Le P est l'un des nutriments minéraux les plus étudiés dans le cadre de la symbiose mycorhizienne. Du fait de son absorption rapide par la plante et de sa faible mobilité dans le sol, une zone d'appauvrissement autour des racines est rapidement observée (Smith et Read 2008). Le mycélium extra-racinaire permettra à la plante d'accéder aux pools de P du sol se trouvant au-delà de la zone d'appauvrissement des racines et inaccessibles à la plante (Allen., 2007). Le CMA possède des phosphatases qui jouent un rôle clef dans le processus de la minéralisation et de l'immobilisation du P organique (ShoaibRana *et al.*, 2020). En effet, l'activité des phosphatases dépend de la concentration du P organique du sol (Spohn et Kuzyakov, 2013). Dans des conditions de déficit en P, les phosphatases sont capables d'hydrolyser le P organique en P inorganique (Pi) et d'assurer son transfert à la plante via des transporteurs de Pi spécifiques (Bucher, 2007 ; Smith *et al.*, 2011). Des transporteurs de Pi ont

Synthèse bibliographique

été identifiés chez les solanacées mycorhizés par le CMA *Fm* à savoir (*TR1ae; Pht1;myc,*) pour le blé (*ZEAm; Pht1;6*) pour le maïs et (*HORvu; Pht1;8*) chez l'orge (Glassop *et al.*, 2005).

Certains CMA sont capables d'allouer jusqu'à 100% des besoins en Pi de la plante. (Smith *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2012). Des études ont montré que l'inoculation mycorhizienne augmente la teneur en P des parties aériennes du blé de 27% (culture en pots) et de 16 % (culture en champs) (Talukdar et Germida, 1994 , Al-Karaki et Clark, 1999 , Graham et Abbott, 2000).

Les CMA sont capables également de fournir à la plante d'autres éléments minéraux tels que l'azote (N), le zinc (Zn) ou le soufre (S) (Allen et Shachar-Hill, 2009; Sieh *et al.*, 2013., Jansa *et al.*, 2019). Contrairement aux éléments nutritifs K, S, Mg, Ca et Fe, la teneur élevée en azote et en phosphore dans le sol peut influencer la colonisation de la plante par les CMA. En effet, lorsque la concentration de N est abondante dans la rhizosphère, l'efficacité de la relation symbiotique est moins importante (Miransari 2013 ; Nouri *et al.*, 2014). Ainsi les plantes seraient capables de favoriser ou de limiter la colonisation par les CMA en fonction de leurs besoins (Nouri *et al.*, 2014).

4.6. c Biofertilisation

L'amélioration de l'assimilation des éléments minéraux et l'augmentation de la croissance des plantes en association mycorhizienne présentent les principaux intérêts des CMA en tant que biofertilisants (Sofi *et al.*, 2017 ; Sadhana, 2014). L'utilisation de ces bioinoculants dans les conditions optimales aboutit à l'obtention d'un niveau de production rentable avec des faibles doses d'engrais tout en réduisant les coûts d'engrais et les risques environnementaux des pesticides (Kour *et al.*, 2020). De plus, il a été démontré que les CMA stimulent la microbiote de la rhizosphère et interviennent dans la macroagrégation des constituants du sol (Tisdall, 1991). En effet, l'amélioration de la stabilité des agrégats et la productivité du sol ainsi que la promotion de la santé des plantes font des CMA une alternative, éco-responsable, aux intrants chimiques (Sofi *et al.*, 2017).

4.6. d Protection contre les agents pathogènes

Les bénéfices de la symbiose mycorhizienne vont au-delà d'une amélioration de la nutrition minérale et hydrique. Elle favorise par ailleurs une protection des plantes mycorhizées contre les stress abiotiques (sécheresse, salinité), plusieurs agents pathogènes racinaires et certains agents pathogènes foliaires (Whipps, 2004 ; Comby *et al.*, 2017). Plusieurs mécanismes d'action

Synthèse bibliographique

liés à la symbiose mycorhizienne impliquant des modifications physiologiques et moléculaires pourraient expliquer la résistance accrue des plantes :

- L'amélioration de l'état nutritionnel et la promotion de la croissance des plantes peuvent compenser les dommages causés par les pathogènes (Rouphael *et al.*, 2015).
- La modification du système racinaire : les CMA favorisent l'épaississement des racines et leur ramification (Matsubara *et al.*, 1995 ; Singh et Giri., 2017). Les changements de l'architecture racinaire chez les plantes mycorhizées pourraient réduire le nombre de sites d'infection pour des agents pathogènes (Fusconi *et al.*, 1999 ; Harrison, 2005). En effet, les racines primaires sont généralement la cible de certains agents pathogènes tels que les nématodes (Stoffelen *et al.*, 2000 ; Wyss 2002 ; Elsen *et al.*, 2003; Curtis *et al.*, 2009).
- La structure des communautés microbiennes associées aux racines des plantes est fortement dépendante de la quantité et de la qualité des exsudats racinaires. La colonisation par le CMA peut conduire à une évolution de la qualité et la quantité des exsudats racinaires (Sood, 2003; Pivato *et al.*, 2008) et ainsi modifier la structures des communautés microbiennes rhizosphériques. En effet, les exsudats des racines mycorhizées sont des chimio-attracteurs de certaines bactéries PGPR telles que *Azotobacter chroococcum* et *Pseudomonas fluorescens* qui peuvent conférer une résistance chez les plantes (Sood, 2003). Ces changements peuvent notamment augmenter la synthèse des composés ayant des activités antagonistes à certains pathogènes racinaires. Siasou *et al.* (2009) ont démontré que de *P. fluorescens* protégeait les plantes de blé mycorhizées par *R. irregularis* contre l'ascomycète *Gaeumannomyces graminis* Var. *tritici* en produisant le 2,4-diacetylphloroglucinol, un antibiotique à large spectre (Thomashow et Weller, 1996).
- La compétition directe des CMA avec les microorganismes antagonistes : en effet, les agents pathogènes et les champignons mycorhiziens partagent un espace rhizosphérique identique ainsi que les mêmes ressources nutritives. Cependant, il a été suggéré que l'effet de protection du CMA peut être corrélé positivement avec le degré de colonisation (Vierheilig *et al.*, 2008). En effet, un niveau critique de mycorhization est considéré comme une condition préalable pour le biocontrôle, souvent caractérisé par la présence d'arbuscules, bien que cela soit plus susceptible lié à l'induction des mécanismes de résistance qu'à la concurrence directe (Pozo et Azcon-Aguilar, 2007).

Synthèse bibliographique

- La mise en place d'une résistance locale et systémique induite par les CMA chez les plantes mycorhizées: En tant que biotrophes obligatoires, les CMA sont capables de déclencher des réactions de défense des plantes lors des premières étapes de la colonisation racinaires (Paszkowski, 2006). En effet, plusieurs études ont rapporté l'accumulation des phytoalexines, de protéines PR, de callose, de glycoprotéines riches en hydroxyproline, des composés phénoliques, ainsi que la stimulation de l'activité d'enzymes hydrolytiques y compris les chitinases, et les β -1,3-glucanases (Dalpé, 2005 ; Singh et Giri., 2017). En effet, la résistance induite par les mycorhizes (MIR) consiste en un réarrangement métabolique et se traduit par l'induction ou la suppression de certains mécanismes de défense. Elle est généralement liée à l'accumulation de certains métabolites secondaires (Singh, 2017). Par ailleurs, les phytohormones AS, AJ et l'ET sont également régulées lors de la symbiose mycorhizienne et sont fortement impliquées dans la protection des plantes mycorhizées contre les stress biotiques (Van Wees *et al.*, 2008). Les effets de la symbiose des CMA-plante hôte ont été démontré pour réduire principalement les dommages causés par les pathogènes du sol tels que les champignons oomycètes en particulier les genres *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Phytophthora* et *Pythium* ainsi que les nématodes en particulier les genres *Pratylenchus* et *Meloidogyne* (Pinochet *et al.*, 1996 ; Whipps 2004 ; De la Peña *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2006 ; Elsen *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2012). Contrairement aux agents pathogènes racinaires, peu de travaux ont été menés sur la protection conférée par les CMA contre les maladies foliaires et les résultats sont parfois contradictoires (Pozo, 2013). Mustafa *et al.* (2016 ; 2017) ont étudié la réponse du blé mycorhizé avec *F.mosseae* et *R. irregularis* suite à l'infection par *Bgt*. Ces travaux ont montré que le nombre d'haustoria était significativement réduit au niveau des cellules épidermiques des feuilles de blé, atténuant ainsi l'apparition de l'oïdium avec une protection de 74% et 34% par *F. mosseae* et *R. irregularis* respectivement. De plus, une accumulation de composés polyphénoliques et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) aux sites d'infection de *Bgt* et au niveau de la cellule entière, a été observée chez le blé mycorhizé par ces deux CMA (Mustafa *et al.* 2016, 2017).

RESULTATS & DISCUSSIONS

Résultats et discussions

Chapitre II

Criblage de molécules et d'inoculums fongiques efficaces contre l'oïdium du blé

Résultats et discussions

1. Introduction

La première phase du projet Bioscreen a consisté en l'identification de nouvelles molécules, majoritairement d'origine biologique et présentant divers modes d'action, pour le biocontrôle de différents agents phytopathogènes, afin de réduire l'usage des produits phytosanitaires potentiellement nocifs pour l'Homme et l'Environnement. En amont de nos travaux réalisés chez le blé, la mise en place d'une plateforme de criblage à haut débit au sein du projet Bioscreen a permis une première sélection de produits montrant une efficacité vis-à-vis de divers agents phytopathogènes, qu'il s'agisse d'un effet biofongicide et/ou un effet inducteur de défenses naturelles chez les plantes (SDP). Quatre principales familles de produits ont été testées dans le cadre de cette étude notamment les rhamnolipides, les lipopeptides, les cyclodextrines et un chito-oligosaccharide.

D'autres méthodes de biocontrôle font appel à des microorganismes vivants bénéfiques connus pour être capables de stimuler les défenses naturelles des plantes. Les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) ont souvent été étudiés comme agents de biocontrôle contre les maladies racinaires (Miozzi et al., 2019), mais beaucoup plus rarement contre les maladies aériennes des plantes (Comby et al., 2018).

Afin d'optimiser l'efficacité des traitements de biocontrôle, nous nous proposons dans le cadre de ce travail de thèse de combiner ces deux types de traitements, à savoir un traitement foliaire à base de molécules à effet SDP et/ou antifongique, et un traitement racinaire à base d'un inoculum mycorhizien, pour lutter plus efficacement contre *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, agent pathogène fongique aérien et biotrophe, responsable de l'oïdium chez le blé. Les études examinant la protection des CMA contre certains agents fongiques aériens notamment biotrophes sont rares et parfois contradictoires (Pozo et Aguilar 2007 ; Jung et al., 2012, Comby et al., 2018). En effet, en fonction de l'espèce végétale, du CMA et/ou des conditions expérimentales, l'inoculation mycorhizienne peut engendrer une réduction ou augmentation de la sensibilité à divers agents pathogènes foliaires biotrophes (Panstruga et Kuhn, 2019). Récemment, Mustafa et al., (2016, 2017) ont étudié les bénéfices d'une inoculation du blé avec *Funneliformis mosseae* (*Fm*) et *Rhizophagus irregularis* (*Ri*) en termes de protection contre *B. graminis*. Ces travaux ont montré que l'inoculation mycorhizienne a atténué l'apparition des symptômes de la maladie, confirmant la mise en place d'une protection contre l'oïdium du blé.

Ainsi, la démarche générale suivie dans ce travail est la suivante :

- 1- Dans un premier temps, un criblage de quatorze molécules appartenant à des familles de natures chimiques différentes (rhamnolipides, lipopeptides, cyclodextrines et chito-oligosaccharides) a été réalisé afin d'évaluer leurs effets protecteurs *in planta* contre *B. graminis*.
- 2- Par la suite des essais *in vitro* ont été mis en place afin de tester l'effet direct de ces molécules sur la germination des spores de *B. graminis*.
- 3- Enfin, plusieurs inoculums racinaires bénéfiques ont été testés quant à leur capacité de colonisation des racines de blé et à leur efficacité protectrice du blé contre l'oïdium. Ainsi, différents inoculums mycorhiziens, (Fm, Ri, Symbivit® Pro et Agtiv®), ainsi qu'un champignon endophyte (*Trichoderma harzianum*) ont été testés afin de sélectionner le meilleur inoculum fongique racinaire capable d'induire une protection efficace du blé contre *B. graminis*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels végétal, fongique et produits testés.

Les expérimentations ont été réalisées sur deux cultivars de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), Pakito et Alixan fournis par RAGT (Rodez, France). En raison de son retrait du marché, le cultivar Pakito initialement utilisé a été ensuite remplacé par Alixan pour la suite des expérimentations. Les deux cultivars Pakito et Alixan sont respectivement assez sensible (4) et peu sensible (6) à *B. graminis*. Une échelle de sensibilité / résistance à *B. graminis* a été établie chez le blé, qui s'échelonne entre 1 à 9, où le niveau (1) correspond à une variété sensible et le niveau (9) désigne une variété résistante à la maladie (D'après CTP et Arvalis – Institut du Végétal – Fiches variétés consulté : 08/2020).

Ces deux cultivars ont été infectés par le champignon biotrophe *B. graminis*, dont la souche utilisée est MPEbgt1 (Dr M.-P. Latorse de Bayer Crop Science, Lyon, France). Chaque semaine, le champignon est inoculé et maintenu sur des plants de blé du cultivar Alixan (RAGT, France) âgés de 10 jours (Randoux et al. 2006). Après 12 jours de culture, les spores asexuées formées sont prélevées et utilisées dans les différentes expérimentations ou pour le renouvellement de la souche.

2.1. a Molécules candidates

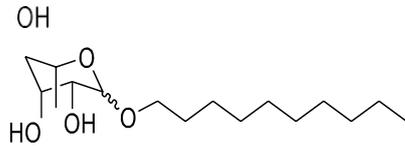
Pour les traitements foliaires, douze molécules et deux mélanges de molécules appartenant à quatre familles différentes (Tableau 6, Figure 25), ont été fournies par les partenaires du Projet Bioscreen :

Tableau 6 : Familles et noms des molécules testées

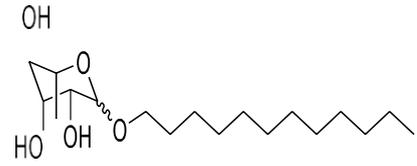
Rhamnolipides	Lipopeptides	Cyclodextrines	Chito-oligosaccharide
(IUT Béthune et Université d'Artois)	(Lipofabrik)	(UCEIV)	(MateriaNova)
Rh- Ether C10	Mycosubtiline	α -CD	BioA 187
Rh-Ether C12	Surfactine	β -CD	
Rh-Ester C12	Fengycine	δ -CD	
Rh-Succinate C12	Mix 1: Mycosubtiline + Surfactine: M+S (80:20w/w)	RAMEB : β - cyclodextrine méthylée	
	Mix 2 (Mycosubtiline + Surfactine + Fengycine M+S+F (30 :20 :50w/w/w)		

i) **Les rhamnolipides:**

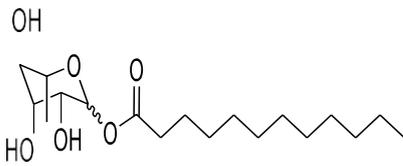
Rh-Eth-C10



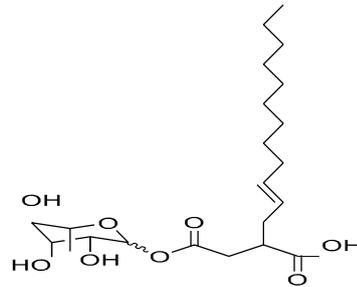
Rh-Eth-C12



Rh-Est-C12

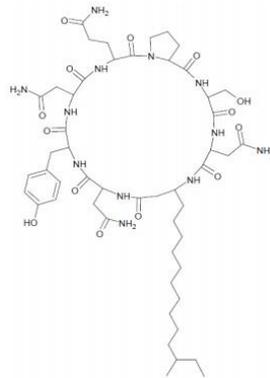


Rh-Succ C12

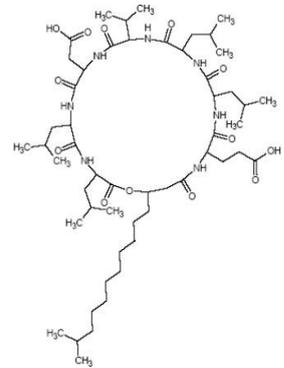


ii) **Les lipopeptides:**

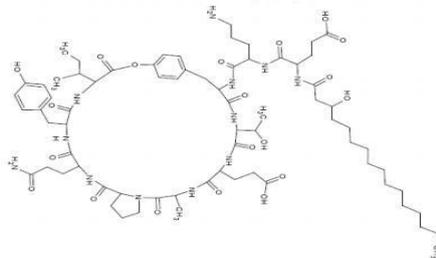
Mycosubtiline



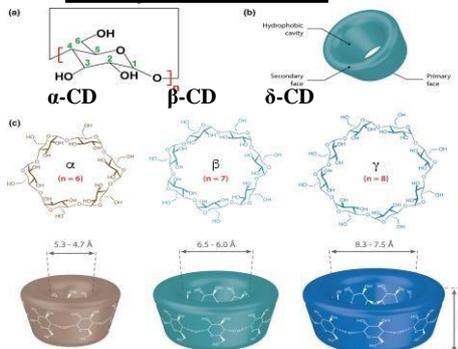
Surfactine



Fengycine



iii) **Les cyclodextrines:**



iv) **Le chito-oligosaccharide: BioA 187**

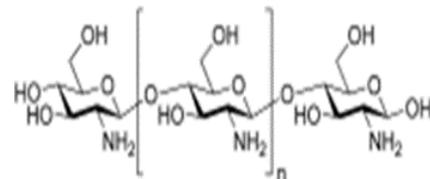


Figure 25 : Structures chimiques des molécules testées.

2.1. b Inoculums fongiques racinaires bénéfiques testés

Dans le cadre de ce travail, différents inoculums mycorhiziens ont été testés. Le premier type repose sur l'encapsulation dans des billes d'alginate des propagules de deux champignons, utilisés séparément ou en combinaison : le CMA *Rhizophagus irregularis* (Ri) (MUCL41833, 27 propagules/bille) et le champignon endophyte *Trichoderma harzianum* (29707, 10 conidies/bille). Ces inoculums ont été produits par le laboratoire *Earth and Life Institute, Applied microbiology, Mycology* de l'Université Catholique de Louvain La Neuve (Belgique). Des billes d'alginate vides et des billes d'alginate contenant des propagules de CMA et du champignon endophyte autoclavées pendant 20 minutes à 121°C (1 bar) ont été testées comme témoins négatifs.

L'inoculation des plantes avec le champignon mycorhizien arbusculaire *Ri* (Błaszczak, Wubet, Renker et Buscot) MUCL 41833 a été réalisée en utilisant des plugs de gélose de 2 cm² contenant des spores et hyphes, provenant d'une culture de racines de carottes transformées (*Daucus carota* L.) colonisées par *Ri* dans des boîtes bi-compartmentées sur un milieu Strullu-Romand modifié (MSR) comme décrit par Cranenbrouck et al. (2005). Les plugs de *Ri* (MUCL 41833) ont été fournis par la collection *in vitro* Glomeromycota (GINCO : www.mycorrhiza.be/ginco-bel).

En plus, trois inoculums commerciaux ont été testés :

- *Funneliformis mosseae* Fm (10 propagules/g FRI40, MycAgro Lab., Bretenière, France).
- Symbivit ® Pro, contenant 6 espèces de CMA : *Claroideoglossum etunicatum*, *C. claroideum*, *Glomus microaggregatum*, *F. geosporum*, *Ri* et *Fm* (1000 propagules/g *Inoculum Plus*, France).
- Aktiv ® specialty crops contenant uniquement *Ri* (DAOM197198, 12000 propagules/g (*Premier Tech*, Canada)).

2.2. Conditions de culture des plantules de blé

Les plantules de blé utilisées pour les tests de criblage ont été cultivées dans des armoires de croissance (Panasonic, MLR-352H) en conditions contrôlées avec une humidité relative de 70%, une photopériode 12/12 (h), une intensité lumineuse de 250 µmol/m²/s, une température de jour de 18°C et une température de nuit de 12 °C (Randoux et al., 2006).

Les tests de criblage des molécules ont été menés sur des plantules du cultivar Pakito. Les grains de blé sont mis à tremper 24 heures dans l'eau, puis mis à germer dans des barquettes contenant 960 g de terreau (Jardiland, Calais, France ; Composition : NPK 18-10-20 à 1,2 kg/m³ avec oligoéléments (B 0,03%, Cu 0,13%, Fe 0,09% (chélaté Fe EDTA), Mn 0,17%, Mo 0,05%, Zn 0,04%)), à raison de 24 plantules par barquette. Les plantules ont été ensuite arrosées régulièrement avec de l'eau de robinet, en volumes identiques deux fois par semaine.

Les plantules de blé cultivées en présence d'inoculum racinaire ont été réalisées sur le cultivar Alixan et cultivées sur un substrat inerte composé de sable, de perlite et de vermiculite (4 : 1 : 1, v/v/v). Les plantules ont été arrosées avec de l'eau distillée et avec 50 ml de solution nutritive de Hoagland P/2, par pot et par semaine (Hoagland et Arnon, 1950 ; Mustafa et al., 2016).

2.3. Traitement des plantules

2.3. a Application des molécules

Les molécules sont appliquées à une concentration de 100µM par pulvérisation foliaire sur les plantules de blé. Cette concentration a été recommandée par les partenaires du projet BioScreen et est considérée comme la dose maximale applicable pour des raisons de rentabilité économique. Les plantules de blé traitées par l'eau ou le DMSO 0,1% ont été utilisées comme témoins. En effet, les rhamnolipides, les lipopeptides et le chito-oligosaccharide ont été solubilisés dans le DMSO à 0,1%. Seules les cyclodextrines ont été solubilisées dans de l'eau ultra pure. Les molécules sont appliquées à l'aide d'un pulvérisateur (ITW Surfaces et Finitions, Valence, France), afin que la partie aérienne de la plante soit totalement couverte. Pour la première étape de criblage des molécules, les plantules de blé sont cultivées pendant 3 semaines sur terreau, 15 ml de solution sont utilisés pour les 24 plantules d'une barquette. Dans le cas des plantules âgées de 3 semaines, cultivées en pots, 15 ml de solution sont pulvérisés sur 15 plantules réparties dans 3 pots.

2.3. b Applications des inoculums fongiques racinaires

Les grains de blé (cv. Alixan) hydratés pendant 24 heures, sont cultivés dans des pots contenant 600 g de substrat artificiel composé de sable, de perlite et de vermiculite (2 : 1 : 1, v / v / v). Le mélange est autoclavé deux fois durant 50 min à 127 °C afin d'éliminer les populations microbiennes qui pourraient être présentes, notamment les spores de CMA indigènes (Pellegrino et al., 2015).

Les plantes témoins non mycorhizées sont cultivées sur un substrat autoclavé en absence de tout traitement racinaire. Concernant les traitements avec des inoculum à base de billes d'alginate (billes d'alginate vides ou contenant les inoculum (*Ri*, *T. harzianum* et *Ri + T. harzianum*)), celles-ci ont été apportées à raison de 400 billes par pot. Pour les plantes de blé traitées par *Ri* sous sa forme non encapsulée, ce CMA a été additionné en plug de 2cm² (un mélange d'hyphes et de spores) au substrat de culture. Les plantes cultivées en présence du *Fm*, l'inoculum mycorhizien est ajouté dans chaque pot à raison de 10% du poids total du substrat. Pour Symbivit ® Pro et Aktiv ®, 2 grammes de chaque inoculum ont été additionnés directement dans le pot contenant le mélange de sable, perlite et vermiculite.

2.4. Évaluation des taux de protection contre *B. graminis*

Deux jours après le traitement foliaire par les molécules, les plantules âgées de 3 ou de 6 semaines, sont infectées avec une suspension de spores de *B. graminis*. Les spores sont prélevées à l'aide d'une pompe à vide et sont suspendues dans un liquide électronique et chimiquement stable FC43 (heptacosafuorotributhylamine ou Fluorinert, 3M™ Cergy-Pontoise, France). La suspension des spores est calibrée à 500.000 spores mL⁻¹ à l'aide d'une cellule de Malassez (Tayeh et al., 2013) et 7,5 mL de la solution sont appliqués sur les plantules en barquette ou en pot à l'aide du pulvérisateur (ITW Surfaces et Finitions, Valence, France). Douze jours après l'infection par *B. graminis*, l'expression des symptômes est évaluée par comptage des colonies fongiques blanches sur les deux faces de la 3^{ème} feuille (Randoux et al., 2006). Les taux de protection sont calculés en appliquant la formule suivante (Reignault et al., 2001) :

$$\text{Taux de protection} = 100 \times (\text{Nombre de colonies sur les plantes témoins} - \text{Nombre de colonies sur les plantes traitées}) / \text{Nombre de colonies sur les plantes témoins}$$

2.5. Détermination des taux de colonisation des racines

Les taux de colonisation mycorhizienne ainsi que les taux de colonisation par *Trichoderma harzianum* sont déterminés pour chaque condition à partir de racines issues de plantules de blé cultivées dans 3 pots différents. Après 8 semaines de culture, les racines ont été prélevées, lavées pour éliminer le substrat et rincées à l'eau distillée. Les racines sont ensuite coupées et placées dans des tubes Falcon de 50 mL puis éclaircies dans une solution de KOH 10% (v/v)

Résultats et discussions

pendant 1h à 70°C. La solution de KOH est ensuite éliminée et les racines sont lavées avec de l'HCl 1%. Elles sont colorées pendant 1 heure à 70°C au bleu de Trypan 0,05% (0,5g de bleu Trypan/ L dans un mélange d'eau, glycérol et acide lactique (1 :1 :1, v/v/v) puis conservées à 4°C (Phillips et Hayman 1970).

Après coloration, 45 fragments racinaires de 1 cm issus du même pot ont été placés entre lame et lamelle, à raison de 15 fragments par lame et 3 lames par pot, et observés au microscope optique (Gx40). Trois lectures par fragment ont été réalisées soit 405 lectures par condition (3 pots, 45 fragments par pot et 3 lectures par fragment).

À chaque intersection entre l'axe de l'objectif et le fragment racinaire, la présence ou l'absence de structures fongiques spécifiques des CMA a été notée (Figure 26). Les taux de mycorhization total, arbusculaire et vésiculaire ont été déterminés selon les équations suivantes (McGonigle et al. 1990) :

$$\text{Taux de mycorhization totale} = 100x \frac{N - P}{N}$$

$$\text{Taux de mycorhization arbusculaire} = 100x \frac{A + AV}{N}$$

$$\text{Taux de mycorhization vésiculaire} = 100x \frac{V + AV}{N}$$

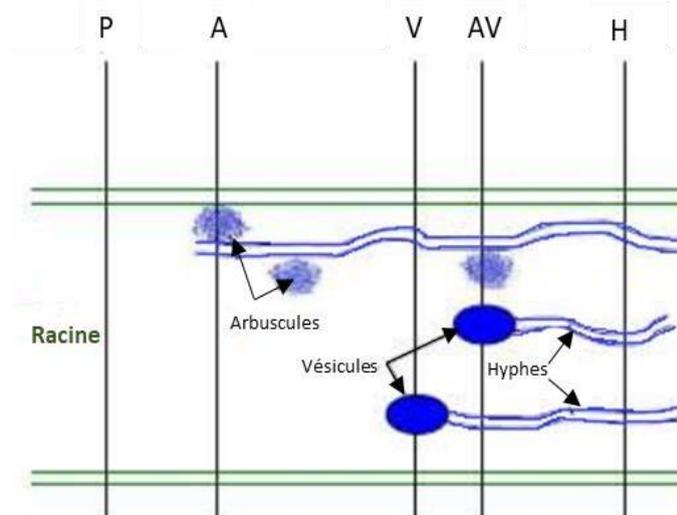


Figure 26 : Evaluation des différentes structures mycorhiziennes.

Résultats et discussions

Avec N : Nombre total d'observations avec une structure fongique (H + A + AV + V) (3x15), P : nombre d'observations sans aucune structure fongique, A : avec présence d'arbuscules, V : avec présence des vésicules, AV : avec présence d'arbuscules et de vésicules, H : présence d'hyphes en absence d'arbuscules et de vésicules.

Le pourcentage de colonisation des racines par *Trichoderma* a été calculé à partir du nombre de fragments de racines colonisées par un mycélium de *T. harzianum* suivant ci-dessous :

$$\text{Taux de colonisation} = 100x \frac{\text{Nombre total des fragments de racines observés} - \text{Nombre de fragments colonisés par des hyphes septées}}{\text{Nombre total des fragments de racines observés}}$$

2.6. Evaluation de l'effet direct des molécules testées sur la germination des spores de *B. graminis* in vitro

L'effet direct des molécules sur la germination des spores de *B. graminis* est évalué dans des boîtes de Petri contenant de l'agar à 12 g.L⁻¹ préparé dans de l'eau déminéralisée. Chacune des molécules (ou un mélange de molécules) a été mélangée à ce support de culture autoclavé avant solidification, avec une gamme de concentrations croissantes (50, 100, 200, 300 µM), le témoin étant un milieu contenant uniquement du DMSO 0.1% ou de l'H₂O. Les spores de *B. graminis* sont dispersées sur deux boîtes de Petri pour chaque traitement et concentration, puis observées après 48 heures afin de mettre en évidence un éventuel effet anti-germinatif ou fongicide des produits. Environ 200 spores par traitement et par concentration ont été dénombrées et classées dans différentes catégories : non germées (1.a), germées avec des tubes germinatifs appressoriaux (TGA) avortés (1.b), germées avec un petit TGA (2), avec un long TGA (3) ou avec plusieurs TGA (4) (Figure 27).

Résultats et discussions

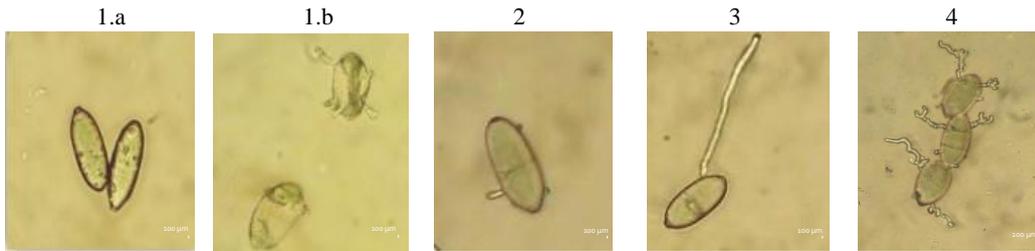


Figure 27 : Différentes catégories de germination des spores de *B. graminis in vitro* : non germées (1.a), germées avec des tubes germinatifs appressoriaux (TGA) avortés (1.b), germées avec un petit TGA (2), avec un long TGA (3) ou avec plusieurs TGA (4).

La répartition des spores par catégorie est ensuite exprimée en taux selon la formule suivante :

$$\begin{aligned} & \text{Taux des spores d'une catégorie} \\ & = 100 \times \frac{\text{Nombre de spores comptées dans la catégorie}}{\text{Nombre total des spores observées}} \end{aligned}$$

2.7. Traitement des données

Les tests statistiques ont été réalisés à partir de 3 réplicats avec le logiciel XLStat. Pour l'ensemble des résultats obtenus, le test de Shapiro-Wilk et le test de Bartlett ont été utilisés pour vérifier la normalité des échantillons. Les résultats ont été analysés en utilisant une analyse de variance (ANOVA), suivie par une comparaison multiple par le test de Tukey ($P < 0,05$). Les données quantitatives ont été décrites par leur moyenne et leur écart type. Pour normaliser les données présentées en pourcentages, à savoir les taux de germination des spores de *B. graminis* et les taux de mycorhization, celles-ci ont été transformées en coordonnées angulaires (arc sinus de la racine carrée : $p' = \arcsin \sqrt{p}$), avant l'analyse statistique.

3. Résultats

3.1. Criblage des molécules

3.1. a Test de protection *in planta* par les molécules contre *B. graminis*

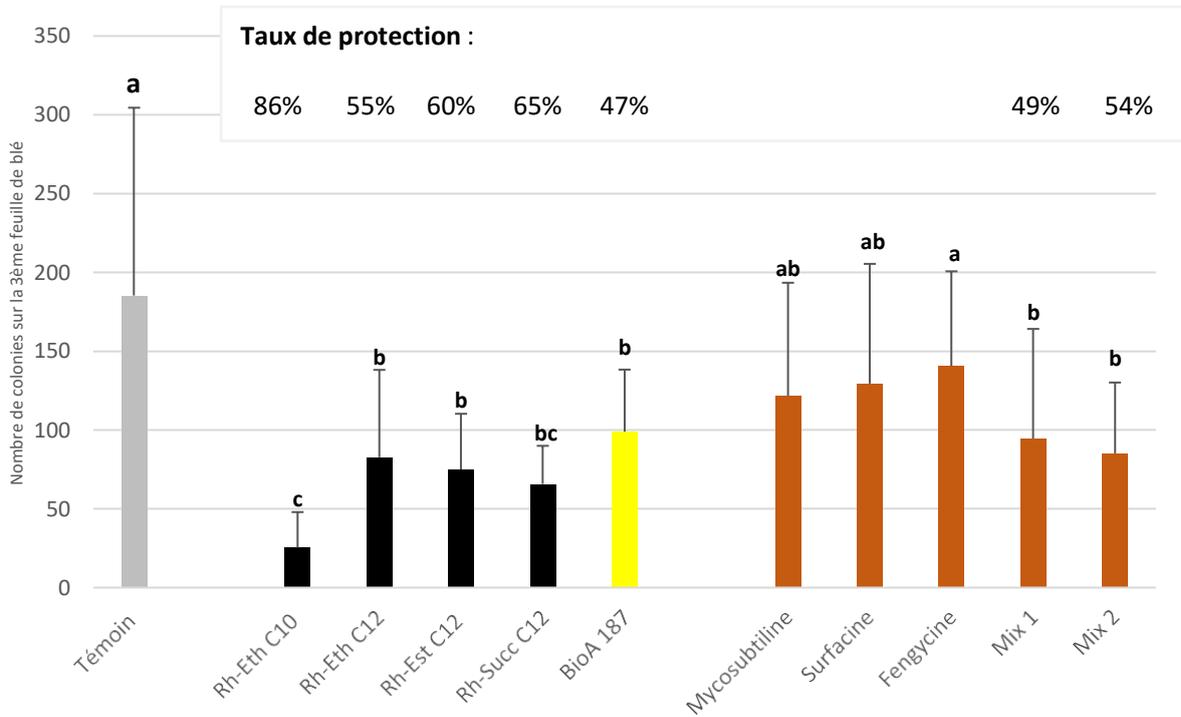


Figure 28 : Nombre de colonies de *B. graminis* et taux de protection observés sur la 3^{ème} feuille de blé du cultivar Pakito, selon le produit testé à 100µM. En noir : Rh-Eth C10, Rh-Eth C12, Rh-Est C12 et Rh-Succ C12 ; En jaune : BioA 187 ; En orange : Mycosubtiline (M), Surfactive (S), Fengycine et les mélanges : Mix 1 (M+S) et 2 (M+S+F).

Ces tests ont été réalisés sur plantules cultivées dans du terreau. Sur les plantules de blé témoins, âgées de 3 semaines et traitées par le DMSO, une moyenne de 185 colonies a été observée sur la 3^{ème} feuille. Un phénomène de chlorose a été observé sur les plantules de blé traitées avec le Rh-Eth C10 révélant une phytotoxicité de cette molécule utilisée à 100µM et empêchant de définir son réel pouvoir protecteur contre *B. graminis*. Les traitements avec les rhamnolipides Rh-Eth C12, Rh-Est C12 et Rh-Succ C12 ont conféré des taux de protection de 55, 60 et 65% respectivement par comparaison à la condition témoin (DMSO). Le chito-oligosaccharide BioA 187 confère un taux de protection de 47%. Pour les lipopeptides, seules les plantules traitées par les mélanges mix 1 (M+S) et 2 (M+S+F) montrent une différence significative du nombre

de colonies de *B. graminis* formées par rapport aux plantules témoins. En effet, des moyennes de 94 et 85 colonies ont été observées respectivement sur les plantes traitées avec les mélanges Mix 1 et Mix 2, ce qui correspond à une protection du blé contre l'oïdium de 49 et 54% (Figure 28).

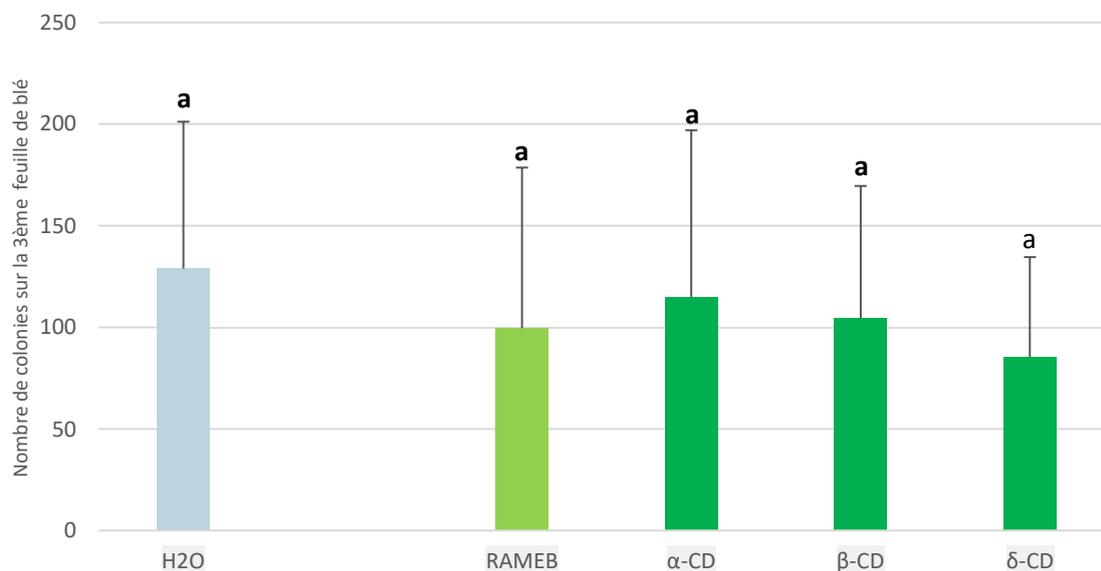


Figure 29 : Nombre de colonies de *B.graminis* sur la 3^{ème} feuille de blé du cv. Pakito traité par les cyclodextrines (RAMEB, α-CD, β-CD, δ-CD) à 100μM.

Concernant le traitement des plantules de blé avec les cyclodextrines, les quatre molécules RAMEB, α-CD, β-CD et δ-CD, testées à 100μM, n'ont montré aucune protection doublé contre l'oïdium. En effet, aucune différence significative du nombre de colonies formées n'a été observée par rapport aux plantules témoins traitées à l'H₂O (Figure 29).

3.1. b Validation de l'effet des molécules sur plantules cultivées sur substrat artificiel.

Dans l'optique d'étudier l'effet combiné des deux traitements, à savoir la ou les molécule(s) pré-sélectionnée(s) et un inoculum fongique racinaire, une mise au point des conditions de culture a été indispensable. L'utilisation d'un substrat de type terreau n'est pas recommandé dans le cas de culture en présence d'un inoculum mycorhizien en raison de sa teneur élevée en phosphore qui est incompatible avec l'établissement de la symbiose mycorhizienne. Il a été démontré que les CMA sont sensibles à l'abondance du sol en nutriments (Jensen et Jakobsen, 1980 ; Miller et Jackson, 1998 ; Oehl et al., 2003). En effet, des études ont montré que l'établissement de la symbiose mycorhizienne est affecté négativement voire supprimé en présence de teneurs élevées de nutriments tels que l'azote et le phosphore (Jansa et al., 2009).

Résultats et discussions

Ainsi, la validation de l'effet des molécules, obtenu sur des plantules âgées de 3 semaines et cultivées sur terreau, a été réalisée sur plantules cultivées sur substrat inerte, arrosées comme décrit précédemment avec une solution de Hoagland à P/2 (paragraphe 2.2). L'effet de l'âge a également été évalué, dans la mesure où la mycorhization des racines est un phénomène dynamique qui nécessite un délai assez long, estimé en moyenne à 6 semaines pour être effectif dans le cas du blé (Mustafa el al., 2016, 2017).

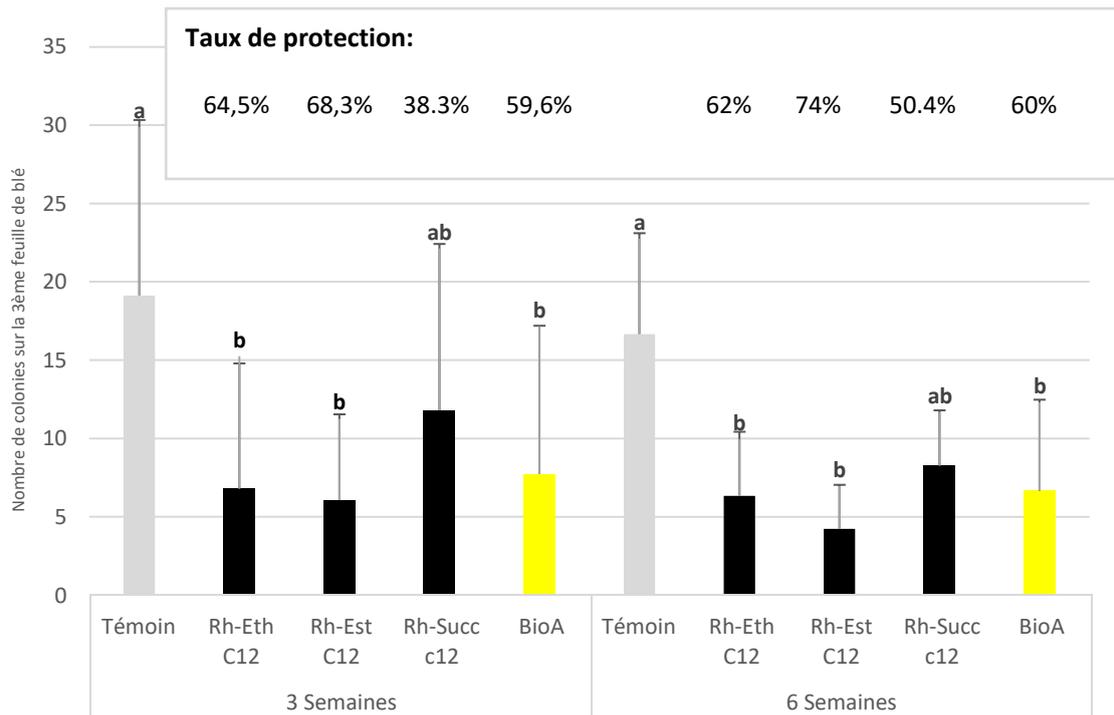


Figure 30 : Nombre de colonies de *B. graminis* et taux de protection obtenus sur la 3^{ème} feuille des plantules de blé du cultivar Alixan âgées de 3 et 6 semaines traitées par les rhamnolipides C12 et le BioA 187 à 100µM.

La figure 30 montre le nombre de colonies de *B. graminis* et les taux de protection obtenus pour les plantules de blé cultivées sur substrat artificiel et âgées de 3 et 6 semaines en réponse aux traitements foliaires par les rhamnolipides et BioA 187. Les plantules de blé témoins traitées au DMSO 0.1% présentent une moyenne de 19 et 16 colonies de *B. graminis* par feuille. Le rhamnolipide Rh-Eth C12 diminue significativement le nombre de colonies par rapport au témoin DMSO 0.1%, des moyennes respectives de 7 et 6 colonies ont été observées à 3 et 6 semaines de culture, ce qui correspond à des protections respectives de 64,5 et 62% des plantules de blé. Avec une moyenne 6 et 4 colonies, le Rh-Est C12 assure des taux de protection respectifs de 68 % et 74% à 3 et 6 semaines de culture. En revanche, le Rh- Succ C12 ne

présente pas de différence significative par rapport au témoin DMSO 0.1% dans les deux conditions d'âge. Pour le chito-oligosaccharide BioA 187, des moyennes de 8 et 7 colonies ont été observées à 3 et 6 semaines de culture. Le traitement au BioA 187 a conféré une protection de 59,6 et 60% contre l'oïdium du blé pour les plantes âgées de 3 et 6 semaines. La protection du blé contre l'oïdium obtenue avec Rh-Eth C12, Rh-Est C12 et le BioA 187 n'est donc pas affectée par l'âge de la plante (Figure 30) dans les premières semaines de son cycle de développement.

3.2. Sélection des inoculums fongiques bénéfiques racinaires

La sélection des différents inoculums fongiques potentiellement efficaces tient compte de deux critères : (i) leur capacité à coloniser les racines de blé et (ii) leur capacité à protéger le blé contre *B. graminis*.

3.2. a Détermination des taux de mycorhization des racines de blé

L'efficacité de la colonisation des racines de blé par les inoculums mycorhiziens testés a été déterminée en mesurant le taux de colonisation mycorhizienne totale, arbusculaire et vésiculaire sur les racines de blé après 8 semaines de culture. Aucune structure mycorhizienne ni présence mycélienne n'a été observée dans les racines des plantules témoin ou inoculées avec des billes d'alginate contenant le CMA *Ri*, le champignon endophyte *T. harzianum* et la combinaison des deux (*Ri* + *T. harzianum*). De même, les racines de plantes inoculées avec Agtiv® et Symbivit® Pro (autoclavé ou non) et *Fm* autoclavé n'ont pas montré de structures mycorhiziennes. En revanche, des arbuscules et vésicules démontrant la colonisation mycorhizienne chez les racines de plantules inoculées avec *Fm* ont été clairement observés (Figure 31). Le taux de mycorhization totale a été évalué à 23%. Les taux des colonisations arbusculaire et vésiculaire ont été estimés à 5 et 3% respectivement dans les racines de blés inoculés avec *Fm* (Tableau 7).

Tableau 7 : Taux de colonisation des racines de blé inoculé avec *Fm* après 8 semaines de culture. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

Taux de colonisation (%)	
Total	22.7 ± 7.26
Arbusculaire	4.9 ± 1.8
Vésiculaire	3.2 ± 0.93

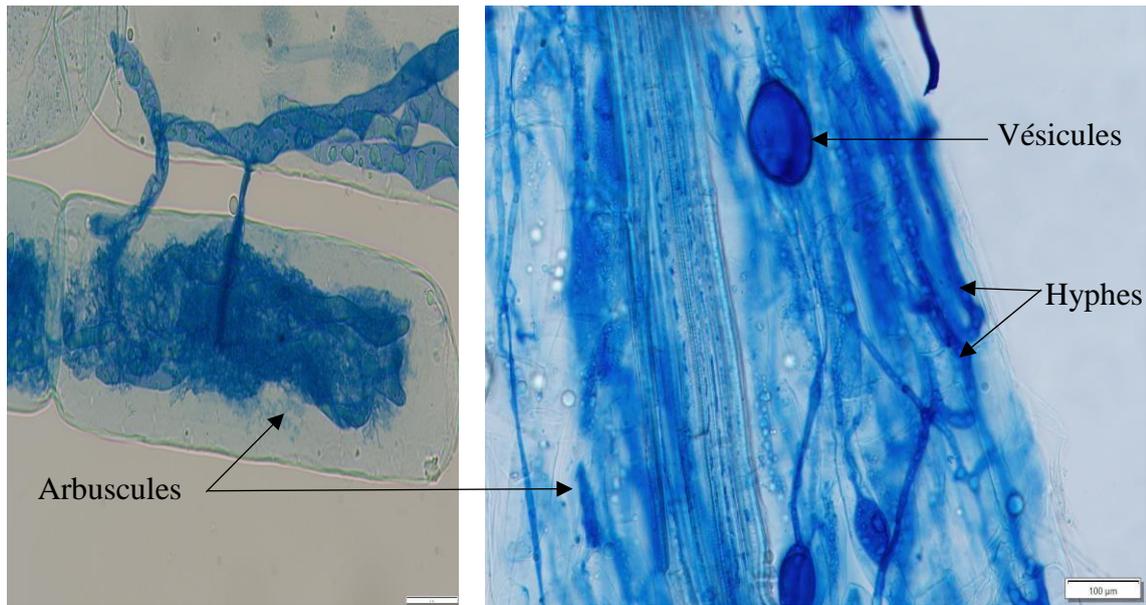


Figure 31 : Racines de blé inoculées avec *Fm* montrant les différentes structures mycorhiziennes (Arbuscules, Vésicules et Hyphes).

3.3. Test de protection contre l'oïdium du blé

Après 6 semaines de culture sur un substrat artificiel, les plantules de blé cultivées en présence d'un inoculum fongique racinaire ont été infectées par *B. graminis*. Le nombre de colonies sur la 3^{ème} feuille a été compté 12 jours après infection, soit sur des plantules âgées d'environ 8 semaines (Tableau 8.a). En moyenne, 27 colonies de *B. graminis* ont été comptabilisées chez le blé témoin (non inoculé) et chez le blé cultivé en présence des billes d'alginate vides. Les essais des différents inoculums ont montré que les billes d'alginate contenant le CMA *Ri* ainsi que *T. harzianum* seuls ou en association n'ont pas d'effet sur la protection du blé contre l'oïdium. Les plantules inoculées par le CMA *Ri* (MUCL41833), apporté en plug (spores et hyphes) ou encapsulé dans des billes d'alginate, présentent respectivement une moyenne de 29 et 23 colonies, et chez les plantules inoculées avec des billes d'alginate contenant *T. harzianum*, 33 colonies ont été comptées. Aucune différence significative n'a été observée par rapport au témoin non inoculé.

Enfin, l'effet de l'apport de trois inoculums commerciaux (Aktiv[®], Symbivit[®] Pro et *Fm*) sur une protection potentielle du blé contre l'oïdium a été testé sur des plantules de blé âgées de 8 semaines. Un témoin sans inoculum, ainsi que les inoculums commerciaux autoclavés ou non ont été testés (Tableau 8.a. et 8.b.).

Résultats et discussions

Sur les plantules de blé témoin (non inoculées), 104 colonies ont été comptées sur la 3^{ème} feuille. Chez les plantes inoculées avec Aktiv ® autoclavé ou non, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux plantules témoin non mycorhizées. En effet, 95 et 113 colonies de *B. graminis* ont été respectivement observées. De même, avec un nombre de colonies évalué à 91,3 et 79,3 colonies chez les plantules inoculées avec *Symbivit* ® *Pro* autoclavé ou non, aucune différence significative par rapport aux plantules témoin non mycorhizées n'a été observée. Quant aux plantules inoculées avec *Fm*, seules les plantes inoculées avec *Fm* non autoclavé ont montré une réduction significative du nombre de colonies avec une moyenne de 69,5 et assurant une protection de 33% contre l'oïdium de blé (Tableau 8.b).

Tableau 8.a. : Impact de l'inoculation mycorhizienne sur le nombre de colonies de *B. graminis* et les taux de protection sur la 3^{ème} feuille des plantules âgées de près de 8 semaines. Les valeurs sont des moyennes \pm l'écart type. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes et chacune correspond à 15 plantules dans trois pots.

Inoculums	Nombre de colonies	Taux de protection
Témoin non inoculé	27,29 \pm 12a	-
Billes d'alginate vides	26,67 \pm 12,1a	2.3%
<i>Ri</i> + <i>Trichoderma harzianum</i> encapsulés dans des billes d'alginate et autoclavés	20.47 \pm 11.2a	25%
<i>Ri</i> (plug) (MUCL41833)	29 \pm 13.6a	0%
<i>Ri</i> encapsulé dans des billes d'alginate	23.13 \pm 15a	15%
<i>Trichoderma harzianum</i> encapsulé dans des billes d'alginate	33.33 \pm 15.4a	0%
<i>Ri</i> + <i>Trichoderma harzianum</i> encapsulés dans des billes d'alginate	22,33 \pm 5,3a	18%

Tableau 8.b. : Impact de l'inoculation mycorhizienne sur le nombre de colonies de *B. graminis* et les taux de protection sur la 3ème feuille des plantules cultivées en présence des inoculum commerciaux et âgées de près de 8 semaines. Les valeurs sont des moyennes \pm l'écart type. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes dans le temps et chacune correspond à 15 plantules dans trois pots.

Inoculum	Nombre de colonies	Taux de protection
Témoin	103,8 \pm 12,9A	-
Aktiv®	95,5 \pm 12,1A	8%
Aktiv® autoclavé	113 \pm 15,4A	0%
Symbivit	79,3 \pm 11,8AB	23,5%
Symbivit® Pro autoclavé	91,3 \pm 14,5AB	12%
<i>Fm</i>	69,5\pm9,4B	33%
<i>Fm</i> autoclavé	99,33 \pm 13,9A	4,3%

3.4. Effet direct des molécules sur la germination *in vitro* des spores de *B. graminis*

Les molécules testées présentant un effet protecteur *in planta* contre l'oïdium, à savoir les rhamnolipides C12, le BioA 187 et les lipopeptides, ont été testées *in vitro* afin d'évaluer leur effet direct sur la germination des spores de *B. graminis*. Pour la condition témoin (DMSO), 57 % des spores n'ont pas germé ou ont présenté des tubes germinatifs avortés. Parmi les spores qui ont germé, 27% présentent un petit TGA, 9% un long TGA et 7% plusieurs TGA (Figure 32).

Le rhamnolipide Rh-Eth C12 inhibe totalement la germination à toutes les concentrations testées. Le Rh-Est C12 n'a pas d'effet significatif sur l'inhibition de la germination des spores à la concentration 50 μ M. En revanche, 89 et 93% des spores ne germent pas respectivement aux concentrations 100 et 200 μ M du Rh-Est C12. A la concentration la plus élevée de Rh-Est C12 (300 μ M), la totalité des spores ne germent pas ou présentent des TGA avortés. L'effet inhibiteur du Rh-Succ C12 a été démontré à partir de 50 μ M. Ainsi, pour les concentrations respectives de 50 μ M et 100 μ M, une inhibition significative de la germination a été observée respectivement pour 90 et 92% des spores. A des concentrations plus élevées (200 et 300 μ M), le Rh-Succ C12 inhibe la germination à des taux respectifs de 96 et 98% (Figure 32).

Résultats et discussions

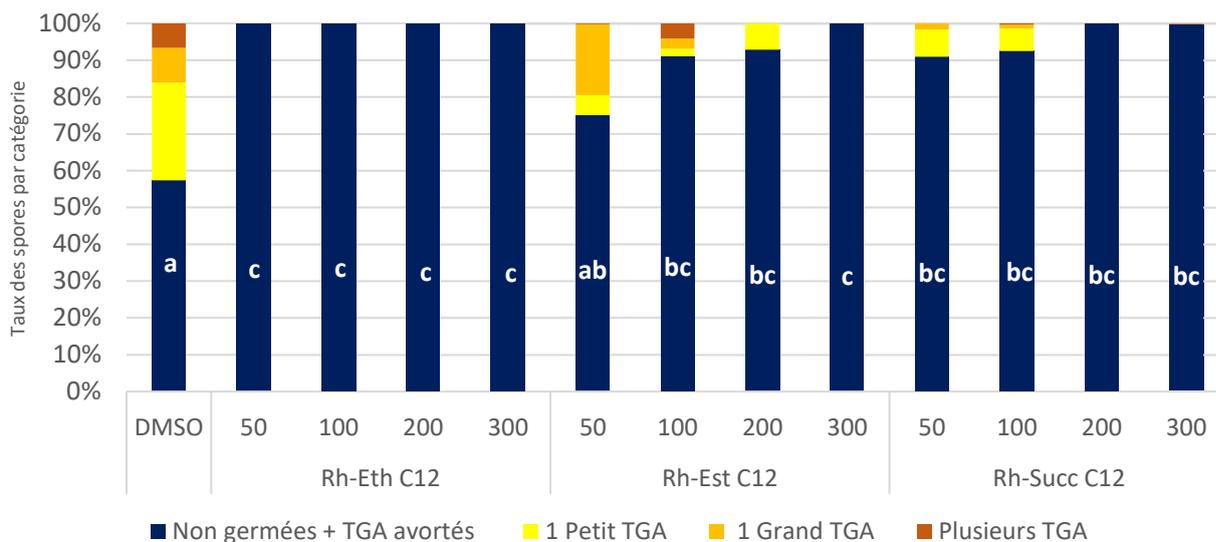


Figure 32 : Pourcentages de germination *in vitro* des spores de *B. graminis*, sur de l'agar contenant du DMSO seul, ou contenant l'un des 3 rhamnolipides (Rh-Eth C12, Rh-Est C12, Rh-Succ C12) aux concentrations testées (50, 100, 200, 300 µM). TGA : Tube Germinatif Appressorial.

Concernant le traitement au BioA 187, la concentration 50µM n'a pas affecté significativement la germination des spores de *B. graminis* par comparaison au témoin DMSO. Pour les concentrations plus élevées (100, 200 et 300 µM), un effet inhibiteur sur la germination des spores a été observé, avec plus de 91% des spores de *B. graminis* qui n'ont pas germé ou ont présenté des TGA avortés (Figure 33).

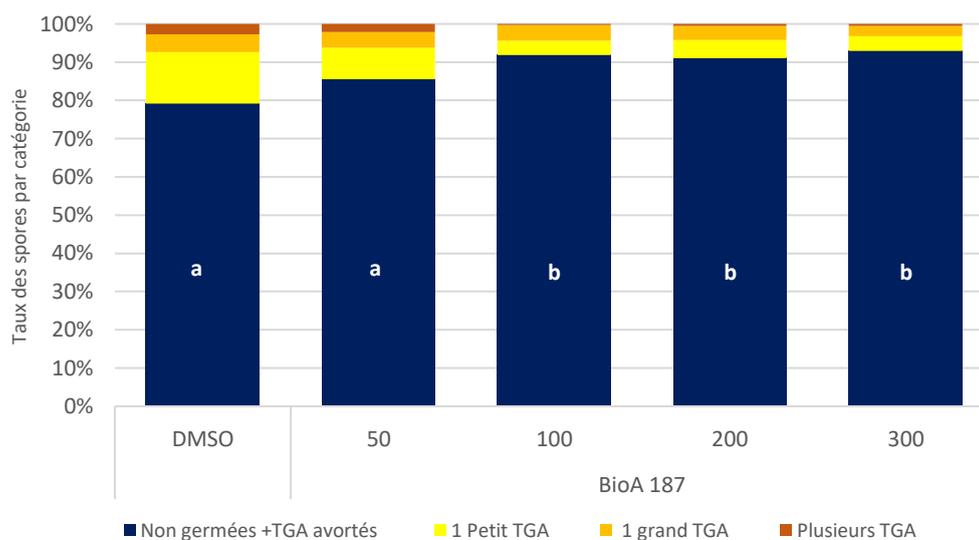


Figure 33 : Pourcentages de la germination *in vitro* des spores de *B. graminis* sur de l'agar contenant du DMSO seul, ou contenant le BioA 187 aux concentrations testées : 50, 100, 200, 300 µM. TGA : Tube Germinatif Appressorial.

Résultats et discussions

De même, l'effet direct des lipopeptides a été testé *in vitro* sur les spores de *B. graminis*. Chez le témoin (DMSO), 62% des spores n'ont pas germé ou ont présenté des TGA avortés, 27 % des spores ont germé avec un petit TGA, tandis que 7% des spores présentaient un long TGA et 3% ont germé avec plusieurs TGA (Figure 34).

Seule la mycosubtiline a montré un effet inhibiteur significatif de la germination des spores de *B. graminis* à toutes les concentrations testées (50, 100, 200, 300 μ M). Une inhibition de 93 % est obtenue à la concentration de 50 μ M et cette inhibition devient totale à partir de 100 μ M. En revanche, la surfactine ne montre pas d'effet inhibiteur significatif à 50 μ M. Une relation dose / effet anti-germinatif a été observée pour la même molécule à partir de 100 μ M. Des taux d'inhibition respectifs de 67, 80 et 83.3% ont été obtenus pour les concentrations de 100, 200 et 300 μ M. Concernant la fengycine, aucun effet significatif n'a été observé à 50 μ M par rapport au témoin DMSO 0,1%. Aux concentrations élevées (100, 200 et 300 μ M), la germination des spores est inhibée de plus de 90% par rapport au témoin. Pour les deux mélanges : Mix 1 et 2, des taux d'inhibition de la germination des spores de *B. graminis* respectifs de 91 et 99% pour la concentration de 50 μ M ont été obtenus. Pour chacun de ces mélanges, les concentrations supérieures ou égales à 100 μ M inhibent totalement la germination des spores (Figure 34).

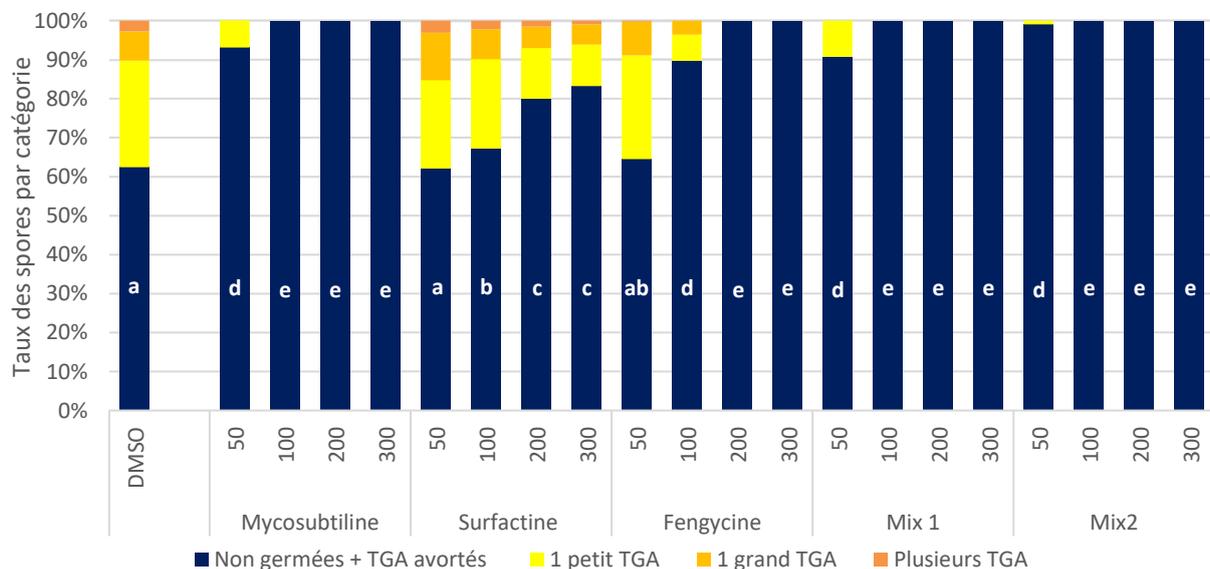


Figure 34 : Pourcentages de germination *in vitro* des spores de *B. graminis* sur de l'agar contenant du DMSO (témoin) ou contenant les lipopeptides seuls ou en mélange aux concentrations testées : 50, 100, 200, 300 μ M. TGA : Tube Germinatif Appressorial.

4. Discussion

4.1. Criblage des molécules

Dans notre étude, le criblage de diverses molécules a permis de mettre en évidence pour plusieurs d'entre elles une activité inhibitrice de la germination des spores du champignon phytopathogène biotrophe *B. graminis in vitro* ainsi qu'une activité de protection *in planta* en conditions contrôlées. La protection obtenue contre *B. graminis* pourrait ainsi résulter de l'action inhibitrice directe de la molécule, sans pour autant exclure la possibilité d'une résistance induite par stimulation des mécanismes de défense chez la plante.

4.1. a Les rhamnolipides

Nos expérimentations ont montré que les plantules de blé traitées au Rh-Eth C10 à 100µM ont présenté des chloroses au niveau foliaire, empêchant la validation de tout effet protecteur contre *B. graminis*, et traduisant une probable phytotoxicité de la molécule. L'effet phytotoxique observé 48H après le traitement peut s'expliquer par un effet dose et/ou par le choix du cultivar utilisé. En effet, des tests supplémentaires sont requis avec des concentrations inférieures à 100µM ou sur d'autres cultivars afin de confirmer ou non la phytotoxicité obtenue et de vérifier plus clairement l'effet protecteur du Rh-Eth C10.

En revanche, les trois rhamnolipides avec une longueur de chaîne de 12 atomes de carbone (en C12), à savoir Rh-Eth C12, Rh-Est C12 et Rh-Succ C12, n'ont pas révélé de phytotoxicité et ont conféré une protection des plantules de blé supérieure à 50% contre l'oïdium à 3 et 6 semaines de culture. Quelle que soit la fonction (éther, ester ou succinate) liant la chaîne hydrophobe, les rhamnolipides en C12 protègent le blé contre l'oïdium à 100µM. L'efficacité d'un rhamnolipide à protéger le blé contre l'oïdium – et peut-être en stimulant ses défenses – peut dépendre de la longueur de la chaîne carbonée, ainsi que la nature des liaisons et groupements des rhamnolipides. Dans notre étude, la nature des liaisons testées semble peu influencer l'efficacité des rhamnolipides C12. Par ailleurs, une étude récente a démontré que des rhamnolipides de synthèse, composés de deux rhamnose et séparés par une chaîne d'acides gras, peuvent déclencher une réponse immunitaire chez *Arabidopsis* qui varie en fonction de la longueur de la chaîne d'acides gras (Luzuriaga-Loaiza et al., 2018). En effet, les résultats de criblage effectué dans le cadre du projet, ont démontré que les rhamnolipides en C8 et en C4 à 100µM seraient moins efficace que les rhamnolipides en C12 contre *P.infestans*, *B. cinerea*, *Rhizoctonia solani*. (Données non publiées) En terme de protection, des études antérieures ont décrit que les rhamnolipides naturels sont susceptibles de protéger le vignes, le

colza contre *B. cinerea* et ce en déclenchant des réponses de défense chez la plante (Vanier et al., 2009 ; Monnier et al., 2018). D'autre part, Platel et al., (2020) ont décrit que les rhamnolipides sont notamment capables de protéger le blé contre *Zymoseptoria tritici*. Le Rh-Est-C12, appliqué à 1,1 mg/mL (3200 µM), s'est montré efficace en affichant une réduction des symptômes de la maladie avoisinant 78,9% et ce en les activités enzymatiques (CAT et POX) et la production des ROS (Platel et al., 2020). De telles activités biologiques n'ont jamais été décrites pour des rhamnolipides purifiés ni dans le cadre du pathosystème oïdium/blé, ni même plus généralement sur des pathosystèmes mettant en jeu des interactions entre des agents pathogènes foliaires biotrophes et des céréales.

Pour ce qui est de la stimulation des défenses, notre hypothèse est soutenue par les travaux de Robineau et al., (2020). En effet, l'efficacité des rhamnolipides Rh-Eth C10, Rh-Eth C12, Rh-Est C12 et Rh-Car C12 appliqués par pulvérisation foliaire à 300µM a été étudiée sur des plantes de tomate contre *B. cinerea*. Les tests de protection sur des plantules par les rhamnolipides à C12 ont démontré une diminution significative des nécroses de *B. cinerea*. Cependant, le Rh-Eth C10 n'a pas montré d'effet significatif par rapport au témoin DMSO 0.1%. L'effet de ces rhamnolipides sur l'élicitation ou la potentialisation des mécanismes de défenses de la plante ont été notamment étudiés. Hors contexte infectieux, aucune induction significative de l'expression des gènes *PR1* (*pathogenesis-related protein 1*) et *PRP69* (*pathogen-induced protease*) n'a été révélée. Le prétraitement au Rh-Eth C10 n'a pas induit des modifications sur l'expression des gènes. Cependant, 48H après infection par l'agent pathogène, le Rh-Car C12 a induit le gène PR1, tandis que les Rh-Eth C12, Rh-Est C12 ont activé l'expression du gène PRP69 suggérant ainsi un effet de potentialisation de ces rhamnolipides.

Par ailleurs, l'induction des réactions de défenses de la plante semble être dépendante du mode de vie du parasite. Sanchez et al. (2012) ont montré que le prétraitement des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* par le mélange de rhamnolipides (Rh-C10-C10 : 40% et Rh-Rh-C10-C10 60%) a conféré une protection contre *Hyaloperonospora arabidopsidis* et *B. cinerea*. La protection des plantules d'*A. thaliana* obtenue contre ces deux agents pathogènes suite à l'application foliaire du mélange de rhamnolipides semblaient être liée à l'activation de différentes voies de signalisation des défenses dépendant du mode de vie de l'agent pathogène. Ainsi, la voie de l'AS est activée par les rhamnolipides, par potentialisation, dans le cadre de l'infection par l'agent pathogène nécrotrophe *B. cinerea* tandis que l'ET est impliquée dans la résistance induite contre l'oomycète biotrophe *H. arabidopsidis* (Sanchez et al., 2012).

En plus du potentiel protecteur *in planta* nos résultats ont démontré que les rhamnolipides à C12 présentent également un effet anti-germinatif direct. En effet, une inhibition de la germination des conidies de *B. graminis in vitro* a été observée pour Rh-Eth C12, Rh-Succ C12 à partir de 50µM ainsi que pour Rh-Est C12 à partir de 100µM. Un effet anti-germinatif quasi-total est observé à des concentrations plus élevées. Récemment, Robineau et al., (2020) ont testé également différents mono-rhamnolipides synthétiques, dont le Rh-Eth C10, le Rh-Eth C12, le Rh-Est C12, ainsi qu'un Rh-Carbamate C12 (Rh-Car C12) sur la germination des conidies de *B. cinerea in vitro*. Indépendamment des concentrations appliquées, une diminution de la germination des conidies et de la croissance mycélienne de *B. cinerea* a été observée à 2 jours post-traitement par les différents mono-rhamnolipides confirmant ainsi leur effet anti-germinatif.

Le plus souvent, les travaux menés sur l'utilisation des rhamnolipides dans le cadre du biocontrôle se sont principalement intéressés à des mélanges de mono- et di-rhamnolipides purifiés et ce contre différents agents pathogènes tels que *Sclerotium rolfsii*, *F. oxysporium*, *Phytophthora nicotianae* et *Macrophomina phaseolina* (Reddy et al., 2016). Plusieurs études ont rapporté leurs propriétés antimicrobiennes directes contre diverses espèces de champignons nécrotrophes, oomycètes et bactéries *in vitro*. Par exemple, le mélange de rhamnolipides, produits par *Pseudomonas aeruginosa* (mono et di-rhamnolipides : Rh-C10-C10 : 40% et Rh-Rh-C10-C10 60%) a été testé à différentes concentrations (0,1, 0,2 et 1 mg/mL) *in vitro* vis-à-vis de *B. cinerea*. Pour les concentrations (0,1 et 0,2 mg/mL), aucun effet significatif n'a été observé sur la germination des spores et la croissance mycélienne par rapport au témoin. Cependant, à une concentration plus élevée une forte inhibition de la germination des spores (95%) a été observée en 24h (Sanchez et al., 2012 ; Vannier et al., 2009). Des études récentes ont décrit l'effet antifongique des mélanges de rhamnolipides, se manifestant par une altération de la croissance mycélienne et une inhibition de la germination des spores de certains agents pathogènes foliaires tels que *Cercospora kikuchii*, *Cladosporium cucumerinum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium verticillioides* et *F. graminearum* (Kim et al., 2000 ; Sha et al., 2012 ; Deepika et al., 2015 ; Borah et al., 2016). En effet, les mélanges de rhamnolipides peuvent inhiber la croissance mycélienne et provoquer la lyse des zoospores de nombreux oomycètes pathogènes, notamment *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, *P. sojae* et *Plasmopara lactucae-radicis* (Stanghellini et Miller, 1997 ; Kim et al., 2000 ; Soltani et al., 2015 ; Miao et al., 2015).

4.1. b Le chito-oligosaccharide

Dans le cadre de notre étude de criblage, le traitement foliaire des feuilles de blé par le chito-oligosaccharide (COS) BioA 187 à 100µM a permis de réduire la sévérité de la maladie d'environ 60% chez des plants de blé âgés de 3 et 6 semaines. En ce sens, les COS ont été décrits pour protéger diverses plantes contre *B. cinerea*, telles que la vigne, le concombre et la tomate (Aziz et al., 2006 ; Badawy et Rabea, 2009 ; Ben-Shalom et al., 2003). En effet, la protection conférée suite à un traitement au COS résulterait non seulement de son activité inhibitrice directe mais aussi de la stimulation des mécanismes de défense. Il agirait comme un éliciteur des réactions de défense des plantes (Aziz *et al.* 2006 ; Vander *et al.* 1998). Faoro *et al.* (2008) ont montré un effet systémique du chitosan. Une pulvérisation foliaire du chitosan sur des plantules d'orge a conduit à une réduction de 55.5% de l'infection par *B. graminis* f.sp. *hordei* sur les feuilles ayant reçu le produit, mais aussi à une réduction d'environ 57% sur les feuilles non traitées de la même plante et infectées par le pathogène. La résistance induite chez les plantes traitées est associée à l'accumulation de phytoalexines via l'activation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Hammerschmidt 1999, Iriti et al., 2011, Aziz et al., 2007). En effet, les COS peuvent agir sur le développement de l'agent pathogène et moduler différemment la réponse de la plante. D'après la littérature, son activité est corrélée à des facteurs intrinsèques tels que la nature, le degré de polymérisation, la désacétylation du polymère ainsi qu'au mode d'application du traitement, la plante hôte et l'agent pathogène (Hadwiger et Beckman 1980 ; Das et al., 2013).

Concernant l'effet direct du BioA 187, un effet inhibiteur de la germination des spores supérieur à 91% à partir de 100µM a été montré. L'activité fongicide du chitosan et de ses dérivés a été rapportée contre divers champignons et oomycètes (Muzzarelli et al., 1990 ; Vasyukova et al., 2005). Par exemple, il a démontré que les propriétés inhibitrices du chitosan sont liées à sa capacité à induire des altérations sur la croissance mycélienne (déformation et déshydratation des hyphes) et la germination des spores (avortement des spores) de nombreux agents pathogènes notamment *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *B. cinerea*, *Monilina laxa*, *Alternaria alternata*, *Pythium aphanidermatum* et *Mucor piriformis* (Kheiri et al., 2016 ; Rahman et al., 2015 ; El Hassni et al., 2004 ; Rabea et al., 2003 ; Leuba et Stössel, 1986). Les travaux réalisés par Kheiri et al., (2016) ont rapporté que le traitement par des dérivés du chitosan à 5000 ppm a altéré le développement des hyphes du *F. graminearum* en diminuant de 85% sa croissance mycélienne *in vitro*.

4.1. c Les lipopeptides

L'étude de l'effet protecteur *in planta* des molécules a porté aussi sur les lipopeptides (LPs), produits par *Bacillus subtilis*, notamment la mycosubtiline (M), fengycine (F) et surfactine (S). Ces LPs pulvérisés séparément à 100µM n'ont pas conduit à une protection significative des plantules de blé contre l'oïdium. La fengycine est particulièrement étudiée contre les champignons filamenteux (Deleu et al., 2008) et la mycosubtiline est connue pour son activité antifongique contre un large panel d'agents pathogènes, notamment *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* et *R. solani* (Yu et al. 2002 ; Leclère et al. 2005). Ces deux LP n'ont pas montré d'effet protecteur contre l'oïdium du blé dans nos conditions expérimentales. De même, la surfactine seule n'a pas conférée une protection du blé contre l'oïdium. Contrairement aux LP utilisés séparément, les mélanges Mix 1 et Mix 2 ont permis d'obtenir une protection de 49% et 54% respectivement, soulignant ainsi l'effet synergique entre les trois familles de ces LP. Nos résultats corroborent les travaux de Deravel et al. (2014) qui ont démontré la protection de la laitue contre l'oomycète biotrophe *Bremia lactucae* par un traitement foliaire à base de mycosubtiline (100 mg L⁻¹) et d'un mélange de mycosubtiline et de surfactine (50:50 mg L⁻¹). En revanche, la surfactine seule n'a pas eu d'impact sur le développement de *B. lactucae* et n'a pas amélioré la résistance de la plante à la maladie (Deravel et al. 2014). La surfactine, par son action biosurfactante et son absence d'activité antifongique, pourrait favoriser l'adhésion de la mycosubtiline à la surface foliaire et améliorer par la suite l'activité de cette dernière (Stock et Holloway 1993 ; Jauregi et al. 2013 ; Deravel et al. 2014).

Khong et al., (2013) ont testé séparément la fengycine, la surfactine et la mycosubtiline dans le cadre du pathosystème blé (cv. Orvantis) / oïdium dans des conditions contrôlées. Ils ont rapporté que le traitement foliaire des plantules de blé à une dose de 0.01g/L, a assuré des niveaux de protection de 49% et 41% obtenus pour la surfactine et la mycosubtiline, respectivement. Bien que dans notre étude, la concentration correspondant à 100µM soit environ 10 fois supérieure à celle utilisée par Khong et al. (2013), aucune protection contre *B. graminis* n'a pu être mise en évidence. L'effet protecteur des LP pourrait ainsi s'exprimer différemment selon le degré de sensibilité du cultivar de blé à la maladie, puisque la surfactine et la mycosubtiline se sont révélées plus efficaces en termes de protection contre *B. graminis* chez un cultivar de blé assez sensible (cv. Orvantis) que chez un cultivar peu sensible (cv. Alixan).

En ce qui concerne l'effet inhibiteur de la germination des spores de *B. graminis*, notre étude a montré une activité anti-germinative *in vitro* pour les LP et cela à des concentrations supérieures à 100 µM. Pour la mycosubtiline, une inhibition de 93% est obtenue pour la concentration la plus faible testée 50µM, inhibition qui devient totale à partir de 100µM. Les traitements à la surfacine et la fengycine, n'ont pas d'impact significatif sur la germination des spores à 50µM. Cependant, un effet inhibiteur relatif à la dose a été rapporté à partir de 100µM pour la surfactine. Concernant le traitement à la fengycine, la germination des spores de *B. graminis* est inhibée de plus que 90% pour les concentrations élevées en ce LP, à savoir 100, 200 et 300µM. Pour les deux mélanges : Mix 1 (M+S (80:20 w/w)) et Mix 2 (M+S+F (30:20:50 w/w/w)), des taux d'inhibition de la germination des spores de *B. graminis* respectifs de 91 et 99% pour la concentration de 50µM ont été rapportés. Pour chacun de ces mélanges, les concentrations supérieures ou égales à 100µM inhibent totalement la germination des spores. Toutefois, Khong et al., (2013), ont étudié l'effet inhibiteur *in vitro* de la surfactine, la mycosubtiline, la fengycine et d'un mélange de (M+S 50:50 w/w), à une concentration environ 10 fois plus faible que celles testée dans notre étude. Ils ont constaté que ces traitements n'ont aucun effet sur la germination des spores de *B. graminis in vitro*. De ce fait, on peut suggérer que l'effet anti-germinatif observé contre *B. graminis* serait lié aussi à un effet dose.

4.2. Criblage des inoculum racinaires

Concernant le criblage des inoculum fongiques racinaires testés, un taux de protection contre l'oïdium de 33% a été obtenu uniquement chez les plants de blé mycorhizés par *F. mosseae* *FR140* (*Fm*). Parmi les différents inoculum testés, seul *Fm* a réussi à établir une symbiose avec les racines de blé avec un taux de mycorhization d'environ 23 %. En revanche, aucune structure mycorhizienne, ni aucune protection n'ont été observées chez les plantes cultivées inoculées avec Aktiv ® et Symbivit ® Pro ou avec les billes d'alginate contenant *Ri*, *T. harzianum* et *Ri* + *T. harzianum*. L'absence de protection significative pourrait ainsi s'expliquer par l'absence de colonisation fongique des racines.

Bien que les inoculum mycorhiziens commerciaux soient disponibles sur le marché, il existe peu de données sur l'utilisation des différents inoculum mycorhiziens dans le cadre de protection du blé, notamment contre les agents pathogènes foliaires tel que l'oïdium. Des travaux antérieurs réalisés à l'UCEIV, dans des conditions expérimentales similaires aux nôtres, ont montré que parmi les différentes espèces de CMA testées, *Fm* semble avoir une capacité de

colonisation des racines de blé plus élevée par comparaison à d'autres espèces comme *Ri* (DAOM 197198) ou certaines espèces de *Glomus* sp. (Solrize®) (Mustafa et al., 2016, 2017). Bien que la variété de blé (Cv. Alixan) utilisée dans notre étude soit différente de celle (Cv. Orvantis) décrite dans les travaux de Mustafa et al (2016, 2017), l'effet protecteur de *Fm* contre l'oïdium a été confirmé. Cependant, dans nos conditions d'étude, la souche de *Ri* (MUCL41833) utilisée n'a pas conféré une protection significative. L'absence de protection peut être due notamment par le choix de souches de *Ri* et de cultivars différents utilisés pour nos expérimentations. En effet, Léon et al., (2020) ont suggéré que la réponse de la plante à l'inoculation mycorhizienne et l'effet protecteur dépendent de plusieurs facteurs tels que l'espèce de CMA, le cultivar de blé, le mode de vie et l'agent pathogène. D'autres travaux, réalisés sur différentes espèces végétales, comme la tomate ou le riz, rapportent un effet protecteur plus important chez *Fm* en comparaison à *Ri* contre divers agents pathogènes, qu'il s'agisse d'oomycètes (*Phytophthora parasitica*) ou de nématodes (*Meloidogyne graminicola*) (Pozo et al. 2002 ; Shrinkhala 2011). Par exemple, Larsen et Yohalem (2004) ont rapporté qu'aucun effet significatif n'a été observé contre l'oïdium causé par l'agent pathogène *Podosphaera xanthii* sur des plants de concombre mycorhizés par *Ri*. D'autre part, Dugassa et al. (1996) ont montré que la mycorhization du lin par *Ri* augmente l'infection foliaire par *Oidium lini*, agent pathogène responsable de l'oïdium du lin.

La co-inoculation du CMA *Ri* et de l'endophyte *T. harzianum* n'a pas montré de protection du blé, ni de mycorhization des racines. Les CMA en tant que biotrophes sont peu compétitifs par rapport au microbiote racinaire et sont particulièrement sensibles à la présence d'autres microorganismes (Jansa et Gryndler 2010). En effet, De Jaeger et al. (2012) ont suggéré que la nature mycoparasitique de *T. harzianum* pourrait inhiber le développement de *Ri*. En plus du choix du cultivar du blé et de la souche de *Ri*, les propriétés mycoparasitiques de *T. harzianum* peuvent expliquer donc l'absence de colonisation mycorhizienne des racines de blé dans nos conditions de culture. En revanche, la technique de co-encapsulation de différents inoculums bénéfiques est une technologie prometteuse visant à améliorer l'établissement de la colonisation mycorhizienne. Des essais sur différents cultivars de blé, avec différentes doses d'inoculums seront indispensables pour améliorer les conditions d'apport d'inoculums d'organismes bénéfiques au niveau racinaire.

5. Conclusion

Des molécules de différentes natures ont été testées afin d'évaluer leur capacité à protéger le blé contre l'oïdium. Les résultats obtenus ont montré une efficacité de protection variable suivant les molécules candidates. Cette étude de criblage nous a permis de sélectionner en premier lieu les traitements les plus efficaces pour la protection du blé contre l'oïdium *in planta*, tout en s'assurant d'une absence d'effet phytotoxique. Les rhamnolipides à chaîne carbonée C12, les lipopeptides en mélange et le chito-oligosaccharide BioA 187 ont été sélectionnés et évalués dans un second temps pour leur effet direct sur la germination des spores de *B. graminis in vitro*. L'effet anti-germinatif de l'ensemble de ces molécules a été testé selon une gamme de concentrations croissantes (50, 100, 200, 300 μ M). Elles ont toutes montré un effet inhibiteur de la germination des spores *B. graminis* à partir de 100 μ M. Pour la poursuite de mon travail de thèse, nous avons retenu comme molécule candidate pour le traitement foliaire contre l'oïdium du blé, le chito-oligosaccharide, BioA 187. En plus de son origine biologique, cette molécule bio-sourcée a montré à la fois un effet direct anti-germinatif contre les spores de *B. graminis* ainsi qu'une protection contre l'oïdium du blé *in planta*. De par sa nature, cette molécule est susceptible d'induire également les mécanismes de défense chez le blé.

Par ailleurs, parmi les CMA également testés sur le pathosystème blé/oïdium, seul l'inoculum mycorhizien *Fm* a montré une efficacité de protection significative. Cet inoculum a donc été retenu et fera partie du traitement combiné molécule/CMA pour la suite des expérimentations d'optimisation de l'effet protecteur et d'étude des mécanismes impliqués dans cette protection. Dans la suite de ces étapes de criblage, les travaux de thèse ont porté sur les mécanismes de défense induits chez le blé dans le but d'expliquer la protection obtenue, *via* (i) le suivi de l'expression de gènes marqueurs de défense, (ii) le suivi de l'accumulation de métabolites dans les feuilles de blé, (iii) des dosages d'une activité enzymatique typique de défense chez le blé, la POX.

Résultats et discussions

Chapitre III

Association d'un traitement à base d'un chito-oligosaccharide avec un champignon mycorhizien arbusculaire pour lutter contre l'oïdium du blé

Résultats et discussions

1. Introduction

Suite à l'étape de sélection des molécules et des inoculum fongiques au regard de leur capacité de conférer une protection du blé contre l'oïdium, réalisée dans la première partie de cette thèse, le chito-oligosaccharide BioA187 et un inoculum mycorhizien à base d'une espèce de champignon mycorhizien arbusculaire (CMA) *Funneliformis mosseae* (Mycagro Lab) ont été retenus. Les efficacités de protection obtenues avec chacun d'entre eux étant significatives mais partielles, la deuxième partie de cette thèse a consisté à associer ces deux traitements afin de vérifier si une amélioration du taux de protection du blé contre la maladie pouvait être obtenue.

Plusieurs études antérieures ont démontré que le chitosan, un chitosaccharide obtenu par déacétylation de la chitine, en plus de ses propriétés antifongiques directes, est capable d'induire une résistance locale et systémique des plantes à différentes maladies causées par des agents pathogènes fongiques tels que *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *A. alternata* (Al-dhabaan et al., 2018 ; Leuba et al. , 1986 ; El Hassni et al., 2004 ; Benhamou et Picard, 2000 ; Faoro et al., 2008). Cependant, en France très peu de formulations à base de chitosan sont commercialisées (Sharathchandra et al., 2004). A ce jour, un seul SDP, connu sous le nom d'Elexa® et dont la molécule active est le chitosan a montré une efficacité contre différents agents pathogènes fongiques, et notamment *B. graminis* f. sp *hordei* responsable de l'oïdium chez l'orge (Jones, 2000 ; Agostini et al., 2003 ; Faoro et al., 2008). Utilisé en pulvérisation foliaire chez diverses espèces de cucurbitacées, la vigne, le tabac, l'orge ou comme un traitement de semence du millet, le chitosan diminue l'incidence de certains agents pathogènes foliaires tels que *Puccinia recondita*, *Sclerospora graminicola* et *B. cinerea* (Acar et al., 2008 ; Ma et al., 2011 ; Varnier et al., 2009 ; Trotel-Aziz et al., 2006 ; Faoro et al., 2008, Iriti et al., 2011 ; Sharathchandra et al., 2004 ; Popova et al., 2017). Sur blé, nous avons donc démontré que le traitement au BioA187 a conduit à une réduction de l'infection de la plante par *B. graminis* comprise entre 47 et 60% dans nos conditions de culture, quel que soit le substrat utilisé (terreau ou substrat artificiel supplémenté par la solution de Hogland), et quel que soit l'âge des plantules (3 ou 6 semaines).

En plus des traitements foliaires à base de SDP, l'inoculation des plantes par des microorganismes bénéfiques permet dans certains cas d'induire une résistance chez les plantes et représente donc une autre stratégie de biocontrôle intéressante des maladies fongiques. Parmi ces microorganismes, les CMA ont été décrits pour leur capacité à protéger les plantes

mycorhizées contre divers agents pathogènes racinaires (Castellanos-Morales et al., 2012 ; Miozzi et al., 2019). En revanche, leur rôle dans la lutte contre les maladies foliaires a été beaucoup moins étudié (Comby et al., 2018). Des travaux récents ont montré l'efficacité du CMA *Fm* à protéger un cultivar de blé sensible (cv. Orvantis) contre l'oïdium (Mustafa et al., 2016 ; 2017). Cette protection semble résulter de l'induction d'une résistance systémique appelée MIR pour Mycorrhiza-induced resistance, en réponse à la mycorhization du blé par *Fm*. Ces auteurs ont suggéré que les mécanismes de défenses activés chez le blé lors de la MIR altéraient le processus infectieux de *B. graminis* (Mustafa et al., 2016 ; 2017).

Afin de rechercher un éventuel effet pouvant améliorer la protection du blé contre l'oïdium, l'effet de ces traitements appliqués séparément ou en combinaison, a été évalué en mesurant différents paramètres : (1) les taux de protection contre *B. graminis*, (2) les taux de mycorhization des racines de blé, (3) les paramètres de croissance du blé, (4) la réponse du blé aux traitements en conditions infectieuses et non infectieuses par : (i) le suivi de l'expression de différents gènes marqueurs de défense ii) le dosage de l'activité enzymatique POX, marqueur des réactions de défense du blé et (iii) des analyses métabolomiques globale et ciblée.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels végétal, fongique et molécule testée

Les expérimentations ont été menées sur le cultivar de blé tendre Alixan (RAGT, Rodez, France). Concernant l'infection à l'oïdium, la souche utilisée du champignon biotrophe *B. graminis* est MPEB.graminis1 (Dr M.-P. Latorse de Bayer Crop Science, Lyon, France). Les plantules de blé âgées de 6 semaines ont été traitées par pulvérisation foliaire avec le chito-oligosaccharide BioA 187 à 100µM (Materia-Nova, Belgique). Pour la mycorhization du blé, un inoculum mycorhizien commercial (MycAgro, Bretenière, France) contenant des propagules de *Funneliformis mosseae* (*Fm*) (Walker et Schüßler 2010), a été utilisé.

2.2. Conditions de culture des plantules de blé

Les plantules de blé utilisées pour les différentes expérimentations sont cultivées dans des armoires de croissance (Panasonic, MLR-352H) dans des conditions contrôlées avec une humidité relative de 70%, une photopériode 12/12 (H), une intensité lumineuse de 250 µmol/m²/s, une température de jour de 18°C et une température de nuit de 12 °C (Randoux et al., 2006). Hydratés pendant 24 heures au préalable, 6 grains de blé sont semés par pot contenant 600 g d'un substrat inerte composé de sable, de perlite et de vermiculite (2 :1 :1, v/v/v). Ce

mélange est préalablement autoclavé deux fois durant 50 min à 127 °C afin d'éliminer les populations microbiennes, notamment les spores de CMA indigènes, qui pourraient être présentes (Pellegrino et al., 2015). Après germination, les plantules de blé ont été arrosées avec de l'eau distillée et avec 50 ml de solution nutritive de Hoagland P/2, par pot et par semaine (Hoagland et Arnon, 1950, Mustafa et al., 2016). La concentration de P étant égale à 62mg/L, correspond à 73kg /ha, la dose recommandée au champ pour la culture du blé tendre en France (Le Souder et al., 1998).

2.3. Traitements des plantules de blé

Pour la mycorhization des plantules du blé, l'inoculum mycorhizien a été introduit au début de l'expérimentation dans chaque pot, à raison de 10% du poids total du substrat inerte. Les plantes témoins non mycorhizées sont cultivées sur un substrat inerte autoclavé sans ajout d'inoculum mycorhizien. Pour le traitement des plantules de blé avec le chito-oligosaccharide BioA 187, ce dernier est préparé à une concentration de 100µM dans du DMSO à 0,1% dans de l'eau distillée, puis appliqué par pulvérisation foliaire à l'aide d'un pulvérisateur (ITW Surfaces et Finitions, Valence, France). Les plantules de blé utilisées comme témoins ont été traitées par le DMSO 0,1%. Pour toutes les expérimentations effectuées, trois pots, à raison de 6 plantules par pot, ont été utilisés pour chaque condition de traitement. Ainsi, 18 plantules de blé âgées de 6 semaines, réparties dans 3 pots, ont été pulvérisées avec 15 ml de solution. Dans le cadre de notre étude, différentes modalités, citées ci-dessous, ont été étudiées en conditions infectieuses et non infectieuses :

- i. Plantules de blé dont la partie foliaire est prétraitée uniquement par le BioA 187 :
BioA
- ii. Plantules de blé cultivées uniquement en présence de *F. mosseae* : **Fm**
- iii. Plantules de blé cultivées en présence de *F. mosseae* et prétraitées par le BioA 187:
BioA +Fm

2.4. Infection des plantes par *B.graminis* et détermination des taux de protection

Quarante-huit heures après l'application foliaire du BioA 187, les plantules de blé sont infectées avec 7.5mL d'une solution de suspension de spores calibrée à 5.10^5 spores/ml (Chapitre 1 paragraphe 2.4). Les pourcentages de protection (ou taux de protection) sont calculés suivant la formule suivante (Reignault et al., 2001) :

$$\text{Taux de protection} = 100 \times \left(\frac{\text{Nombre de colonies sur les plantes témoins traitées avec du DMSO 0.1\%} - \text{Nombre de colonies sur les feuilles des plantes traitées avec BioA, Fm et BioA+Fm}}{\text{Nombre de colonies sur les plantes témoins traitées avec du DMSO 0.1\%}} \right)$$

2.5. Détermination des taux de mycorhization des racines

Les taux de mycorhization sont déterminés pour chaque condition à partir de racines issues de plantules de blé cultivées dans 3 pots différents. Après la lecture des symptômes de la maladie et donc après 8 semaines de culture, les racines sont prélevées, lavées et colorées. La coloration des racines au bleu Trypan et l'évaluation des pourcentages de mycorhization selon la méthode de McGonigle et al., (1990) sont décrits précédemment (chapitre 1 paragraphe 2.5). Trois points de lecture par fragment sont effectués soit 405 lectures par condition (3 pots, 45 fragments/pot et 3 lectures/fragment) afin d'estimer les pourcentages de mycorhization.

2.6. Mesure des paramètres de croissance des plantules de blé

Afin d'étudier l'effet du traitement au BioA 187, de la mycorhization des plantules de blé avec le CMA *Fm*, ainsi que l'effet du co-traitement BioA +*Fm*, différents paramètres de croissance ont été évalués à 8 semaines de culture : la taille du maître brin mesurée à partir du collet jusqu'à l'apex de la dernière feuille du brin principal (en cm), le nombre de talles, le nombre de feuilles par plante de blé ainsi que la biomasse sèche de la partie aérienne des plants (Figure 35). Ces mesures ont été réalisées sur six plantules de blé par pot et trois pots par condition.

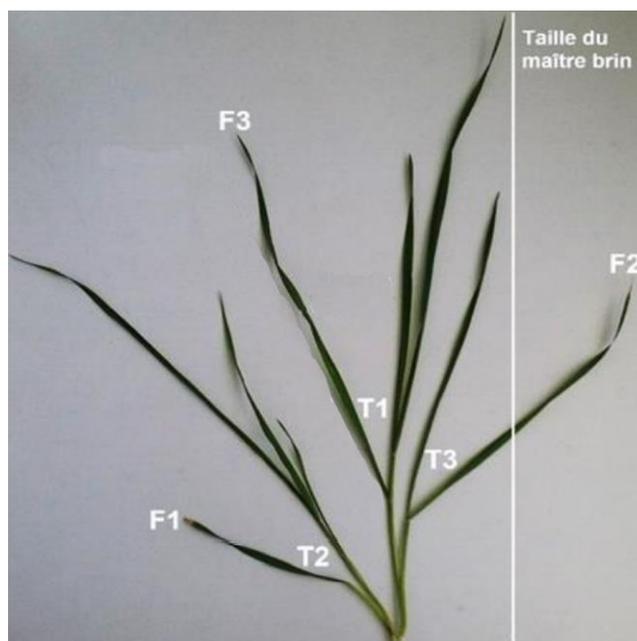


Figure 35 : Paramètres de croissance aérienne mesurés sur des plantules de blé. (Taille du maître brin (cm), F : Feuilles, T : Talles).

2.7. Dosage des pigments photosynthétiques

Dans le but d'évaluer les teneurs en chlorophylles (totales, a et b) et en caroténoïdes, 25 mg de feuilles prélevés à partir des 3^{èmes} feuilles, des plantes de blé âgées de 6 semaines, en condition infectieuse et non infectieuse. Les feuilles ont été broyées dans du carbonate de magnésium (0,5% v/v ; afin d'éviter l'acidification de la chlorophylle) et de l'acétone à 80%. Le mélange est placé à 4°C, à l'obscurité et sous agitation permanente toute une nuit. La solution est ensuite centrifugée à 4°C à 10 000g pendant 10 minutes. Les concentrations en chlorophylles a et b (Ca et Cb) et en caroténoïdes totaux sont mesurés suivant la méthode de Lichtenthaler (1987). Les concentrations en pigments ont été exprimées en $\mu\text{g mg}^{-1}$ de matière fraîche initiale et déterminées grâce aux équations de Lichtenthaler ci-dessous :

- $[\text{Chla}] \mu\text{g mL}^{-1} = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647} = \text{Ca}$
- $[\text{Chlb}] \mu\text{g mL}^{-1} = 21,50 \times A_{647} - 5,10 \times A_{663} = \text{Cb}$
- $[\text{Chl totale}] \mu\text{g mL}^{-1} = 18,71 \times A_{647} + 7,15 \times A_{663} = \text{Ca} + \text{Cb}$
- $[\text{Car}] \mu\text{g mL}^{-1} = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times \text{Ca} - 85,02 \times \text{Cb}) / 198$

2.8. Dosage de l'activité enzymatique peroxydase

L'activité peroxydase (POX) a été mesurée chez les plantules de blé âgées de 6 semaines et traitées par le BioA 187, *Fm*, et le BioA 187 +*Fm*, ainsi que chez les plantules témoins, et ce en condition infectieuse et non infectieuse. La 3^{ème} feuille du maître brin des plants de blé a été échantillonnée à 9H et 48H après le traitement foliaire par le BioA 187 et ce en absence de l'agent pathogène. En condition infectieuse, les 3^{èmes} feuilles ont été prélevées à 12H et 24H après infection (Hpi) par *B. graminis*, ce qui correspond à 60H et à 72H post-traitement (Hpt) (Figure 36). Pour chaque modalité, trois feuilles ont été prélevées à partir de 3 pots (à raison de 3 réplicats par condition) et ont été directement stockées à -80°C.

Les feuilles de blé ont été ensuite pesées, 100 mg du matériel biologique a été broyé et homogénéisé avec 1 ml de tampon phosphate (0.1M phosphate, pH 7.0). Le mélange a été centrifugé à 12000 x g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est conservé sur de la glace avant de servir pour le dosage de l'activité enzymatique POX (EC 1.11.1.7). Cette dernière a été mesurée à l'aide de l'acide 2,2'-azino-bis acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS), donneur d'électrons à 20°C suivant la méthode de Mitchell et al., (1994). Pour chaque échantillon, 1 ml du mélange réactionnel (500 µM d'ABTS, 25Mm d'un tampon d'acétate de sodium à pH 4.4 et 250 µM de H₂O₂ à 35%) a été additionné à un volume adéquat (1ml) de surnageant. Il est composé de 5 µL du surnageant de l'échantillon végétal ou du tampon d'extraction mélangé avec 995 µL du mélange réactionnel. La cinétique de l'activité enzymatique POX a été mesurée toutes les 30 secondes à 412 nm ($\epsilon = 32\ 400\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) durant 5 minutes, les résultats sont exprimés en nanokatal par mg de protéines. La concentration totale en protéines des extraits foliaires est dosée à 750 nm selon la méthode colorimétrique de Lowry et al., (1951) grâce à l'utilisation du kit "Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification" (Saint-Quentin Fallavier, France). La gamme étalon a été établie à partir de sérum albumine bovine (BSA).

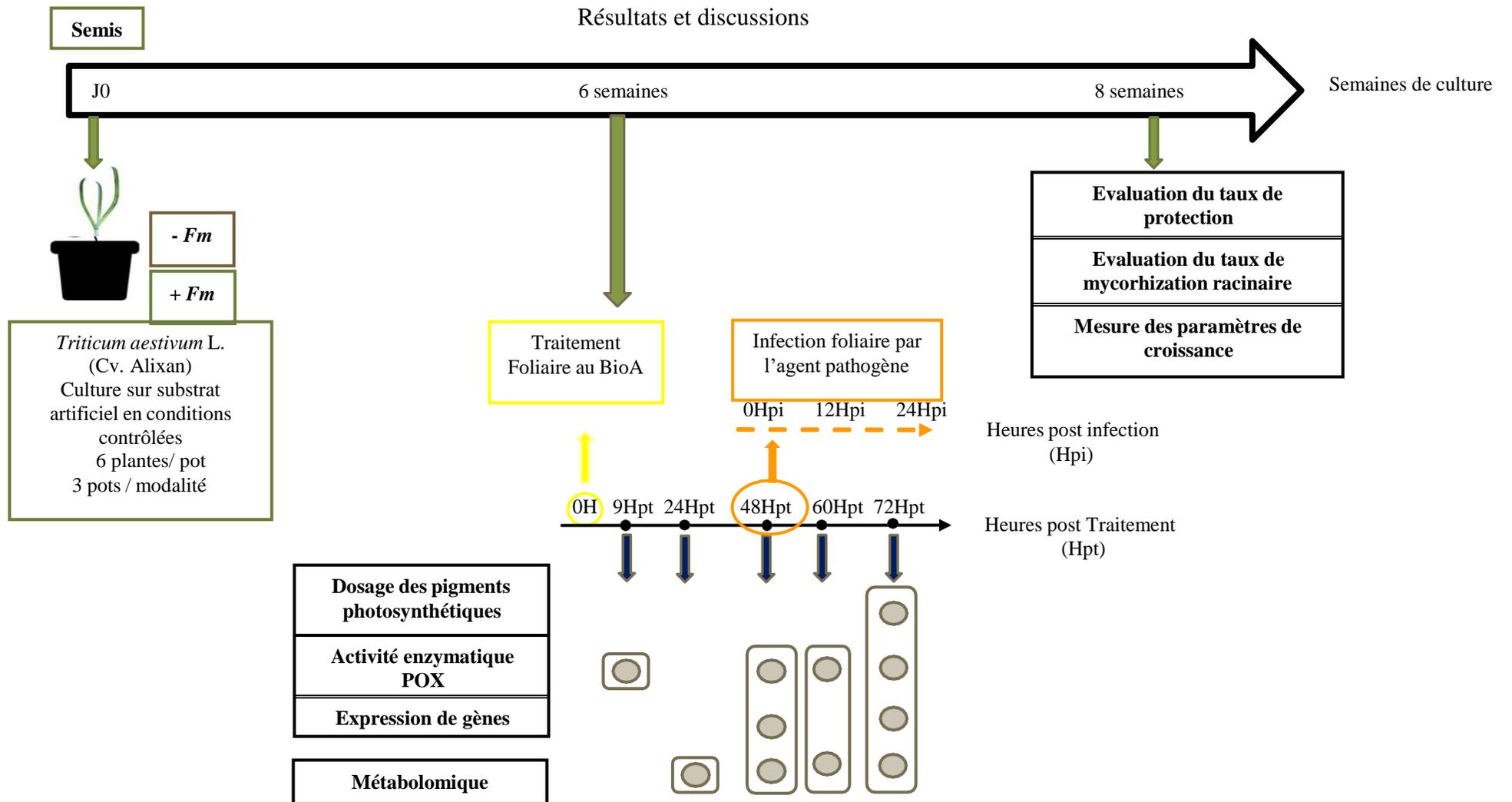


Figure 36 : Schéma récapitulant la méthodologie des traitements selon les modalités (BioA 187, *Fm* et BioA+*Fm*) et la cinétique de l'échantillonnage des 3^{èmes} feuilles de blé pour chaque analyse. Les trois feuilles ont été prélevées à partir de 3 pots différents (à raison de 3 réplicas par modalité). Pour chaque temps de cinétique, des feuilles de plantes de blé témoins (DMSO 0.1%) ont été prélevées.

2.9. Suivi de l'expression des gènes de défense chez le blé

Le suivi de l'expression des gènes de défense a été effectué sur les 3^{èmes} feuilles de plantules de blé à différents points cinétiques selon le schéma expérimental (Figure 2). Une fois prélevées, les feuilles sont conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.9. a Extraction des ARNs

L'extraction des ARNs totaux a été effectuée selon une méthode adaptée de Chang et al. (1993). Un mL de tampon d'extraction, contenant 2% de CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium), 2% de PVP (polyvinylpyrrolidinone K30), 100mM Tris HCl (pH8), 25mM EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique), 2M NaCl et 3% β -mercaptoéthanol, est ajouté à 1g de poudre végétale issues du broyage à l'azote liquide des feuilles échantillonnées, puis l'ensemble est vigoureusement vortexé et chauffé à 65°C pendant 15 min. La phase aqueuse renfermant les acides nucléiques est séparée de la phase organique en ajoutant 1mL de solution de chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1) à chaque échantillon (volume 1/1) et en centrifugeant l'ensemble à 16 100 RCF, à 4°C pendant 20min. La phase aqueuse est prélevée afin de renouveler la séparation de phase au chloroforme/alcool isoamylique (24:1) comme énoncé précédemment. La phase aqueuse a été récupérée et les ARNs ont été précipités par l'ajout de 250 μ l de chlorure de lithium (10M) gardée à 4°C pendant une nuit. Les culots d'ARNs totaux, récupérés par centrifugation à 16 100 RCF pendant 20 min à 4°C, sont ensuite lavés deux fois avec 500 μ l d'éthanol (70%) refroidi à -20°C et séchés quelques minutes à l'air libre afin d'enlever les traces d'éthanol. Les culots d'ARN ont ensuite été repris dans 25 μ l d'eau exempte de RNase (Qiagen, Hilden, Allemagne). Afin d'éliminer des contaminations d'ADN génomique, un traitement des échantillons à la DNase a été effectué en ajoutant 5 μ l d'un tampon composé d'un tampon 10X de DNase, du RQ1 RNase-Free DNase et du RNasine® plus RNase Inhibitor (3 :1 :1, v/v/v ; Promega, États-Unis) suivi de 10 minutes d'incubation à température ambiante. Puis, 400 μ L d'un tampon de lyse, composé de 10mM Tris HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0), 1M NaCl et 0.5% SDS, ont ensuite été ajoutés et mélangés aux échantillons. Une nouvelle purification des ARNs a alors été effectuée en complétant la solution avec 500 μ L de chloroforme/alcool isoamylique (24:1) et en séparant les phases par une centrifugation à 16 100 RCF, à 4°C pendant 10 min. Deux volumes d'éthanol (100%) ont ensuite été ajoutés à la phase aqueuse récupérée, puis placés à -20°C pendant 2 heures pour

Résultats et discussions

précipiter les ARNs. Après une centrifugation de 45 min, à 16 100 RCF et à 4°C, les culots contenant les précipités d'ARN ont été lavés successivement quatre fois avec 500µl d'éthanol (70%) refroidi à -20°C, puis séchés afin de permettre l'évaporation de l'alcool. Le culot a ensuite été re-suspendu dans 30µl d'eau exempte de RNase (Qiagen, Hilden, Allemagne). La quantification et la qualité des ARNs ont respectivement été évaluées par mesure de leur densité optique à 260 nm et des rapports 260/280 et 260/230 suivant les instructions du fabricant du biophotomètre (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Le rapport 260/280 est attendu entre 1.8 et 2 pour attester d'une absence de contamination par des protéines alors que le rapport de 260/230 doit être supérieur à 2.0 pour indiquer une faible contamination par des polysaccharides ou d'autres constituants. La qualité des ARNs a ensuite été vérifiée par migration sur gel d'agarose (10g/L) additionné de GelRed (0,005% v/v), agent intercalant permettant l'observation des acides nucléiques sous UV (Fisher Bioblock Scientific), puis révélée sous UV, pour s'assurer de l'absence de contaminations par de l'ADN génomique et de l'absence de dégradation des ARNs extraits.

2.9. b RT-PCR et analyse de l'expression des gènes

Pour réaliser la transcription inverse des ARNs en ADNc à l'aide du kit « High Capacity cDNA reverse transcriptase » (ThermoFisher scientific anciennement Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA), pour lequel nous avons suivi le protocole indiqué par le fabricant (Tableau 9), 1 µg d'ARN total est utilisé. Le programme du thermocycleur (Agilent Technologies SureCycler 8800) adapté pour réaliser la RT est composé d'une première phase de 10 min à 25°C puis une deuxième phase de 120 min à 37°C. A la fin du programme, les échantillons sont stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel de la reverse transcriptase.

Composition	[Conc.] initiale	Volume ajouté (µL)
RT tampon	10X	2
dNTP	25X	0,8
RT Random primers	10X	2
Multiscribe Reverse Transcriptase	50 U /µl	1
H ₂ O RNase free	-	4.2
ARN	100 ng/µL	10
	Volume Total	20 µL

Afin d'attester de la bonne réalisation de cette étape de transcription inverse, une réaction d'amplification d'ADN a été réalisée afin de vérifier que les ARNm ont bien été transcrits en ADN complémentaire (ADNc) : une quantité de 0,5µL de solution d'ADNc de

Résultats et discussions

chaque échantillon de notre cinétique a été prélevée afin de réaliser la réaction d'amplification dont les conditions sont présentées dans le tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10 : Composition du mélange réactionnel d'amplification d'ADN par PCR.

Composition	[Conc.] initiale	[Conc.] finale	Volume ajouté (µL)
Tampon de réaction	10X	1X	2
dNTP	4 mM	0.2mM	1
MgCl ₂	25mM	2mM	1.6
Couple amorces (Forward + Reverse)	10µM	1µM	4
Taq Polymérase	5U / µl	0.02U / µl	0.08
H ₂ O	-	-	10.82
ADNc	-	-	0.5
Volume Total			20 µL

Le programme du thermocycleur (Agilent Technologies SureCycler 8800) est composé d'une phase de dénaturation initiale de 5 min à 95°C afin de séparer les hybrides ARN/ADNc et d'homogénéiser le milieu réactionnel, suivie de 3 étapes successives se répétant sur 35 cycles se composant d'une phase de dénaturation à 95°C de 45 sec pour séparer les ADNc double brin, d'une phase d'hybridation des amorces à 60°C de 60 sec et d'une phase d'élongation à 72°C de 30 sec pour permettre la synthèse du brin complémentaire, puis enfin, une phase d'extension finale à 72°C de 10 min.

Les échantillons d'ADNc ont été utilisés afin de réaliser les réactions d'amplification en temps réel impliquant une lecture du signal de fluorescence à chaque cycle de la réaction. Ce signal de fluorescence est obtenu par l'ajout d'un fluorophore, le SYBR green, qui présente la particularité de se complexer à un double brin d'ADN et d'absorber la lumière bleue pour émettre dans le vert. Le signal de fluorescence augmente avec la quantité d'amplicons formés. Les réactions d'amplification ont été réalisées selon les instructions fournies par le fabricant du Biorad CFX connect (Biorad, Hercules, CA, USA) en utilisant le SYBR SsoAdvanced Universal Green Supermix (Biorad, Hercules, CA, USA). Chaque puits de la plaque qPFD a été chargé par 3µL de couple d'amorces (Tableau 10), 12µL de mix (7,5µL SYBR (2X), 4.35 µL H₂O et 0.15µL d'ADNc (1µg/µL)). Le programme d'amplification est le suivant : 15 s à 95°C (dénaturation) et 1 min à 60°C (hybridation et élongation) pendant 40 cycles. L'analyse des courbes de fusion a été réalisée de 65 à 95°C à 0,5°C/s et la spécificité d'amplification a été vérifiée par la visualisation des pics des courbes de fusion. Les couples d'amorces utilisés pour

Résultats et discussions

l'analyse de l'expression de 12 gènes impliqués dans les réactions de défense proviennent d'un d'outil moléculaire de criblage chez le blé de SDPs, développé par l'INRA d'Angers (Brisset et Dugé de Bernonville, 2011). Les résultats obtenus ont été normalisés grâce au suivi de deux gènes de référence mesurés pour chacun des échantillons : *TUB β* , codant la tubuline β et *ACT*, codant l'actine. Pour chaque temps de la cinétique, l'expression relative des gènes est exprimée en fonction des échantillons témoin respectifs, selon la méthode $2(-\Delta\Delta Ct)$ décrite par Schmittgen et Livak (2008). Les valeurs du niveau d'expression des gènes représentent la moyenne des 3 répétitions biologiques, provenant de 3 pots distincts (1 feuille/pot) à raison de trois triplicats techniques par gène. Deux expériences indépendantes (Exp.1 et Exp.2) ont été réalisées pour confirmer les résultats.

Résultats et discussions

Tableau 11 : Liste des gènes impliqués dans les mécanismes de défense du blé dont l'expression relative a été évaluée par RT-PCR.

Mécanismes de défense	Gène	Protéines codantes correspondantes	Fonctions
Protéines liées à la pathogénèse	PR1	Pathogenesis-related protein 1	Impliquées dans les activités antimicrobiennes et l'intensification des signaux de défense des plantes (Breen <i>et al.</i> , 2017)
	PR4	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like)	Peptides antimicrobiens végétaux (AMP) agissant sur les parois cellulaires des agents pathogènes (Sudisha <i>et al.</i> , 2012)
	PR5	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin-like, osmotin)	Responsables de la lyse cellulaire des hyphes fongiques et identifiées comme des composés antifongiques qui s'accumulent dans les vacuoles végétales (Sudisha <i>et al.</i> , 2012)
	PR8	Pathogenesis-related protein 8 (classe III chitinase)	Agissent comme perturbateurs de la paroi cellulaire des champignons par hydrolyse des liaisons glycosidiques des molécules de chitine (Sudisha <i>et al.</i> , 2012)
	PR14	Pathogenesis-related protein 14 (protéine de transfert des lipides)	Associées à la paroi cellulaire, elles sont responsables du transfert de la charge lipidique et impliquées dans la synthèse de la cutine (Sudisha <i>et al.</i> , 2012)
	PR15	Pathogenesis-related protein 15 (oxalate oxidase)	Participent à la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO) directement après l'infection par un agent pathogène (Sudisha <i>et al.</i> , 2012)
Voie des phenylpropanoïdes	PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	Agit comme un régulateur positif de la voie de signalisation de l'acide salicylique afin de s'opposer aux pathogènes microbiens <i>via</i> son activité enzymatique dans la voie des phénylpropanoïdes (Kim <i>et al.</i> , 2014)
	CHS	Chalcone synthase	Impliqué dans la voie de défense de l'acide salicylique par son rôle dans la biosynthèse de flavonoïdes /isoflavones (Dao <i>et al.</i> , 2011)
	FNS	Flavone synthase	Participe à la biosynthèse des flavones appelés des phytoalexines connus par ses propriétés antimicrobiennes et insecticides (Du <i>et al.</i> , 2010)
Système antioxydant	POX	Peroxydase	Participe à la formation de la lignine et de la subérine, à la synthèse des phytoalexines, au métabolisme des ERO et des ERA (espèces réactives de l'azote) agissant sur la réponse hypersensible (Almagro <i>et al.</i> , 2009)
Composés pariétaux	CalS	Callose synthase	Permet la synthèse de callose lors de l'infection des plantes par des agents pathogènes microbiens (Voigt, 2014)
Voie de l'acide salicylique	WRKY	WRKY transcription factor 30	Impliqué dans l'activation des gènes de biosynthèse de l'acide salicylique afin de mettre en place une résistance systémique acquise (van Verk <i>et al.</i> , 2011; Gao <i>et al.</i> , 2015)

2.10. Analyse métabolomique

L'analyse métabolomique a permis de définir le profil de l'ensemble des métabolites primaires et secondaires présents au niveau de la 3^{ème} feuille des plantules du blé selon les différents traitements testés (Témoin, *Fm*, BioA et BioA+*Fm*). Les prélèvements de feuilles ont été réalisés hors contexte infectieux à 60H et 72H post traitement foliaire avec BioA 187 ou le DMSO 0.1% pour les plantules témoins. De même des prélèvements ont été réalisés après infection des plantules par *B. graminis*, à savoir 12 et 24Hpi, afin de mettre en évidence l'effet des traitements et de l'infection sur le profil métabolomique. Le design expérimental présenté en Figure 2 explicite les points de cinétiques auxquelles les feuilles des plantules de blé ont été prélevées.

2.10. a Extraction des métabolites et analyse par chromatographie et spectrométrie de masse

La 3^{ème} feuille a été collectée, congelée dans l'azote liquide puis conservée à -80°C jusqu'à utilisation. Les échantillons ont été lyophilisés pendant 24 heures (Freezone 2.5, Labconco, Kansas City, USA) et ensuite pesés. Les échantillons (20 mg) sont broyés (4 x 30 secondes à une vitesse de 30 oscillations / sec) dans des tubes Eppendorf de 2ml, à l'aide d'un broyeur à billes (TissueLyser II, Qiagen). Les métabolites sont extraits avec du méthanol (25µL/mg de poids sec) complété par un standard interne (apigénine, 1mg/L). Les échantillons sont incubés pendant 10min dans un bain à ultrasons (FB15050, Fisher Scientific, Hampton, USA) et centrifugés à 12000g pendant 15min. Le surnageant est ensuite transféré dans des flacons spécifiques pour les analyses LC-MS (flacon N9 en polypropylène, Macherey Nagel, Hœrdt, France). Les échantillons sont analysés par chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (UHPLC, Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000, Waltham, USA). Les séparations chromatographiques sont effectuées sur une colonne analytique Nucleodur™ C18 HTec (150 x 2mm, taille des particules 1.8µm ; Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) maintenue à 30°C. La phase mobile est constituée d'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique (v/v) (éluant A) et d'eau/acide formique (0,1%, v/v) (éluant B) à un débit maintenu à 0,3mL/min. Le volume d'injection de l'échantillon est de 1µL. Le programme de gradient (temps (min), % B) est le suivant : (0 - 1min, 95% B) ; (1 - 2min, 95% à 85% B) ; (2 - 7min, 85% à 0% B) ; (7-9min, 0% B).

Le système UHPLC est couplé à un spectromètre de masse haute résolution Exactive Orbitrap (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA), équipé d'une source d'ionisation par électrospray

(ESI) fonctionnant en mode positif afin d'étudier les ions positifs. Les paramètres ont été fixés à 300°C pour la température du capillaire de transfert d'ions et à 2500V pour la tension de pulvérisation.

Le débit d'azote utilisé pour la nébulisation et comme gaz auxiliaire est fixé à 40 et 5 (unités arbitraires) respectivement. Les spectres sont enregistrés dans la gamme de masse m/z de 100 à 1000 unités de masse atomique (u.m.a.), avec une résolution de 50 000 à m/z 200 u.m.a. Le système est calibré en interne en utilisant du dibutylphtalate (lock-mass, m/z 279.1591), donnant une précision en masse inférieure à 1ppm. L'instrument est contrôlé à l'aide du logiciel Xcalibur (Thermo Fischer Scientific, USA).

Les fichiers de données brutes issus des analyses métabolomiques en spectrométrie de masse sont traités avec le logiciel Xcalibur. Les métabolites d'intérêt ont été recherchés sur la base du m/z calculé de l'ion pseudo-moléculaire correspondant $[M+H]^+$ en utilisant une approche de recherche d'ions candidats (« suspect screening », Krauss et al., 2010 ; Flamini et al., 2013). Les métabolites d'intérêt ont été sélectionnés sur la base d'une analyse bibliographique de la caractérisation du métabolome du blé. Ces métabolites appartiennent en particulier aux familles chimiques suivantes : les benzoxazinoïdes, les flavonoïdes et les polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques (hydroxycinnamic acid amides, HCAA) (de Bruijn et al., 2016 ; Wojakowska et al., 2013 ; Li et al., 2018 ; Seybold et al., 2020). L'identification des métabolites est proposée sur la base de l'analyse expertisée des spectres de masse correspondants et de la comparaison avec les données publiées. Pour un certain nombre de métabolites (acides aminés, hormones), ces identifications ont été confirmées à l'aide des standards commerciaux correspondants (Sigma-Aldrich, L'Isle-d'Abeau, France

2.11. Traitement des données

Les tests statistiques ont été réalisés à partir de 3 répliques avec le logiciel XLStat. Pour l'ensemble des résultats obtenus, le test de Shapiro-Wilk et le test de Bartlett ont été utilisés pour vérifier la normalité des échantillons. Les résultats ont été analysés en utilisant un test paramétrique pour l'analyse de variance (ANOVA) ou un test non paramétrique (Kruskal-Wallis). Les données quantitatives ont été décrites par leur moyenne et leur écart type. Les taux de mycorhization, celles-ci ont été transformées en coordonnées angulaires (arc sinus de la racine carrée : $p' = \arcsin \sqrt{p}$), avant l'analyse statistique.

Les analyses statistiques et les représentations associées à l'analyse métabolomique sont réalisées grâce à un pipeline d'analyse développé au sein de l'équipe MSV (INRAE Colmar) avec le logiciel R. Les analyses différentielles sont réalisées à l'aide du test de Tukey (Tukey's honestly significant difference test) suivie d'une correction de tests multiples (false discovery rate, FDR) de Benjamini-Hochberg.

3. Résultats

3.1. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur la protection du blé contre *B. graminis*

Les tests de protection ont été réalisés sur des plantules de blé âgées de 8 semaines cultivées en conditions contrôlées.

Dans la première expérimentation, une moyenne de 50 colonies a été comptabilisée sur la 3^{ème} feuille des plantules témoins. Les plantes traitées au BioA 187 et au *Fm* ont présenté un nombre de colonies de *B. graminis*, formées sur les 3^{èmes} feuilles, significativement inférieur par rapport aux plantules témoins, avec des moyennes respectives de 34 et 29 colonies. Ainsi, des taux de protection partiels contre l'oïdium de 33 et 42% ont été obtenus suite aux traitements des plants de blé par le BioA 187 et le *Fm* respectivement. La combinaison des deux traitements a permis de réduire le nombre de colonies de *B. graminis* à 14 contre 50 chez le témoin. Le traitement combiné (BioA 187+ *Fm*) montre ainsi un effet partiellement additif menant à un taux de protection du blé contre l'oïdium de 72% (Figure 37.A). Pour la seconde expérimentation, une moyenne de 70 colonies a été comptabilisée sur les 3^{èmes} feuilles de blé témoins. Des taux de protection de 69 et 66% ont été observés respectivement avec les traitements BioA 187 et *Fm* par comparaison au témoin. Une protection significative et quasi-totale (98%) contre l'oïdium du blé a été observée chez les plantules traitées par la combinaison (BioA 187+*Fm*) confirmant l'effet additif obtenu lors de la première expérience (Figure 37).

Résultats et discussions

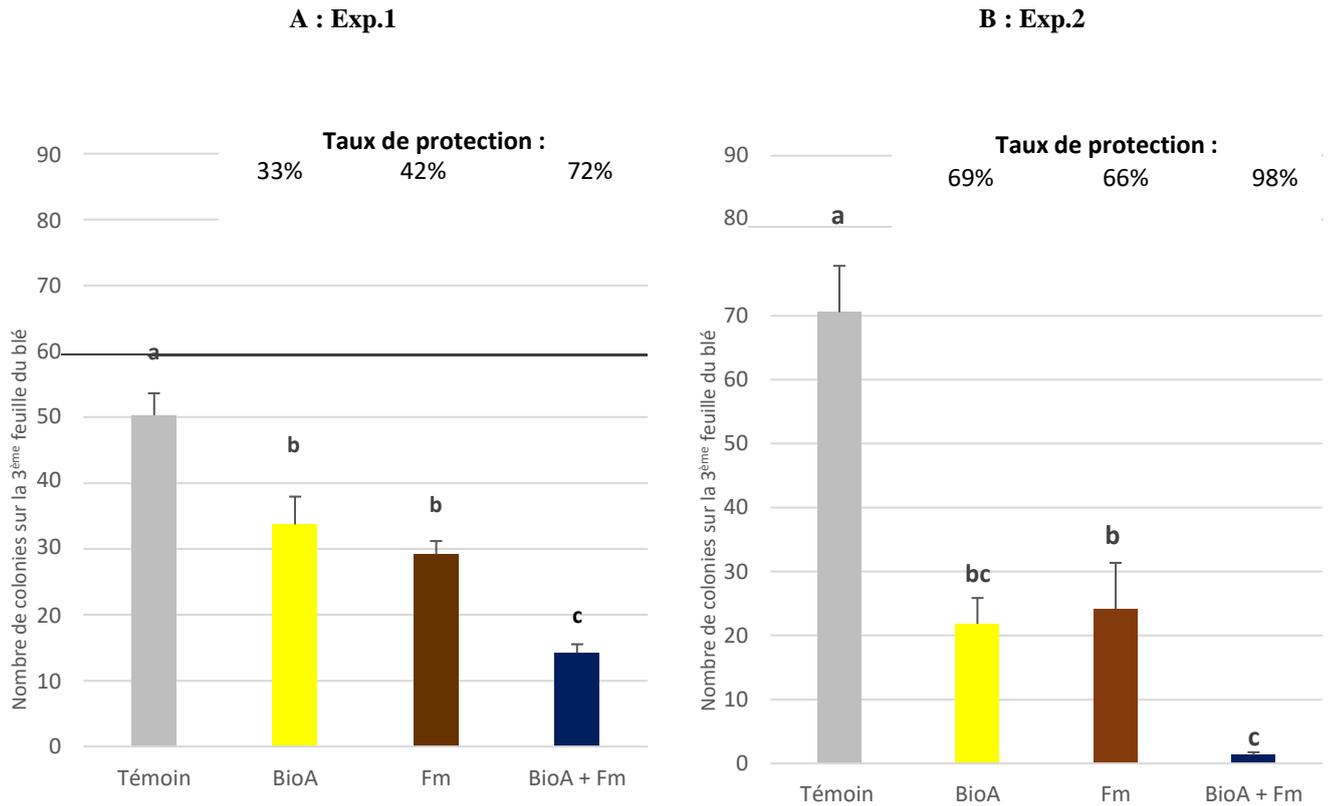


Figure 37 : Nombre de colonies de *B. graminis* et taux de protection observés sur la 3^{ème} feuille des plantules de blé âgées de 8 semaines traitées par BioA 187 en jaune ; *Fm* en marron et par BioA 187+ *Fm* en bleu. Les plantules de blé témoins ont été traitées par le DMSO (en gris). Deux expérimentations indépendantes Exp.1 et Exp.2 ont été effectuées pour confirmer les résultats. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA $P \leq 0.05$).

3.2. Mycorhization des racines de blé

L'établissement de la symbiose mycorhizienne a été évalué en estimant les taux de colonisation des racines de plantules de blé âgées de 8 semaines et cultivées sur un substrat artificiel autoclavé, additionné d'un inoculum mycorhizien commercial *Fm*. Aucune structure mycorhizienne n'a été observée dans les racines des plantules de blé témoins (DMSO 0,1%) cultivées sans ajout d'inoculum mycorhizien, confirmant ainsi l'efficacité de la double stérilisation du substrat.

Des structures spécifiques des CMA, arbuscules et vésicules, ainsi que des hyphes ont été observés chez les plantules de blé cultivées en présence de l'inoculum mycorhizien *Fm* traitées ou non avec le BioA 187. Seuls les résultats de l'Exp.1 sont décrits par la suite puisque des résultats similaires ont été obtenus dans les deux expériences. Les taux de mycorhization totaux ont été estimés à 23,7 % chez les racines de blé inoculées avec *Fm* et 27,7% chez celles traitées

par le BioA 187+*Fm*. Les taux de mycorhization arbusculaire et vésiculaire ont été estimés respectivement à 22,8 et 0,9% avec le traitement *Fm* et à 27,0 et 0,7% dans le cas du traitement combiné (BioA 187+*Fm*). Il est à noter qu'aucune différence significative au niveau des différents taux de mycorhization n'a été observée entre les racines de plantules inoculées avec *Fm* et celles inoculées et traitées avec le BioA 187 et ce pour les deux expérimentations indépendantes effectuées. Le traitement au BioA 187 des plantules de blé cultivées en présence de *Fm* et âgées de 6 semaines, ne semble pas avoir d'impact sur la colonisation racinaire par *Fm* et ce, deux semaines post traitement foliaire (Tableau 12).

Tableau 12 : Taux de colonisation des racines de blé après 8 semaines de culture en présence de l'inoculum mycorhizien *Fm*. Les résultats ont été obtenus à partir de deux expérimentations indépendantes (Exp.1 et Exp2). Des lettres différentes indiquent des différences significatives des taux mycorhization totale, arbusculaire et vésiculaire des racines de blé obtenus avec BioA 187+*Fm* par rapport à *Fm* selon le test Anova ($P \leq 0,05$). Les observations ont été effectuées sur 135 fragments racinaires de 18 plantes prélevées dans trois pots différents.

Taux de colonisation (%)		Totale	Arbusculaire	Vésiculaire
Exp.1	<i>Fm</i>	23,7±2,6 a	22,8±2,4 b	0,9±0,27 c
	BioA+<i>Fm</i>	27,7±2,4 a	27,0±2,1 b	0,7±0,42 c
Exp.2	<i>Fm</i>	24,2±2,5 A	21,5±2,6 B	2,7±1,9 C
	BioA+<i>Fm</i>	23,5±2,7 A	23,5±2,7 B	0,00 C

3.3. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur la croissance du blé

Les effets des traitements au BioA 187, de l'inoculation mycorhizienne avec *Fm* ainsi que du traitement combiné (BioA 187 + *Fm*) ont été évalués sur différents paramètres de croissance du blé par mesure de la taille du maître brin, du nombre de feuilles, du nombre de talles et des poids secs de la partie aérienne des plantules après 8 semaines de culture (Figure 38). Il est à signaler que ces mesures n'ont pu être réalisées que sur une seule expérimentation (18 réplicas / mesure). Alors que la taille du maître brin des plantules de blé traitées au BioA 187 seul et les

Résultats et discussions

plantes inoculées avec *Fm* est significativement inférieure à celle des plantules témoins, la taille du maître brin des plantules qui ont reçu le traitement combiné (BioA 187+*Fm*), n'ont présenté aucune différence significative par rapport au témoin (Figure 1.A). Le traitement combiné BioA 187+*Fm* a augmenté significativement le nombre des feuilles par rapport au témoin, alors qu'aucun effet n'a été observé pour les traitements BioA 187 et *Fm* (Figure 38.B). Un nombre moyen de 2 talles par plantes a été comptabilisé et cela quel que soit la condition (Figure 38.C). En ce qui concerne le poids sec des plantules, une diminution significative de 31% du poids sec des plantules traitées au BioA 187 a été observée. En revanche, les plantules inoculées par *Fm* ne montrent aucune différence significative par rapport au témoin. Enfin, le poids sec des plantules traitées par (BioA 187 + *Fm*) a été significativement plus important (de 17%) que celui des plantules témoin (Figure 38. D).

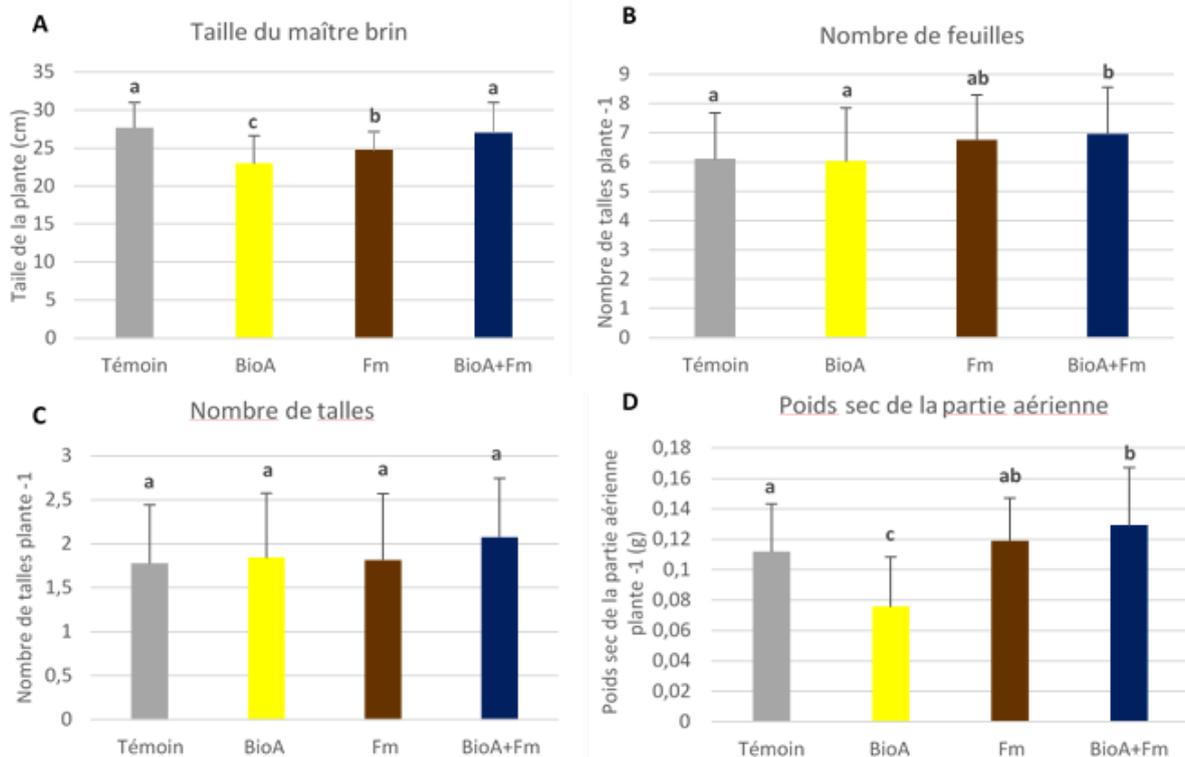


Figure 38 : Mesure des paramètres de croissance sur des plantules de blé âgées de 8 semaines en réponse aux traitements par BioA 187 en jaune ; *Fm* en marron et par BioA 187+ *Fm* en bleu. Les paramètres évalués sont, A : la taille du maître brin (en cm), B : le nombre de talles par plantule, C : le nombre de feuilles par plantule, D : le poids sec de la partie aérienne de chaque plantule (en g). Les paramètres de croissance de la seconde expérimentation n'ont pu être mesurés. Les plantules de blé témoins sont présentées en gris. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA P ≤ 0.05).

3.4. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur les teneurs en pigments photosynthétiques des plantules de blé

Les teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylles totales, a et b, caroténoïdes) ont été mesurées dans les 3^{èmes} feuilles des plantules de blé en condition non infectieuses (*-B.graminis*) et infectieuses 24Hpi (*+B.graminis*) (Figure 4). Pour les deux expérimentations réalisées, aucune différence significative des teneurs en pigments photosynthétiques n'a été observée entre les traitements *Fm*, BioA 187 en conditions infectieuses et non infectieuses. Toutefois, une diminution significative des teneurs en chlorophylles b a été mesurée chez les plantules non infectées traitées par la combinaison (BioA 187+*Fm*). En ce qui concerne la teneur en caroténoïdes, une diminution significative a été notée uniquement chez les plantules de blé infectées ayant reçu le traitement combiné (BioA +*Fm*) (Figure 4).

Résultats et discussions

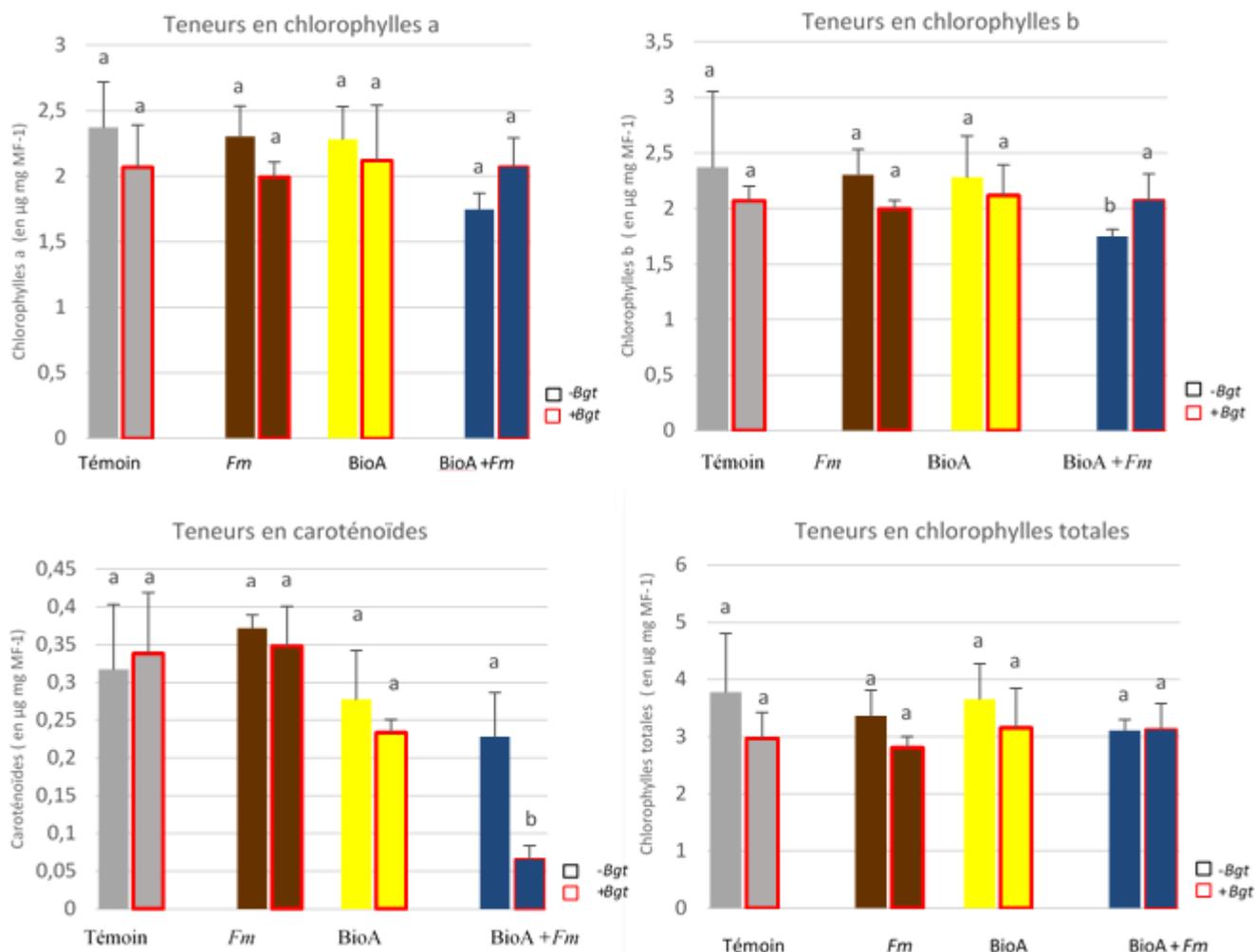


Figure 39 : Teneurs des pigments photosynthétiques (en $\mu\text{g.mg}$ de matière fraîche (MF)) dans la 3^{ème} feuille de plantules de blé âgés de 8 semaines en réponse à l'infection au *B.graminis* (+*B.graminis*) 24Hpi et en conditions non infectieuses (-*B.graminis*), en fonction des traitements : Fm en marron, BioA 187 en jaune, BioA 187 +Fm en bleu comparés au témoin DMSO 0.1% en gris. Deux expérimentations indépendantes Exp.1 et Exp.2 ont été effectuées pour confirmer les résultats. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA $P \leq 0.05$).

3.5. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur l'expression des gènes marqueurs des défenses du blé

Deux expérimentations indépendantes, présentées ci-dessous, ont été effectuées sur les 3^{èmes} feuilles de blé en conditions non infectieuses à 48Hpt et 72Hpt (post traitement foliaire par le BioA 187/ DMSO en fonction des conditions). Le suivi de l'expression des gènes impliqués dans les réactions de défense du blé impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes, voie de l'acide salicyliques, des protéines liées à la pathogenèse, système oxydant et aux composés pariétaux (*PR1*, *PR4*, *PR5*, *P8*, *PR14*, *PR15*, *PAL*, *CHS*, *FNS*, *POX*, *CalS*, *WRKY*) a été également réalisé en conditions infectieuses 72Hpt. Les résultats ont été exprimés par comparaison au témoin DMSO respectif à chaque point de la cinétique (Figure 5). L'analyse de l'expression des gènes est établie selon les profils des gènes obtenus à partir des deux expérimentations (A. Exp.1 et B. Exp.2).

3.5. a En conditions non infectieuses

Afin d'évaluer si les traitements BioA187, *Fm* et BioA187+Fm provoquent l'induction des gènes marqueurs de défense du blé dans les tissus foliaires en absence du champignon pathogène, un suivi de l'expression des 12 gènes a donc été réalisés en condition non-infectieuses.

L'effet de la mycorhization seule sur l'expression de ces gènes au niveau foliaire a été évalué en se référant simultanément au temps 48 et 72 Hpt (8 semaines \pm 2 ou 3 jours) de chacune des expérimentations (Figure 5, A. Exp1, B. Exp2). Nous avons donc considéré l'induction ou la répression du gène ciblé pertinente lorsque celle-ci était retrouvée au moins 3 fois sur 4, puisque les échantillons de feuilles provenaient de plantes inoculées par le CMA 8 semaines auparavant + 48Hpt ou + 72Hpt. En ce sens, le suivi de l'expression des gènes marqueurs dans les tissus foliaires du blé inoculé avec *Fm* seul, 8 semaines plus tôt, semble révéler une modulation de l'expression de certains gènes marqueurs de défense suivis. En ce qui concerne les gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes, un des trois gènes testés, le gène *PAL*, codant la phénylalanine ammonia lyase, est surexprimé d'environ 2 fois par rapport aux plantules témoins. Impliqué dans les systèmes antioxydants, l'expression du gène *POX* est au minimum doublée chez les plantes mycorhizées par rapport aux plantes témoins non mycorhizées. En

revanche, aucun des 8 gènes codant des protéines PR n'est induit de façon reproductible (Figure 40).

Contrairement à l'effet de la mycorhization, considéré comme validé lorsqu'il était vérifié au moins trois fois sur quatre (2 expérimentations, deux temps de cinétique pour chacune mais assimilés à un seul). L'effet de BioA 187 et de la combinaison (BioA 187+*Fm*) ont été observés à 48Hpt, puis à 72Hpt de façon indépendante, puisque l'application du produit peut impacter différemment l'expression des gènes dans les feuilles à 48Hpt et 72Hpt.

Suite au traitement avec BioA 187, l'induction de divers gènes codant des PR protéines est observée. Ainsi les expressions de *PR4* et de *PR14* sont induites de façon transitoire à 48 Hpt, de 3,5 et 3,3 fois (Exp.1) et de 3,3 et 5,6 fois (Exp.2) chez les feuilles de blé traité au BioA 187 par rapport au témoin, respectivement. Une accumulation des transcrits de *PR1* et *PR5* a été également observée mais de façon plus tardive à 72 Hpt, de 3,1 et 2,7 fois (Exp.1) et de 3,1 et 2,3 fois (Exp.2) par rapport au plantes témoins, respectivement. De façon intéressante 2 des 3 gènes codant des protéines impliquées dans la voie des phénylpropanoïdes sont surexprimés de façon transitoire à 48 Hpt, l'expression de *CHS* est induite de 9.4 et 4.1 fois (Exp.1 et Exp.2) et *FNS* de 2.3 et 2.9 fois (Exp.1 et Exp.2) en comparaison avec leurs témoins non traités respectifs.

Le gène *POX* est surexprimé pour les deux points de cinétique mesurés, soit une induction d'environ 4 et 3.1 fois à 48 Hpt et de 2 fois à 72Hpt au regard des témoins, pour l'Exp.1 et l'Exp.2, respectivement.

Enfin en ce qui concerne l'effet de la combinaison des deux traitements (BioA 187+*Fm*) sur les gènes ciblés, *PR5* et *PR15* sont surexprimés de façon transitoire à 48Hpt, de 2,9 et 2 fois par rapport au témoin pour l'Exp.1 et de 5,3 et 2,5 par rapport au témoin pour l'Exp.2. En parallèle, l'expression du gène *PR4* est induite chez les blés exposés au double traitement après 72Hpt, à raison 2,2 et 6,4 fois par rapport aux témoins des Exp. 1 et 2, respectivement. Enfin des transcrits du gène *PR1* sont accumulés à 48 et 72Hpt, à raison de 2,5 et 3,3 fois pour l'Exp.1 et 3,7 et 5,3 fois pour l'Exp.2.

L'induction de l'expression du gène *CHS* est retrouvée sur les deux points de cinétiques suivis, à savoir une expression de 2 et 3,3 fois supérieure aux témoins respectifs des Exp.1 et 2 à 48Hpt et de 4,1 et 4,3 fois supérieure aux témoins respectifs des Exp.1 et 2 à 72Hpt. Enfin l'expression relative de *FNS* est induite dans les feuilles des blés par le double traitement d'environ deux fois (Exp.1 et Exp.2) en comparaison des témoins respectifs. Le gène codant la *POX* a été induit à 48Hpt ainsi qu'à 72Hpt chez les feuilles de blé traitées au BioA 187+*Fm*. Pour les deux

Résultats et discussions

expérimentations, Exp.1 et Exp.2, une surexpression de la POX a été notée respectivement de 2,1 et 2,8 fois par rapport au témoin à 48Hpt et d'environ 4 et 2,1 fois par rapport au témoin à 72Hpt. En effet, une induction plus précoce (à 48Hpt) des gènes PR1 et PR5 a été observée dans les feuilles de blé (BioA +Fm) avec une induction en plus du PR15 comparée par rapport à l'expression des gènes des feuilles de blé BioA.

Enfin qu'il s'agisse des gènes impliqués dans les renforcements pariétaux (*CalS*) ou dans la voie de signalisation de l'acide salicylique (*WRKY*) aucune induction ni répression n'a pu être obtenue de façon reproductible, pour aucun des traitements réalisés en conditions non-infectieuses (Figure 40).

		A.Exp.1						B.Exp.					
		48Hpt			72Hpt			48Hpt			72Hpt		
		Fm	BioA	BioA+Fm	Fm	BioA	BioA+Fm	Fm	BioA	BioA+Fm	Fm	BioA	BioA+Fm
PATHOGENESIS RELATED PROTEINS	PR1	1,5	0,8	2,5	1,8	3,1	3,3	0,7	1,1	3,7	30,2	2,1	5,3
	PR4	4,7	3,5	0,5	1,1	1,3	2,2	3,0	3,3	1,7	1,7	0,7	6,4
	PR5	0,8	1,5	2,9	1,0	2,7	2,2	1,2	0,5	5,3	25,9	2,3	0,8
	PR8	0,8	1,5	1,1	1,0	1,2	1,7	1,9	1,3	1,4	2,0	1,1	1,8
	PR14	0,6	3,3	0,8	1,9	1,6	2,2	4,0	5,6	1,8	0,7	0,4	1,2
	PR15	1,6	1,3	2,0	2,7	1,2	2,3	1,0	1,4	2,5	1,1	0,8	1,7
PHENYLPROPANOID PATHWAY	PAL	2,0	1,1	1,2	2,5	1,3	0,7	2,5	0,6	0,8	2,0	0,6	0,9
	CHS	2,1	9,4	2,0	0,4	0,6	3,3	13,3	4,1	4,1	0,8	0,4	4,3
	FNS	1,1	2,3	2,3	1,7	0,5	1,5	0,8	2,9	2,1	0,6	1,5	0,5
ANTIOXIDANT SYSTEM	POX	3,2	4,0	2,1	3,0	2,2	4,0	2,0	3,1	2,8	5,8	2,0	2,1
PARIETAL COMPOUNDS	CalS	0,4	0,7	0,7	1,1	0,7	0,7	1,1	1,0	0,7	1,4	1,7	1,8
SALICYLIC ACID SIGNALING	WRKY	2,0	0,7	1,9	1,8	1,9	1,5	0,1	0,2	0,4	1,0	1,9	1,4

Figure 40 : Profil d'expression des gènes marqueurs de défense du blé en réponse aux traitements *Fm*, BioA 187 et BioA 187+*Fm* en conditions non infectieuses. Les résultats ont été exprimés en expression relative par rapport au témoin DMSO respectif pour chaque point de la cinétique. Le suivi de l'expression des gènes a été effectué en cinétique 48Hpt et 72Hpt avec BioA 187.

3.5. b En conditions infectieuses

Les modifications observées dans l'expression des différents gènes ciblés lors de l'infection du blé (plantes témoins, DMSO) par *B. graminis* sont présentées en figure 6A. Ainsi, nous pouvons remarquer que les profils d'expression obtenus suite à l'infection de la plante par *B. graminis* sont relativement similaires entre les deux expériences et révèlent notamment l'induction de l'expression de 5 des 6 gènes codant des protéines PR à 24Hpi. Les inductions d'expression de gènes les plus importantes observées à 24Hpi sont retrouvées pour *PR5* avec une expression

Résultats et discussions

environ 460 et 266 fois supérieure au témoin non-infectée pour les Exp.1 et 2, environ 130 fois supérieure aux témoins pour *PR1* et 28 et 160 fois supérieure aux témoins pour *PR4* (Fig.6A). Une réponse très différente est observée pour les gènes codant des protéines impliquées dans la voie des phénylpropanoïdes avec une répression de l'expression des gènes *CHS* et *FNS* en réponse à l'infection par *B. graminis* (Fig. 6A). Ainsi l'accumulation des transcrits de *CHS* est réduite de 33 et 2,3 fois par rapport aux témoins respectifs (Exp.1 et Exp.2), quand l'accumulation des transcrits de *FNS* est réduite de 6,7 et 4,8 fois par rapport aux témoins respectifs (Exp.1 et Exp.2). L'expression de *POX* est induite en réponse à l'infection d'environ 28 et 175 fois par rapport aux témoins non-infectés des Exp.1 et Exp.2, respectivement. Enfin une légère induction est observée pour l'expression du gène *WRKY*, de 2,25 et 6,2 fois supérieure aux témoins respectifs (Exp.1 et Exp.2).

Afin d'évaluer l'effet des traitements sur la réponse du blé à l'infection par *B. graminis*, l'expression relative des gènes codant des marqueurs des réactions de défense chez le blé a été exprimée par rapport aux plantules témoins traitées au DMSO et infectées par *B. graminis*. Cette comparaison vise à visualiser les différences d'induction des gènes ciblés entre les plantules témoin infectées et les plantules de blé soumises aux différents traitements et infectées.

Dans le cas des plantes inoculées préalablement par le traitement *Fm* seul puis infecté par *B. graminis*, les résultats obtenus indiquent que les profils d'expression des gènes suivis sont relativement similaires à la condition témoin infectée. Seul le gène *PR14* présente une induction de son expression de 3,9 et 2,5 fois supérieures au témoin infecté pour les deux expérimentations (Exp.1 et Exp.2) à 24Hpi (Figure 41.B).

Chez les plantules de blé dont les feuilles ont été pulvérisées avec BioA 187, l'expression relative de 6 gènes sur les 12 suivis semble plus fortement induite en comparaison des plantes témoins infectées. Les gènes *PR4* et *PR14* sont sur-exprimés à hauteur de 3,9 et 2 (Exp.1) et 4,5 et 3 (Exp.2) fois supérieures par rapport aux plantules témoins infectées. Les trois gènes codant des protéines impliquées dans la voie des phénylpropanoïdes : *PAL*, *CHS* et *FNS*, sont sur-exprimés d'au moins 2,7 ; 2 et 2 fois, par rapport au témoin infecté (Fig. 41B), ce qui indique que les gènes *CHS* et *FNS* sont moins réprimés chez les plantules traitées avec BioA187 et infectées que chez les plantes témoins infectées (Figure 41A) L'expression du gène *POX* est induite de 7,3 (Exp.1) et de 4,5 (Exp.2) fois 24Hpi en réponse à BioA 187 par rapport au témoin.

Résultats et discussions

Dans le cas du traitement combinant BioA 187+*Fm*, trois des 6 gènes codant des PR-protéines, *PR8*, *PR14* et *PR15* sont sur-exprimés d'au moins 2 ; 6,2 et 4,0 et de 2,2 ; 2,5 et 3,1 fois par rapport au témoin infecté, pour l'Exp.1 et l'Exp.2 respectivement (Figure 41B). L'expression des gènes *PAL* et *FNS* est induite respectivement de 2,3 et 2,8 fois (Exp.1) et 4,2 et 5,4 fois (Exp.2) par rapport au témoin infecté. Le gène *POX* est sur-exprimé de 4,7 et 3,5 fois respectivement dans les tissus foliaires pour l'Exp.1 et l'Exp.2 ayant reçu le traitement combiné (BioA 187+*Fm*) par rapport aux plantules témoins. En effet, seul le PR8 est induit en plus dans les feuilles de blé BioA 187+*Fm* par rapport aux feuilles de blé infectées et traitées au BioA (Figure 41).

A		Exp.1	Exp.2	B		Exp.1			Exp.2		
		24Hpi	24Hpi			72HpT (24Hpi)			72HpT (24Hpi)		
		T. inf / T non.inf	T. inf/ T non.inf	<i>Fm</i>	BioA	BioA+ <i>Fm</i>	<i>Fm</i>	BioA	BioA+ <i>Fm</i>		
PATHOGENESIS RELATED PROTEINS	PR1	137,5	134,5	0,6	1,4	1,0	0,5	0,7	0,2		
	PR4	27,7	161,4	0,7	3,9	0,9	1,8	4,5	1,4		
	PR5	467,8	266,2	0,6	0,8	0,5	0,6	0,5	0,6		
	PR8	5,4	8,4	0,5	1,1	2,00	1,1	2,1	2,2		
	PR14	0,3	0,7	3,9	2	6,2	2,5	3,0	2,5		
	PR15	2,4	2,7	3,3	1,2	4,0	0,8	0,7	3,1		
PHENYLPROPANOID PATHWAY	PAL	3,8	0,8	0,4	2,7	2,3	1,4	3,7	4,2		
	CHS	0,1	0,4	0,6	2,0	0,5	1,6	2,0	1,8		
	FNS	0,2	0,2	1,1	2	2,8	0,3	3,4	5,4		
ANTIOXIDANT SYSTEM	POX	28,7	175,5	0,7	7,3	4,7	0,4	4,5	3,5		
PARIETAL COMPOUNDS	CalS	1,1	2,3	0,7	1,2	0,8	1,1	0,5	0,9		
SALICYLIC ACID SIGNALING	WRKY	2,2	6,2	1,7	0,8	1,4	1,7	3,7	4,7		

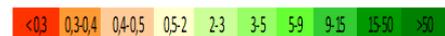


Figure 41 : Profil d'expression des gènes marqueurs de défense du blé en conditions infectieuses. (A) Expression relative des gènes ciblés en réponse à l'infection chez la plante témoin (DMSO). Cette expression est estimée en comparant l'expression des gènes chez le témoin infecté en comparaison du témoin non-infecté. (B) Modulation de l'expression des gènes ciblés chez le blé en réponse à l'infection dépendante des traitements. L'expression relative est estimée en comparant l'expression des gènes chez les plantes infectées et traitées par l'un des trois traitements (*Fm*, BioA et BioA+*Fm*) et le témoin infecté. Le suivi de l'expression des gènes a été effectué 24Hpi (72Hpt foliaire avec BioA 187).

3.6. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur l'activité enzymatique peroxydase

L'activité peroxydase (POX), marqueur enzymatique impliqué dans les réactions de défense du blé, a été évaluée sur les 3^{èmes} feuilles de plantules de blé âgées de 8 semaines, suivant une cinétique (9H, 48H, 60H et 72H) post-traitement par le BioA 187 en présence ou non de l'agent pathogène (12Hpi et 24Hpi).

3.6. a En conditions non infectieuses

Chez les plantules de blé cultivées durant 8 semaines en présence de *Fm*, la POX montre une augmentation significative d'activité allant de 15 à 56 % par rapport à celle du témoin cultivé sans *Fm* pour tous les points de prélèvement (A.Exp.1, B.Exp.2). Suite à la pulvérisation foliaire de BioA 187, l'activité enzymatique POX est supérieure à celle observée chez les témoins non traités à tous les points de la cinétique, autant pour l'Exp.1 que l'Exp.2, avec une augmentation maximale observée de 133% par rapport au témoin à 60Hpt sur l'Exp.1, et de 107% à 72Hpt sur l'Exp.2. En ce qui concerne la combinaison BioA 187+*Fm*, l'activité POX a été induite significativement après traitement pour l'Exp.1 et l'Exp.2, avec une augmentation maximale de 183% par rapport au témoin jusqu'à 60Hpt. L'activité POX est supérieure dans le cas du double traitement BioA+*Fm* par rapport aux traitements appliqués seuls. En revanche, à 72Hpt par BioA, l'activité POX redevient largement inférieure dans le cas du double traitement par rapport aux traitements seuls et aucune différence par rapport au témoin (Figure 42)

3.6. b En conditions infectieuses

L'infection par *B. graminis* induit une augmentation de l'activité POX 12Hpi et 24Hpi (ce qui correspond respectivement à 60Hpt et 72Hpt) par rapport à celle observée chez les plantules non infectées, avec une augmentation de plus de 150% à 24Hpi (A.Exp 1, B.Exp.2). Pour les plantules inoculées par *Fm* 8 semaines plus tôt, aucune variation significative de l'activité POX n'a été observée chez les plantules de blé mycorhizées 12Hpi par rapport au témoin. A 24Hpi, une diminution d'au moins 20% a été notée chez les plantules de blé inoculées par *Fm* et infectées par *B. graminis*, pour les deux expérimentations, par comparaison à celle des témoins non inoculés par *Fm* et infectés. Chez les plantules traitées par le BioA 187, l'activité POX a augmenté à 12Hpi par rapport au témoin infecté (A. Exp1, B.Exp.2). Pour les Plantes BioA infecté l'activité POX est supérieure à celle observé chez les témoins infectées pour les deux points de la cinétique d'autant de 85% (12Hpi) à 60% (24Hpi) (A. Exp1, B.Exp.2). Chez les

Résultats et discussions

plantules de blé traitées par BioA 187+*Fm* et infectées par *B.graminis* la POX a été en effet fortement stimulée et ce de plus de 83% et 60% respectivement à 12Hpi et 24Hpi par rapport au témoin infecté (Figure 42).

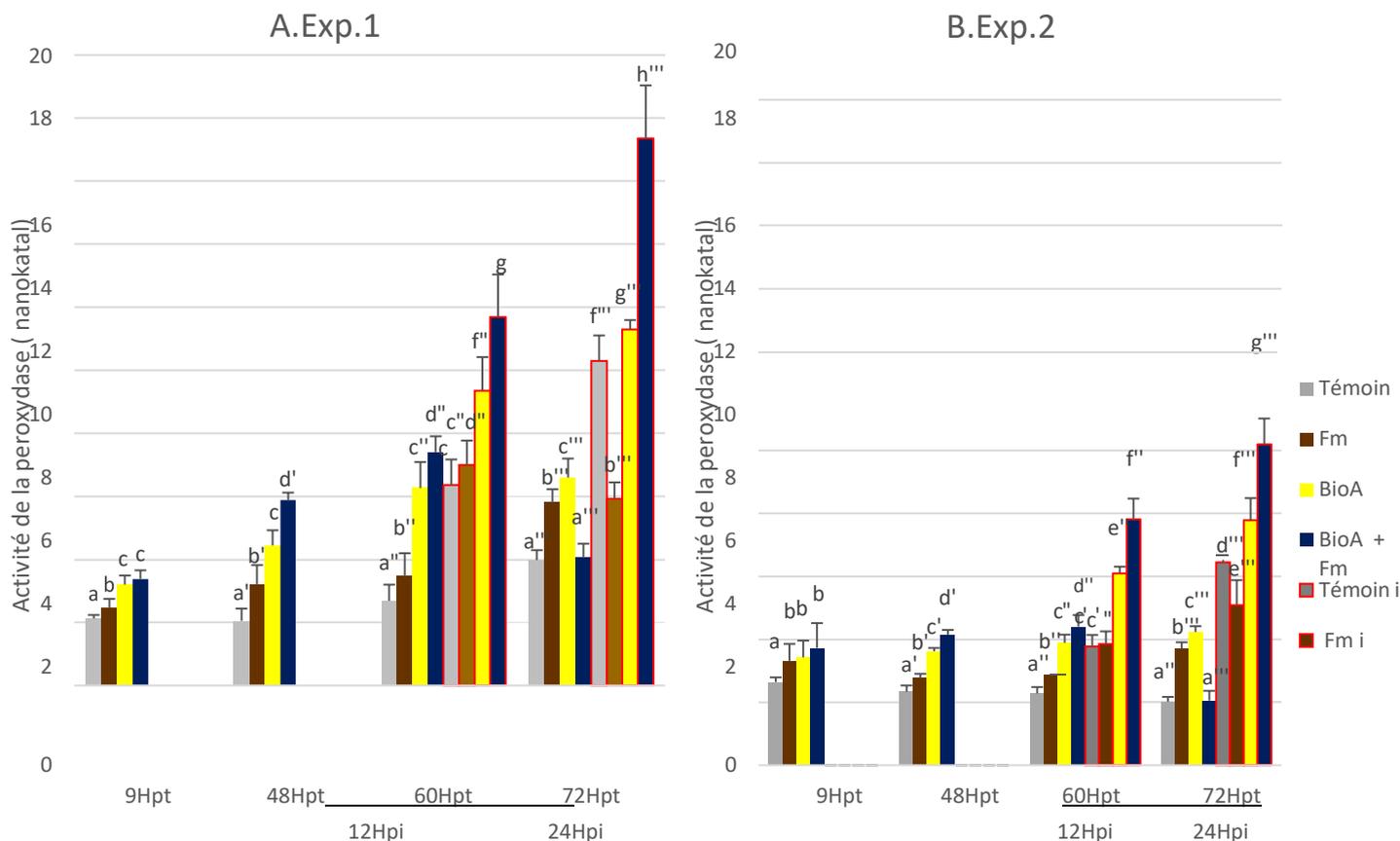


Figure 42 : Evaluation de l'activité peroxydase dans les tissus foliaires des plantules de blé en réponse aux traitements *Fm*, BioA187 et BioA187+*Fm* en présence ou en absence de *B. graminis*. Les histogrammes représentés correspondent au Témoin en gris, à l'inoculation par *Fm* en brun, BioA 187 en jaune et la combinaison BioA 187 + *Fm* en bleu. Les points de cinétique 9H, 48H, 60H et 72H correspondent à 9, 48, 60 et 72 heures post traitement (Hpt) foliaire par BioA 187 ou du DMSO. Les plantules infectées par *B. graminis* (+*B. graminis*, contour des histogrammes en rouge) ont été suivies à 12 et 24Hpi. Les points de cinétique 60H et 72H correspondent à 12Hpi et 24Hpi (post infection +*B. graminis*). Les analyses statistiques (ANOVA, $P \leq 0.05$) ont été réalisées pour chaque point de la cinétique. Les histogrammes avec des lettres et des typographies différentes du témoin indiquent des différences statistiquement significatives par rapport au témoin (DMSO 0.1%). Les résultats présentés correspondent à deux expériences indépendantes réalisées dans le temps Exp1 (A) et Exp2 (B).

3.7. Effet de l'inoculation mycorhizienne, du traitement par le BioA et de leur association sur le profil métabolomique du blé

La caractérisation du métabolome au sein des tissus foliaires (3^{èmes} feuilles des plants de blé âgés de 8 semaines) vise à analyser les modulations du métabolisme en réponse à l'application des différents traitements testés et à l'infection par *B. graminis*. Dans le cadre d'une étude globale des métabolites extraits et analysés, l'analyse partielle des moindres carrés-discriminants (PLSDA) de l'ensemble des données a été réalisée afin de visualiser les « poids » de différents facteurs, à savoir l'effet des traitements (*Fm*, BioA 187, BioA+*Fm*) (Fig 8A), l'effet de la cinétique d'infection (12 et 24Hpi, Fig 8B), l'effet de l'infection avec *B. graminis* (Fig 8C), ainsi que l'effet batch (Exp1 et Exp2, Fig 8D). En ce qui concerne l'effet des traitements, de l'infection avec l'agent pathogène *B. graminis* et de la cinétique post infection, les résultats présentés ci-dessous (Figure 8A, B, C) n'ont pas permis mettre en évidence des profils de métabolites caractéristiques de ces facteurs/traitements. En revanche, des différences sont observables entre les deux expériences indépendantes avec une variation totale de 24% (Exp.1/batch 1 et Exp.2/batch 2) (Fig. 8D), suggérant un effet lié à la reproductibilité de l'expérimentation. Ainsi, pour la suite de l'analyse des données métabolomiques, une correction des batchs a été effectuée afin de pouvoir analyser ensemble les données des deux expériences indépendantes (Exp.1 et Exp.2), et de réaliser une étude ciblée pour quantifier certains métabolites dans les feuilles des plantules de blé soumises aux différentes conditions (traitements *Fm*, BioA 187, BioA+*Fm* et infection par *B. graminis*).

Résultats et discussions

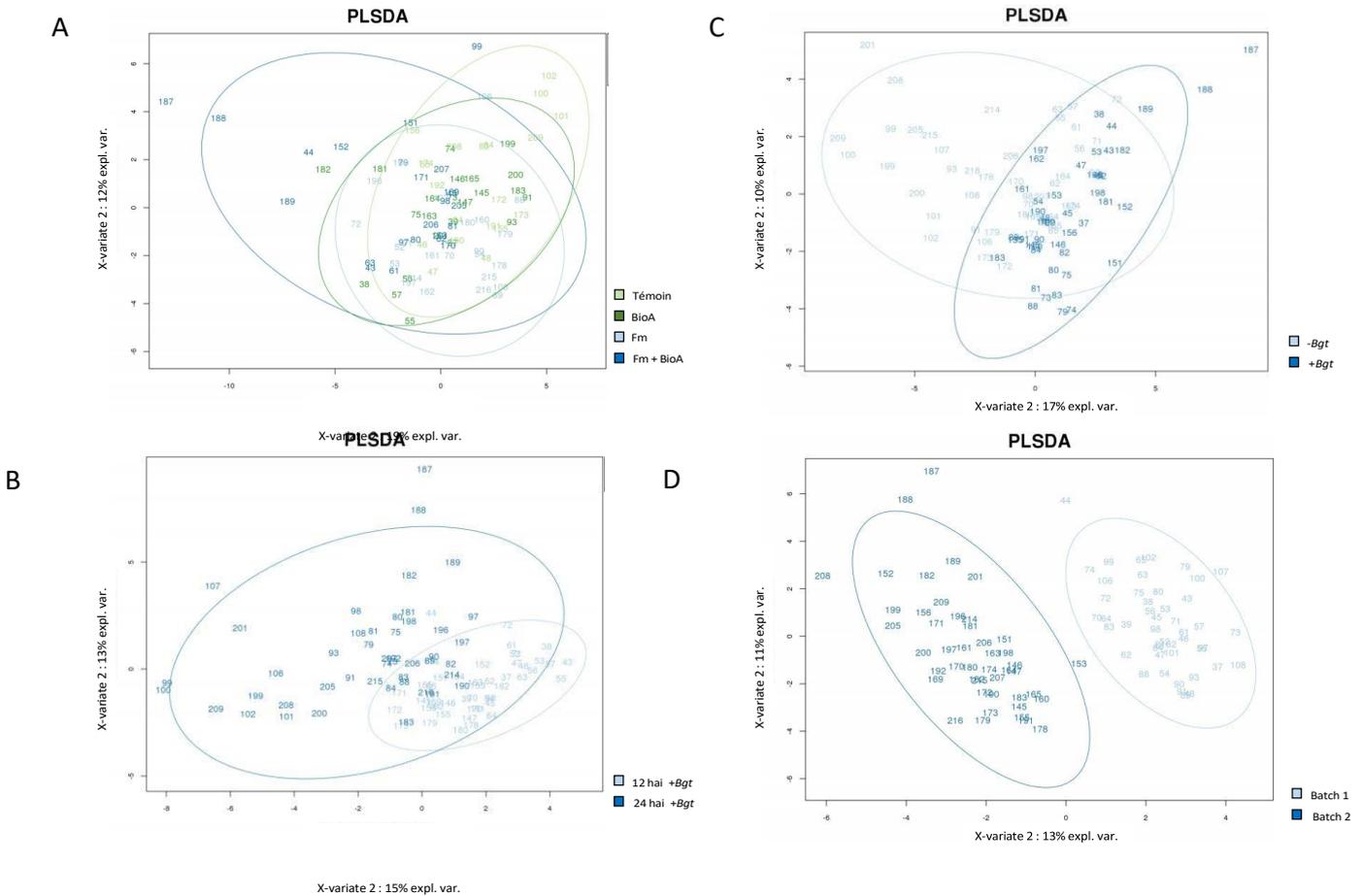


Figure 43 : Analyse partielle des moindres carrés-discriminants (PLSDA). Graphique des scores PLSDA validés par recoupement pour la comparaison des profils globaux des métabolites selon :

- (A) L'effet des traitements : témoin en vert clair, traité par BioA187 en vert foncé, inoculé avec *Fm* en bleu clair et BioA187 + *Fm* en bleu foncé, que les plantules aient été infectées ou non par *B. graminis*. Chaque numéro coloré représente un échantillon, variable 1 (12%) variable 2 (19%) dans l'analyse PLSDA.
- (B) L'effet de l'infection avec *B. graminis* : 48 échantillons prélevés non infectés par *B. graminis* (-*B. graminis*) quel que soit le traitement reçu (rien, BioA 187, *Fm* ou BioA187 + *Fm*) en bleu clair et 48 échantillons infectés par *B. graminis* (+*B. graminis*) quel que soit le traitement reçu (Témoin, BioA 187, *Fm* ou BioA187 + *Fm*) en bleu foncé. Chaque numéro coloré représente un échantillon, variable 1 (17%) variable 2 (10%) dans l'analyse PLSDA.
- (C) L'effet de la cinétique d'infection avec *B. graminis* : 48 échantillons prélevés 12 heures post infection par *B. graminis* (12 Hpi) quel que soit le traitement reçu (Témoin, BioA 187, *Fm* ou BioA 187+*Fm*) en bleu clair et 48 échantillons prélevés 24 heures post infection par *B. graminis* (24 Hpi) quel que soit le traitement reçu (Témoin, BioA, *Fm* ou BioA187 + *Fm*) en bleu foncé. Chaque numéro coloré représente un échantillon, variable 1 (15%) variable 2 (13%) dans l'analyse PLSDA.
- (D) L'effet des expériences : 48 échantillons prélevés provenant de la première expérience indépendante (batch 1 en bleu clair) quels que soient les traitements reçus ou le statut infectieux et 48 échantillons provenant de la deuxième expérience indépendante (batch 2, bleu foncé) quels que soient les traitements reçus ou le statut infectieux. Chaque numéro coloré représente un échantillon, variable 1 (13%) variable

2 (11%) dans l'analyse PLS-DA. Résultats et discussions

Résultats et discussions

Les profils d'accumulation de ces métabolites dans les feuilles de blé inoculé avec *Fm* et /ou traité avec BioA 187 en conditions non infectées (*-B.graminis*) ou infectées (*+B.graminis* à 12Hpi, 24Hpi) ont été comparés par rapport au témoin 12Hpi (DMSO) non infecté. Parmi les 53 métabolites étudiés et regroupés en 5 catégories différentes (les Acides Aminés, Benzoxazinoïdes, Flavonoïdes, Hormones, Amides de l'acide hydroxycinnamique) environ 11 métabolites appartenant à la catégorie des amides de l'acide hydroxycinnamique (HCAAA) semblent présenter des modulations de leurs accumulations, en particulier en réponse à l'infection par *B.graminis*. L'identification des isomères *trans* et *cis* de ces métabolites n'a pas pu être réalisée pour des raisons techniques. En effet, il n'existe pas de standard de ces composés permettant de distinguer, de façon certaine, les deux isomères entre eux, d'où l'appellation donnée d'une molécule suivie des chiffres 1 ou 2. Ainsi, ces différents métabolites ont été identifiés comme étant la coumaroylagmatine (1&2), la coumaryolputrescine, la caffeoylagmatine (1&2), la caffeoylputrescine, la feruloylagmatine (1&2), l'hydroxyferuloylagmatine, l'hydroxyferuloyputrescine, et la sinapoylagmatine 1. Ces métabolites semblent s'accumuler principalement chez les feuilles de blé infecté par *B.graminis*, 24 heures après infection (Figure 44).

Afin d'observer si un différentiel d'accumulation de ces métabolites particuliers dans les tissus foliaires de blé infectés soumis aux différents prétraitements (*Fm*, BioA 187, *BioA+Fm* 187) pouvait être observé, les données concernant ces métabolites ont été extraites, analysées et présentées sous forme d'histogrammes (Figure 45, 46, 47)

Résultats et discussions

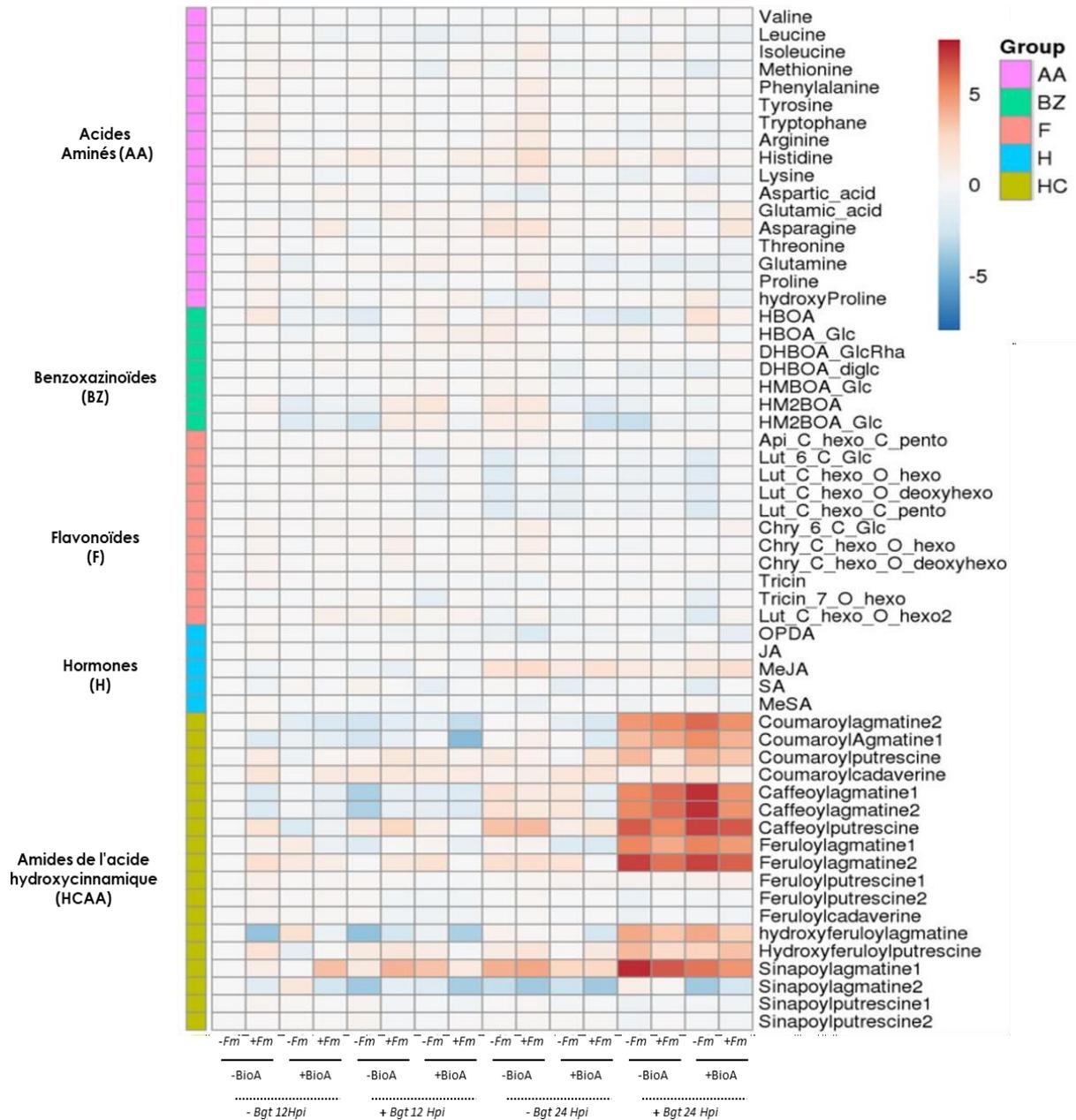


Figure 44 : Profil des modifications d'accumulation des métabolites foliaires chez des plantules de blé préalablement soumis à une inoculation avec *Fm* ou/ et à un traitement foliaire avec BioA (BioA 187) puis infecté ou non par *B. graminis*. Les plantules de blé ont été soumises aux différents traitements appliqués : non mycorhizée (-*Fm*) ou mycorhizées avec *Fm* (+*Fm*), témoins traitées au DMSO (-BioA) ou traitées avec BioA 187 (+BioA), infectées avec *Blumeria graminis* (+*B.graminis*) ou non (-*B.graminis*) à deux points cinétiques (12Hpi et 24Hpi). Les différentiels en Log2 de concentration en métabolites par rapport au témoin traité au DMSO, non inoculé (-*B.graminis*) sont donnés par des nuances de couleurs rouges ou bleues selon l'échelle. Les métabolites ont été regroupés selon leur famille chimique : acides aminés (AA), benzoxazinoïdes (BZ), flavonoïdes (F), hormones (H) et amides de l'acide hydroxycinnamique (HCAA). Les données représentent les valeurs moyennes de 6 répliques biologiques pour chaque modalité et point de cinétique.

Résultats et discussions

Ainsi, 7 des 11 métabolites ciblés ont été suivis en détail sur les deux points de cinétique, 12 et 24 Hpi, pour chaque expérience indépendante (Exp.1 et Exp.2) et présentés dans les figures. 45, 46, 47. Pour chaque métabolite ciblé, deux comparaisons ont été effectuées : (i) une comparaison a été réalisée pour chaque traitement et pour chaque point de cinétique entre la condition infectée et la condition non infectée (+*B.graminis* vs -*B.graminis*) afin d'évaluer l'effet de l'infection, et (ii) une comparaison des 4 traitements entre eux a été réalisée en condition non-infectée puis en condition infectée, pour chaque point de cinétique, afin d'évaluer l'effet du traitement.

En conditions non infectieuses (-*B.graminis*), aucune accumulation significative de ces métabolites n'a pu être observée chez les plantules soumises aux trois différents traitements testés (BioA 187, *Fm*, BioA +*Fm*) par comparaison au témoin.

En conditions infectieuses (+*B.graminis*), aucune modulation n'a été observée pour aucun des métabolites étudiés à 12 Hpi, et ceci quelles que soient les conditions testées. En revanche, des différences dans l'accumulation de certains de ces composés ont été observées 24 heures après infection (24 Hpi).

Les métabolites identifiés comme des dérivés caffeoyle, à savoir les deux isomères Caffeoyleagmatine1 (CafAgm1) et Caffeoyleagmatine2 (CafAgm2), et la Caffeoyleputrescine (CafPut) ont présenté des profils d'accumulation semblables (Figure 45A, B et C).

A 24Hpi, l'effet de l'infection (+*B.graminis*) se manifeste par une accumulation de CafAgm1 (Fig 9A) et CafAgm2 (Fig 45B) dans les feuilles de blés témoins et pré-traités (BioA187, *Fm* et BioA +*Fm*). Cette accumulation est notamment significative dans les tissus foliaires des plantes traitées par BioA 187, 50 fois et 110 fois en comparaison avec les conditions respectives non-infectés (-*B.graminis*) pour l'Exp.1 et l'Exp.2, respectivement (Fig 45A,B). Enfin le comparatif par point de cinétique a permis d'observer une accumulation significative des deux isomères plus importantes chez les plantules pré-traités au BioA 187 puis infectées par *B.graminis* à 24Hpi que chez les plantes témoin infecté pour les deux expériences, d'environ 5.9 et 1.7 fois pour l'Exp.1 et Exp.2, respectivement. L'analyse des teneurs des tissus foliaires en CafPut (Fig 45C) a révélé une augmentation en réponse à l'infection par *B.graminis* à 24Hpi, qui est significative pour les plantules témoins (16 et 12 fois) et celles pré-traités avec BioA 187 (61 et 80 fois) au sein des deux expériences indépendantes, respectivement. En revanche, les différents traitements (*Fm*, BioA et BioA +*Fm*) n'ont aucun effet sur l'accumulation de ce métabolite.

Résultats et discussions

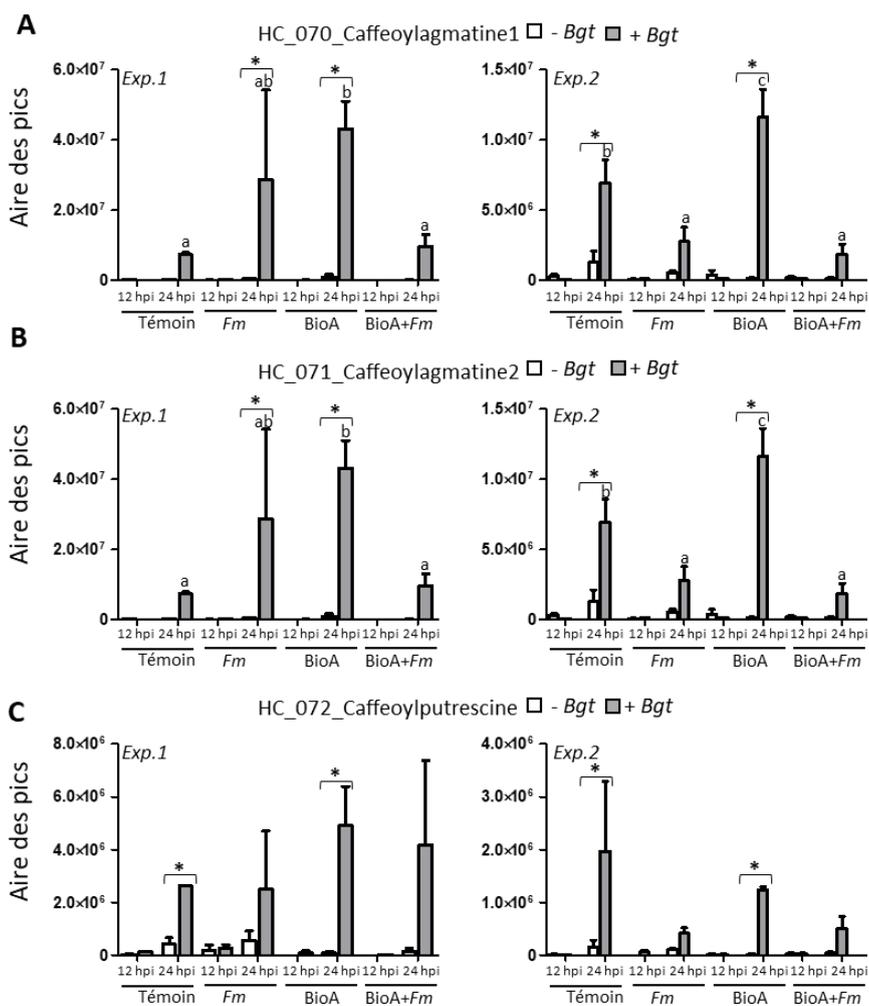


Figure 45 : Effets des traitements (*Fm*, BioA 187 et BioA187+*Fm*) sur la teneur totale des dérivés Caffeoylagmatine1 (A), Caffeoylagmatine2 (B) et Caffeoylputrescine (C) dans les tissus foliaires en absence (*-B.graminis*) ou en présence de *B. graminis* (*+B.graminis*). Les feuilles ont été collectées et analysées à 12 et 24 heures après infection (Hpi) avec *B.graminis* (5.10^5 spores/ml). Les données correspondent aux moyennes des valeurs obtenues pour trois échantillons par condition, pour chacune des deux expériences indépendantes. Une première comparaison vise à évaluer l'effet de l'infection (*+B.graminis* vs *-B.graminis*) pour chacun des traitements, pour chaque point de cinétique ; ainsi les astérisques (*) représentent une différence significative entre les conditions *+ B.graminis* et *- B.graminis* pour chaque traitement (ANOVA, test post-hoc multiple de Bonferroni's, $P \leq 0.05$). La seconde comparaison vise à évaluer l'effet des traitements en condition infectieuse ou en condition non infectieuse ; ainsi les valeurs représentées par les histogrammes présentant des lettres différentes sont significativement différentes (ANOVA, test post-hoc multiple de Bonferroni's, $P \leq 0.05$).

En réponse à l'infection par *B.graminis*, une augmentation significative reproductible des teneurs en HydFerAgm a été observée chez les feuilles de blé infecté pré-traité par BioA (8 fois et 66 fois) en comparaison avec les témoins respectifs non infectés par *B.graminis* à 24 Hpi (Figure. 46A).

Résultats et discussions

Le comparatif entre les différents traitements n'a pas démontré une augmentation significative plus importante de l'HydFerAgm chez les feuilles de blé pré-traitées par Fm, BioA ou BioA+Fm en comparaison avec la condition témoin, au regard de ce qui avait été observé pour les dérivés de Caffeoyle en conditions infectieuses (Figure 46).

Enfin, les teneurs de l'HydFerPut ne semblent pas être modulées de façon importante en réponse à l'infection, les différences observées n'étant pas reproductibles d'une expérience à l'autre. De même, aucune différence significative dans l'accumulation de ce métabolite n'a été mise en évidence en réponse aux différents traitements dans les deux expérimentations (Figure 46.B).

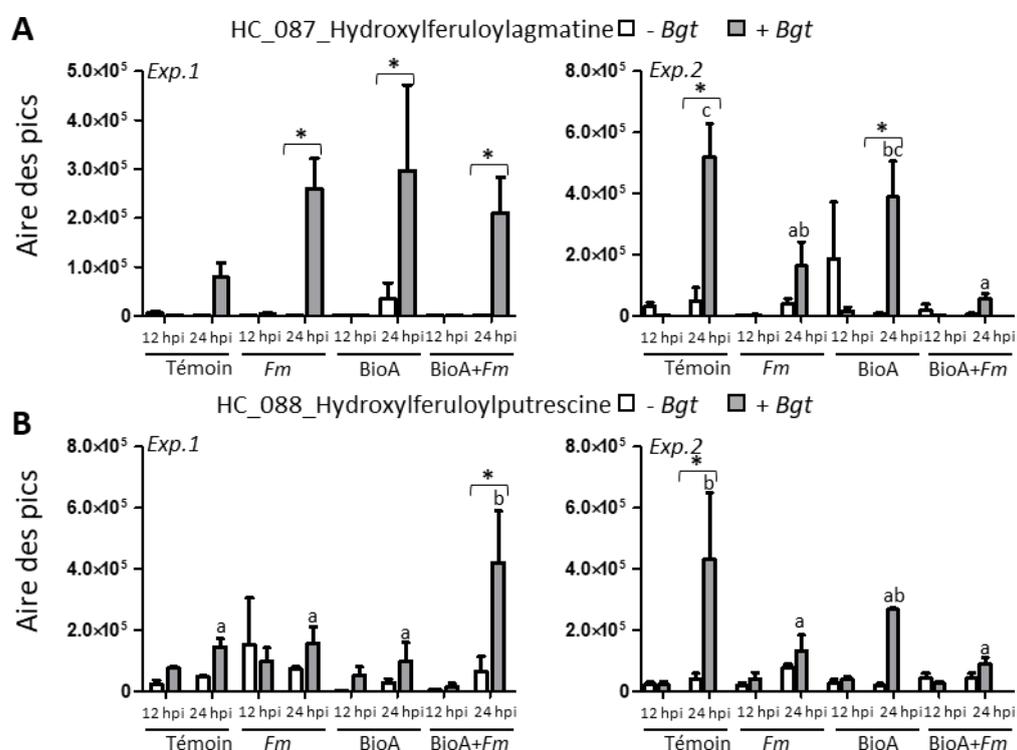


Figure 46 : Effets des traitements (*Fm*, BioA 187 et BioA187+*Fm*) sur la teneur totale des dérivés Hydroxylferuloylalgmatine (A) et Hydroxylferuloylputrescine (B) dans les tissus foliaires en absence (*-B.graminis*) ou en présence de *B. graminis* (*+B.graminis*). Les feuilles ont été collectées et analysées à 12 et 24 heures après infection (Hpi) avec *B.graminis* (5.10^5 spores/ml). Les données correspondent aux moyennes des valeurs obtenues pour trois échantillons par condition, pour chacune des deux expériences indépendantes. Une première comparaison vise à évaluer l'effet de l'infection (*+B.graminis* vs *-B.graminis*) pour chacun des traitements, pour chaque point de cinétique ; ainsi les astérisques (*) représentent une différence significative entre les conditions *+ B.graminis* et *- B.graminis* pour chaque traitement (ANOVA, test post-hoc multiple de Bonferroni's, $P \leq 0.05$). La seconde comparaison vise à évaluer l'effet des traitements en condition infectieuse ou en condition non infectieuse ; ainsi les valeurs représentées par les histogrammes présentant des lettres différentes sont significativement différentes (ANOVA, test post-hoc multiple de Bonferroni's, $P \leq 0.05$).

Résultats et discussions

Concernant les deux isomères Coumaroylagmatine (CouAgmt) 1 et 2, leurs teneurs ont généralement augmenté en réponse à l'infection à 24Hpi dans les feuilles de blé quel que soit le traitement, mais l'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative pour CouAgmt 1 pour l'Exp2 (Figure 47 A). Les données concernant la CouAgmt 2 montrent que ce composé s'est accumulé de façon significative, pour les deux expérimentations, dans les feuilles infectées des plantules traitées par BioA et BioA+*Fm* 32 et 100 fois, respectivement pour l'Exp1, 104 et 100 fois respectivement pour l'Exp2,) au regard de leurs contrôles non- infectés respectifs (Figure 47 B).

Les trois traitements testés (BioA 187, *Fm*, BioA 187+*Fm*) n'ont pas modifié l'accumulation de CouAgmt1 dans les tissus foliaires des plantules de blé infecté (24 Hpi) par rapport à leurs témoins respectifs (Exp.1 et Exp.2). Pour CouAgmt2, l'augmentation significative des teneurs en CouAgmt2 de 2,3 fois par rapport au témoin à 24Hpi observée dans l'Exp2 n'est pas retrouvée dans l'Exp1 (Figure 47B).

Résultats et discussions

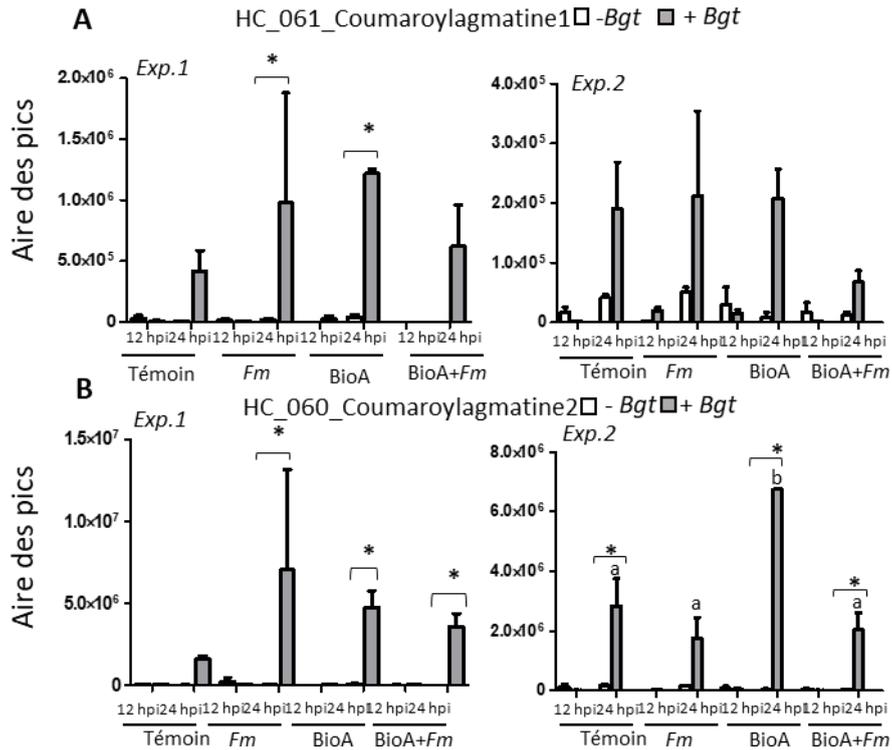


Figure 47 : Effets des traitements (*Fm*, BioA 187 et BioA187+*Fm*) sur la teneur totale des dérivés Coumaroylagmatine 1 (A) et Coumaroylagmatine 2 (B) dans les tissus foliaires en absence (*-B.graminis*) ou en présence de *B. graminis* (*+B.graminis*). Les feuilles ont été collectées et analysées à 12 et 24 heures après infection (Hpi) avec *B.graminis* (5.10^5 spores/ml). Les données correspondent aux moyennes des valeurs obtenues pour trois échantillons par condition, pour chacune des deux expériences indépendantes. Une première comparaison vise à évaluer l'effet de l'infection (*+B.graminis* vs *-B.graminis*) pour chacun des traitements, pour chaque point de cinétique ; ainsi les astérisques (*) représentent une différence significative entre les conditions *+ B.graminis* et *- B.graminis* pour chaque traitement (ANOVA, test post-hoc multiple de Bonferroni's, $P \leq 0.05$). La seconde comparaison vise à évaluer l'effet des traitements en condition infectieuse ou en condition non infectieuse ; ainsi les valeurs représentées par les histogrammes présentant des lettres différentes sont significativement différentes (ANOVA, test post-hoc multiple de Bonferroni's, $P \leq 0.05$).

4. Discussion

Pour lutter contre l'oïdium du blé, plusieurs outils potentiels de biocontrôle, à savoir (i) des inoculum fongiques racinaires à base de CMA, (ii) des SDP à base de chitosan et des chito-oligosaccharides ont été étudiés. Jusqu'à maintenant, ces deux moyens alternatifs de lutte contre *B.graminis* n'avaient été testés que séparément et ont montré des effets protecteurs partiels (Mustafa et al.,2016, 2017 ; Ors et al., 2013). Les deux traitements sélectionnés pour leur aptitude à protéger le blé en traitement individuel, 33% de protection en réponse à l'application de *Fm* et 42% suite à la pulvérisation foliaire du BioA 187, ont été associés afin d'observer si leur efficacité à protéger le blé contre l'oïdium pouvait être optimisée. Le traitement (*BioA+Fm*) associant à la fois l'inoculation mycorhizienne du blé par *Fm* et la pulvérisation du chito-oligosaccharide BioA a également permis de protéger le blé, mais avec une réduction des symptômes de la maladie plus importante pour ce mélange atteignant 72 % de protection, suggérant un effet partiellement additif entre les deux applications.

Mécanismes impliqués dans la protection du blé contre l'oïdium suite à l'inoculation mycorhizienne avec *Fm*

Divers travaux ont décrit la capacité des CMA à protéger les plantes contre des agents pathogènes responsables de maladies racinaires mais aussi foliaires (Castellanos-Morales et al., 2012 ; Comby et al., 2018 ; Miozzi et al., 2019). Ainsi, il a été montré que l'inoculation des plantes par un CMA entraîne une réduction de l'incidence des maladies causées par divers champignons pathogènes foliaires, qu'ils soient nécrotrophes (Fritz et al. 2006, De la Noval et al., 2007, Fiorilli et al. 2011, Song et al. 2015) hémibiotrophes (Allario et al., 2020) ou même biotrophes (Wang et al., 2017 ; Mustapha et al. 2016). Dans notre étude, une protection partielle est obtenue chez un cultivar sensible (cv. Alixan) à l'oïdium suite à une inoculation des racines par le CMA *Fm*. Les travaux de Mustafa et al. (2016) ont montré l'efficacité de cette espèce fongique à protéger le blé contre l'oïdium chez deux autres cultivars de sensibilités différentes (cv. Orvantis, Lord). Ces auteurs ont suggéré que cette protection résulterait de l'induction d'une résistance systémique, appelée MIR pour Mycorrhiza-induced resistance (Pozo et Azcón-Aguilar, 2007, Cameron et al., 2013, Jung et al., 2012). Les réactions de défenses induites lors de cette MIR au niveau des tissus foliaires conduiraient à l'altération du processus infectieux de *B. graminis* suite à l'accumulation de composés phénoliques et de H₂O₂ dans les cellules

Résultats et discussions

épidermiques des feuilles de blé mycorhizé, au niveau du site de pénétration de l'agent pathogène (Mustafa et al., 2016 ; 2017).

Dans cette étude, nous avons pu observer une induction de l'expression de deux gènes marqueurs de défense, *PAL* et *POX*, dans les tissus foliaires des plantules de blé mycorhizées, et ce hors contexte infectieux. Ces résultats viennent confirmer l'influence de l'inoculation mycorhizienne sur la modulation de l'expression de gènes de défense dans les feuilles, en amont d'une infection par un pathogène (Liu et al., 2007 ; Gallou et al., 2011 ; Campos-Soriano et al., 2012 ; Mustapha et al., 2017 ; Fiorilli et al., 2018). L'effet de l'inoculation mycorhizienne a été non seulement observé au niveau de l'accumulation de transcrits mais également au niveau de l'activité peroxydasique, qui est amplifiée dans les tissus foliaires des blés mycorhizés par comparaison aux témoins. En revanche, en conditions infectieuses, peu de variation dans l'expression des gènes de défense ciblés ont été observés chez les plantes mycorhizées par comparaison aux plantules témoin non mycorhizées. Ces résultats suggèrent que l'effet protecteur mis en évidence par la réduction des symptômes de la maladie pourrait être attribué à une activation des systèmes de défense en amont de l'infection et donc de type élicitation, affectant la capacité de l'agent pathogène à coloniser les tissus foliaires dont les défenses ont été induites. Les plantes mycorhizées exprimeraient donc de façon constitutive au niveau foliaire certains gènes impliqués dans les réactions de défense. Ors et al. (2017) ont par ailleurs montré que des cultivars de blé plus résistants naturellement à l'oïdium exprimaient également de façon constitutive et plus fortement des gènes connus pour leur implication dans les mécanismes de défense.

Sur cette base, les marqueurs suivis dans cette étude ont été sélectionnés pour leur implication dans différentes voies typiques de défense chez le blé (protéines PR, voie des phénylpropanoïdes, stress antioxydant, composés pariétaux, voie de signalisation du SA). Toutefois, le nombre de gènes étudiés étant limité, il n'est pas impossible que d'autres gènes de défense puissent être induits en réponse à l'infection de *B.graminis* chez les plantesmycorhizées ;une étude transcriptomique permettrait d'élargir le panel de gènes et de voies dedéfense étudiés et de caractériser les modes d'action (élicitation et/ou potentialisation) impliqués.

Par ailleurs, l'accumulation des transcrits de la *PAL* dans les feuilles des plantules de blé mycorhizés pourrait indiquer une stimulation rapide de l'activité enzymatique de la *PAL* dans les étapes très précoces de l'infection par *B.graminis*. En effet, la voie de la *PAL* dépendante de l'AS est connue pour conduire à la biosynthèse de composés antimicrobiens, contribuant à

une augmentation de la résistance des plantes mais aussi à la formation de précurseurs important pour la lignification des parois végétales (Pellegrini et al., 1994 ; Polle et al., 1994). De plus, l'inoculation avec *Fm* a été associée à induction de l'activité peroxydase et à la surexpression du gène codant la POX, appartenant à la famille des PR9, dans les feuilles de blé mycorhizées non infectées, résultats confirmés par Mustafa et ses collègues (2017). En effet, la POX participe à la lignification de la paroi au site de pénétration de l'agent pathogène, via l'oxydation des phénols en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Passardi et al., 2005; Almagro et al., 2009), ce qui permet de ralentir la colonisation des tissus de la plante par l'agent pathogène. L'ensemble de nos résultats suggèrent une élévation des défenses dans les feuilles des plants de blé mycorhizés, rappelant ainsi la SAR. Cameron et al (2013) ont suggéré que la MIR partagerait des caractéristiques communes avec la SAR, une résistance systémique déclenchée en réponse à l'infection locale par un agent pathogène, mais également avec l'ISR induite suite à la colonisation des tissus racinaires par des rhizobactéries. Les voies de défense mises en place lors de la MIR seraient dépendantes de l'AS et de l'AJ (Pozo & Azcon-aguilar, 2007 ; Cameron et al., 2014). Dans le cadre de notre étude, l'expression du gène *WRKY*, impliqué dans la voie de signalisation de l'AS, est induite en réponse à l'infection du blé par *B. graminis*, mais ne présente aucune modulation en réponse à l'inoculation mycorhizienne que ce soit en conditions infectieuses ou non infectieuses. Chez une autre céréale, l'orge, l'induction de la MIR en réponse à l'inoculation par une souche de *Fm* permet la réduction du développement de l'agent pathogène *Gaeumannomyces graminis*, semble être indépendante de l'AS (Khaouad et al., 2007).

Mécanismes impliqués dans la protection du blé contre l'oïdium suite au traitement avec le BioA

Diverses études ont mis en évidence la capacité des traitements à base de chitosan et les d'oligosaccharides de chitine (chito-oligosaccharides COS, à courte chaîne de chitine) à protéger les plantes contre diverses maladies (Xing et al., 2015, Ors et al., 2017). Une fois appliqué sur la plante, le chitosan ou COS, agirait comme un PAMP, qui serait reconnu via des récepteurs de la chitine de forme PRR (Iriti et Faoro, 2009), induisant une réponse immunitaire de base, qualifiée de PTI chez les plantes (Shinya *et al.*, 2015). De ce fait, de nombreux travaux ont montré que l'application de ces composés a réduit l'incidence de maladies fongiques sur différents pathosystèmes tels que *Erysiphe cichoracearum* et *Colletotrichum sp.* sur concombre *F. graminearum* sur blé, *Sclerospora graminicola* sur le millet (Bhaskara Reddy et al., 1999 ; Sharathchandra et al., 2004, Dodgson et Dodgson ., 2017 Manjunatha et al., 2008, Jogaiah et

al., 2020), au travers de l'induction d'une résistance chez ces cultures. La résistance induite chez les plantes par le chitosan est généralement associée à l'induction de divers mécanismes de défense de la plante, tels que l'activation d'enzymes hydrolytiques, chitinases et β -1,3 glucanases, agissant directement sur les parois cellulaires de l'agent pathogène (Wan *et al.*, 2008 ; Hemantaranjan *et al.*, 2014, Jia *et al.*, 2018), la fermeture des stomates, la production de H_2O_2 , l'accumulation des phytoalexines, la synthèse de callose et la lignification des parois cellulaires (Kauss *et al.*, 1989 ; Kores *et al.*, 2011 ; Vander *et al.*, 1998)

Dans notre étude, l'effet du BioA 187 appliqué en traitement foliaire a permis de réduire l'expression des symptômes de l'oïdium *via* l'induction de réactions de défenses chez le blé. Ainsi, plusieurs gènes codant des protéines PR sont surexprimés dans les feuilles de blés 48 à 72 heures après l'application de BioA 187, hors contexte infectieux. Ces protéines PR ont majoritairement une activité directe sur l'agent pathogène et sont décrites comme antifongiques ou plus largement antimicrobiennes. Ainsi, une surexpression des gènes PR4 (hevein-like) et *PR14* (lipid transfer protein) a été détectée dans les feuilles de blé à 48Hpt en absence de *B. graminis*. La PR4, présentant, entre autres, une activité chitinase (Neuhaus *et al.*, 1996 ; Brunner *et al.*, 1998), s'est avérée avoir un effet antifongique chez le blé contre *F. culmorum* et *F. graminearum* (Bertini *et al.*, 2009, Caruso *et al.*, 2001, 1993). Récemment, il a été démontré que la surexpression du gène *PR4* chez la vigne conduit à une résistance accrue contre l'oïdium (Dai *et al.*, 2016). La surexpression des gènes *PR14* est liée à une résistance accrue dans les plants de riz contre différents agents pathogènes fongiques (Patkar and Chattoo, 2006). Deux autres gènes, *PR1* et *PR5* (de type thaumatine) sont sur-exprimés dans les feuilles de blé traitées et non infectées à 72Hpt. *PR1* est responsable de l'amplification du signal de défense et est dotée d'une activité antimicrobienne suite à la reconnaissance des effecteurs (Sudisha *et al.*, 2012 ; Breen *et al.*, 2017). Xing *et al.*, (2016) ont rapporté que le traitement au chitosan est susceptible de déclencher une cascade de réactions de défense et notamment une régulation de l'expression des gènes de diverses protéines PR, dont *PR1* mais aussi de β -1,3-glucanase (*PR2*) et de chitinase. La *PR5* est souvent décrite pour ses propriétés antifongiques (Enoki and Suzuki 2016). D'une façon générale, les *PR1* et *PR5* sont principalement utilisées comme des marqueurs de la SAR dépendante de l'AS chez les cultures de riz, d'*A. thaliana* et de tomate (Mitsuhara *et al.* 2008, Molinari *et al.*, 2014, Breen *et al.*, 2017). De plus, une étude réalisée sur le tabac a démontré que le prétraitement avec un COS a induit l'expression du gène *PR1*, menant à une SAR (Jia *et al.*, 2016).

De plus, l'expression de gènes liés à la voie des phénylpropanoïdes, à savoir ceux codant une chalcone synthase (*CHS*) et une flavone synthase (*FNS*) a été induite à 48Hpt dans les feuilles de blés traités en conditions non infectieuses. La voie de biosynthèse flavonoid/isoflavonoid, liée à la voie des phénylpropanoïdes, est contrôlée par l'enzyme clé *CHS*. La *CHS* induit par la suite l'accumulation des phytoalexines de types flavonoides et isoflavonoides (Awasthi et al., 2016), et interagit avec la voie de défense de l'AS (Dixon et Paiva 1995 ; Glässgen et al. 1998 ; Ito et al. 1997). La *FNS* est une autre enzyme clé qui participe à la biosynthèse des phytoalexines avec des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, ce qui permet en effet de maintenir un état redox dans les cellules et d'empêcher le développement des agents pathogènes (Du et al., 2010). Dans notre étude, la voie des phénylpropanoïdes (impliquant la *FNS* et la *CHS*) est activée à 48Hpt, ce qui suggère que la résistance pourrait être liée à une accumulation de phytoalexines. Cependant, le gène suivi codant une *PAL* n'a pas été induit dans les feuilles des plantules traitées par BioA 187, ni à 48Hpt ni à 72Hpt. Ce gène code une protéine pourtant considéré comme une enzyme clef de la voie des phénylpropanoïdes (Nandeeshkumar et al., 2008, Chen et al., 2009). De la même façon, Ors et al. (2013) ont montré que le prétraitement du cultivar du blé Alixan avec un SDP FSOV10 à base de chitosan a permis une protection de 70% contre la septoriose sans induire l'expression du gène *PAL* à 48Hpt et 72Hpt. De plus, le traitement au BioA a induit l'expression de la *POX* à 48Hpt et à 72Hpt. Nos résultats ont démontré que l'expression du gène *POX* et l'activité enzymatique de la *POX* ont été stimulées en absence de l'agent pathogène, dans les feuilles de blé prétraité avec BioA suggérant ainsi un effet éliciteur du produit.

Nos résultats montrent clairement qu'en réponse à l'infection par *B.graminis*, la plante pré-traitée au BioA 187 semble réagir plus fortement en sur-exprimant deux gènes codant des PR à activité antimicrobienne, tels que *PR4* et *PR14*. De même, l'accumulation des transcrits des gènes *PAL* et *POX* et l'activité peroxidasique en réponse à l'attaque par *B.graminis* sont plus importantes chez les plantes pré-traitées que les plantes témoin. L'accumulation des transcrits codant la *CHS* et la *FNS*, clairement réprimés en réponse à l'infection par *B.graminis*, semble légèrement moins impacté chez les plantes pré-traités par le Bio A 187. L'ensemble de ces résultats suggèrent l'importance de la voie des phénylpropanoïdes dans la mise en place de mécanismes de défense efficaces à protéger le blé contre l'oïdium et notamment l'importance de la biosynthèse de la lignine visant à limiter la pénétration du champignon lors des premières étapes de l'infection.

De façon similaire, Orzali et al., 2014 ont décrit l'effet protecteur du chitosan sur le blé contre *F. graminearum*, ainsi que l'effet inducteur des activités enzymatiques de la PAL et de la POX. De plus, la POX serait impliquée dans l'oxydation des composés phénoliques et la paroi cellulaire permettant ainsi la lignification et le renforcement pariétales des sites d'infection (Kerby et Somerville, 1989 ; Mohammadi et Kazemi, 2002, Almagro et al., 2009). L'ensemble des résultats du suivi de gènes et d'activité enzymatique semble suggérer que l'effet protecteur du dérivé de chitosan BioA 187 contre l'oïdium s'explique par la mise en place d'une cascade de réactions de défense impliquant la régulation des PR et l'activation de la voie des phénylpropanoïdes. En ce sens l'étude en métabolomique ciblée a montré une accumulation plus importante d'amides de l'acide hydroxycinnamique et notamment des isomères de caffeoyl agmatines chez les plantules pré-traitées par le BioA187 en conditions infectieuses, 1 jour après l'infection. Les amides d'acides hydroxycinnamique, dont les dérivés coumaroyl- et caffeoyl-agmatine, sont considérés comme des composés de défense (Ube et al., 2019a), et décrits pour être accumulés dans les feuilles d'orge en réponse à l'infection par deux champignons pathogènes, tels que *F. graminearum* et *B. sorokiniana*. Gunnaiah et al., (2012) ont rapporté que parmi les phénylamides quantifiés, la coumaroylputrescine, feruloylputrescine, coumaroylagmatine et feruloylagmatine ont été fortement accumulées chez le blé résistant après infection par *F. graminearum*. Certains de ces amides, extraits et purifiés, empêchent la germination des spores et inhibe l'allongement du tube germinatif chez *F. graminearum* et *Alternaria brassicicola* (Muroi et al., 2009, Ube et al., 2019b). Ces composés pourraient donc contribuer à empêcher ou au moins ralentir la pénétration de *B. graminis* dans les tissus de la plante.

Mécanismes impliqués dans la protection du blé contre l'oïdium suite à l'application combinée (BioA+Fm)

La combinaison des deux traitements (BioA +Fm) a conféré une protection du blé contre *B. graminis* de plus de 72%. Comparée aux résultats de la protection du BioA et Fm testés séparément, l'efficacité de protection obtenue avec BioA+Fm est significativement plus importante, suggérant un effet partiellement additif entre la mycorhization et la pulvérisation foliaire du BioA. Dans la littérature, l'étude de l'association de ces deux traitements reste jusqu'à ce jour peu documentée. Lowe et al., 2012 ont démontré que le traitement combinant un mélange commercial de CMA et un traitement foliaire a réduit de 80% les symptômes de l'oïdium sur fraisiers. Cependant, cette combinaison n'a jamais été rapportée dans le cadre du pathosystème blé/oïdium. Hors contexte infectieux, nous avons observé une induction plus

précoce des gènes *PR1* et *PR5* par rapport aux plants de blé traités uniquement par le BioA. Contrairement aux plantes traitées séparément par BioA et *Fm*, le gène *PR15* (oxalate oxydase) est exprimé à 48Hpt chez les feuilles de blé traité avec le BioA + *Fm* par rapport aux autres traitements utilisés séparément (BioA seul ou *Fm* seul). La PR15 est responsable de la dégradation de l'oxalate et de l'accumulation de H₂O₂ cytotoxique pour les agents pathogènes (Donaldson et al., 2001 ; Hu et al., 2003). L'expression du gène *PR15* est souvent signalée suite à l'infection par un agent pathogène (Sels et al., 2008 ; Pan et al., 2007). Ors et al. (2013) ont rapporté une surexpression d'un gène codant pour l'oxalate oxydase dans les feuilles de blé du cv. Premio suite au traitement par un chitosan en conditions non-infectieuses. L'induction des gènes codant une POX et une PR15 permettrait une mise en place de la vague oxydative, la stimulation du système antioxydant et l'accumulation des FAO conduisant à un renforcement pariétal. De plus, les gènes codant une PR1 et une PR5 sont induits plus tôt à 48Hpt dans les feuilles traitées par BioA+*Fm* comparés au traitement au BioA seul. Ceci pourrait indiquer une induction précoce de la réponse de défense et une mise en place d'un état de résistance chez les plantes ayant reçu le traitement combiné BioA+*Fm*. Il est rapporté que les ROS peuvent induire l'expression des gènes *PR1*, *PR5* et l'accumulation plus importante de l'AS en réponse à des stress biotique et abiotique dans le cadre de la SAR (Petre et al., 2011, Fierens et al., 2009 ; Moller, 2001 ; Spoel et al., 2003, Costet et al., 2002). Récemment, Ali et al. (2018) ont montré que les PR1 et PR5 sont principalement liées à la voie de l'AS. L'activité de l'oxalate oxydase de la PR15 peut amener à la production du H₂O₂ qui sert de signal de transduction et l'activation des réactions de défenses telles que les PR et l'accumulation des phytoalexines (Mittler, 2002 ; Voigt, 2016). En plus des gènes codant une PR14, POX, PAL dans les plantes traitées par le BioA et infectées, la PR8 et la PR15 ont été induites à 24Hpi suite à l'infection par *B.graminis* chez les plantes traitées par la combinaison BioA+*Fm*. L'expression du gène *PR8* (chitinase) survenant dans les premières heures de l'infection suggère son rôle dans la dégradation des polymères de la chitine de la paroi des agents pathogènes (Tayeh et al., 2015). L'ensemble de ces résultats montre que l'association de la mycorhization et de la pulvérisation avec le BioA a conduit à un renforcement des mécanismes de défense chez le blé mis en place par les deux traitements utilisés séparément et ce en induisant des PR supplémentaires comme la PR8 et la PR15 par comparaison aux profils des gènes surexprimés chez les plants de bla traités par *Fm* ou BioA séparément.

Par ailleurs, il est à signaler que le traitement foliaire au BioA à 6 semaines de culture du blé mycorhizé avec *Fm* n'a pas eu d'effet sur le taux de mycorhization des racines de blé.

L'utilisation du chitosan comme amendement au niveau du sol a permis d'augmenter la colonisation mycorhizienne des racines des plantules de fraises inoculés par *Fm* de manière significative jusqu'à 4 semaines de culture (John et al., 2000). En revanche, cet effet n'a pas été confirmé à 8 semaines (John et al., 2000). Ces auteurs ont suggéré que la colonisation mycorhizienne a atteint un plateau à 4 semaines. Le chitosan appliqué directement dans la rhizosphère peut modifier la morphologie des cellules radiculaires et l'architecture du système racinaire. En effet, le chitosan induit la biosynthèse de l'auxine et son accumulation dans les racines (Lopez-Moya et al., 2019). Dans notre étude, BioA est appliqué par pulvérisation foliaire après 6 semaines de culture des plantules de blé sur le substrat contenant l'inoculum mycorhizien. La symbiose mycorhizienne est déjà bien établie au niveau des racines du blé, et aucun effet à distance sur la colonisation racinaire n'a été montré.

Réponse du blé à l'infection par *B.graminis*

A l'exception d'une accumulation des isomères de caffeoyl agmatines légèrement plus importante en réponse à l'infection par *B.graminis*, chez les plantes pré-traitées par BioA 187 en comparaison des témoins, cette étude n'a pas permis d'observer des différences importantes du profil métabolomique retrouvées dans les tissus foliaires caractéristique de différents traitements, inoculation mycorhizienne et/ou induction d'un état de résistance de la plante à l'aide d'un éliciteur dérivé du chitosan. Seul l'impact de l'attaque de la plante par *B.graminis* sur les métabolismes des tissus foliaires dans les premières heures de l'infection a pu être observé. En ce sens, nous avons mis en évidence une accumulation significative d'une famille de molécules correspondant aux amides de l'acide hydroxycinnamique dans les premières heures de l'infection du blé par le pathogène. Il est à noter que cette accumulation n'est quantifiable qu'à partir de 24Hpi. Les points 12Hpi seraient trop en amont pour pouvoir percevoir l'effet de l'infection de *B.graminis* sur la synthèse des amides l'acide hydroxycinnamique. Il serait intéressant d'étendre la cinétique à d'autres points plus tardifs. Les amides d'acide hydroxycinnamique, également appelés phénylamides, sont considérés comme des composés de défense de base partagée par les espèces végétales de la famille des Poacées (Ube et al., 2019a). En ce sens l'accumulation de ces composés a été observée chez le blé en réponse l'infection par *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *F. graminearum*, *B. sorokiniana* (Stoessl et al., 1969 ; Gunnaiah et al. 2012, Ube et al., 2019b) mais aussi suite à l'application exogène de phytohormones comme le JA ou l'isopentényladénine (cytokinine) (Ube et al., 2019b). Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une tendance à l'accumulation de ce type de composés, notamment de la caffeoyl-putrescine dans les plantes de blé infectées à

24Hpi. De la même manière, l'accumulation d'un dérivé de CouAgm (p-coumaroyl-3-hydroxydehydroagmatine) a été observée dans les feuilles d'orge infecté par *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Von Röpenack et al., 1998). En plus de leurs activités antifongiques (Muroi et al. 2009, Ube et al. 2019b), certains dérivés HCAA, tels que les CouAgm et CouPut, sont incorporés dans les parois cellulaires et contribuent à leur renforcement (Okazaki et al., 2004 ; Ishihara et al., 2008 ; Muroi et al., 2009 ; von Röpenack et al., 1998). Au regard de ces données les phénylamides du blé pourraient jouer un double rôle de phytoalexines et de substrats pour le renforcement de la paroi cellulaire lors de l'infection du blé par des agents pathogènes. De plus, le suivi de l'expression des gènes marqueurs de défense chez le blé confirme l'activation de certaines voies de défense qui ne sont malheureusement pas suffisantes pour empêcher totalement la colonisation des tissus par *B.graminis* et l'expression des symptômes. Ainsi, l'infection du blé par *B.graminis* entraîne une induction de l'expression de 5 gènes, codant des protéines PR, *PR1*, *PR4*, *PR5*, *PR8* et *PR15*, dont les 4 premières présentent des propriétés antimicrobiennes (Shoresh and Harman, 2008 ; Singh et al., 2014 ; Enoki and Suzuki 2016). La *PR15* agit par son activité d'ester oxydase de l'acide oxalique produisant l' H_2O_2 qui déclenche la transduction du signal mais peut également contribuer aux renforcements des parois via l'activité de la POX (Mittler, 2002 ; Voigt, 2016). En ce sens, nos résultats reportent une surexpression du gène POX associé à une stimulation de l'activité peroxydase en réponse à l'attaque par *B.graminis*. Enfin, l'induction de l'expression du gène codant le facteur de transcription WRKY, confirme une induction des défenses du blé dépendantes de la voie du SA suite à l'inoculation du blé par le champignon biotrophe, *B. graminis* f.sp. *tritici*.

5. Conclusions

Lors de cette étude nous avons montré que le traitement combinant BioA+*Fm* a mené à une amélioration de la protection contre l'oïdium du blé comparé aux deux traitements utilisés séparément. Le suivi de l'expression des gènes marqueurs de défense a démontré que le traitement combiné a conduit à un renforcement des mécanismes de défense induits chez le blé similaire aux mécanismes mis en place par les deux traitements utilisés séparément mais aussi à la surexpression de gènes codant des PR supplémentaires, non-induites par BioA187 ou *Fm*. De plus, il serait intéressant d'explorer d'autres voies de défense par une approche transcriptomique afin d'examiner l'expression des gènes d'autres voies liées impliqués dans différentes voies métaboliques des mécanismes de défense du blé.

Résultats et discussions

Conclusions générales

&

Perspectives

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Les enjeux économiques liés à la culture de blé en France et en Europe et l'importance agroalimentaire de cette culture majeure ont conduit à une utilisation systématique de produits phytosanitaires conventionnels issus de la chimie de synthèse pour la protéger contre divers agents phytopathogènes. Aujourd'hui, dans le cadre de la transition agroécologique visant à préserver à la fois la santé humaine et environnementale tout en assurant des conditions de production agricole économiquement rentables, la réduction des intrants chimiques en agriculture est soutenue par des plans d'action nationaux et internationaux. De ce fait, la recherche de solutions alternatives reposant sur des outils de lutte moins générateurs de risques, biosourcés ou bio-inspirés, a connu un essor au cours de ces dernières décennies. Ainsi, pour répondre aux multiples exigences d'une agriculture plus durable, parmi les solutions alternatives et/ou complémentaires de la lutte chimique conventionnelle envisagées, l'utilisation de substances stimulatrices des défenses des plantes (SDP) ou de micro-organismes bénéfiques vivants tels que les CMA fait partie des méthodes de biocontrôle qui sont actuellement en cours de développement. En effet, la lutte via l'induction des mécanismes de défense pourrait contribuer à la protection du blé contre les agents pathogènes fongiques tel que *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*, champignon biotrophe responsable de l'oïdium et ainsi réduire l'utilisation des pesticides chimiques.

Les produits de biocontrôle proposés ici (SDP et CMA) ont été souvent appliqués séparément et ont souvent montré une efficacité partielle ainsi qu'une perte d'efficacité lors du transfert au champ. Pour optimiser l'efficacité de ces outils de biocontrôle, et notamment améliorer la protection du blé contre l'oïdium, mon projet de thèse, qui s'inscrit dans le cadre général du projet INTERREG V BioScreen, avait pour principal objectif d'associer deux types de traitements, un SDP par pulvérisation foliaire, avec un inoculum mycorhizien commercial à base d'un CMA (par introduction au début de la culture dans le substrat) afin d'optimiser l'effet protecteur obtenu contre l'oïdium sur blé.

La première partie de ce travail a permis de cribler différentes molécules et inoculums fongiques quant à leur efficacité contre l'oïdium. Les résultats du criblage *in planta* ont permis de sélectionner douze molécules et deux mélanges appartenant à quatre familles de natures chimiques différentes (rhamnolipides, chito-oligosaccharides, lipopeptides, cyclodextrines). Les traitements à base de rhamnolipides à chaîne de carbone C12, un chito-oligosaccharide (BioA 187) et deux mélanges de lipopeptides ont conféré une protection moyenne contre *B. graminis* allant de 47 à 65%. De plus, toutes les molécules testées ont montré un effet anti-germinatif *in vitro* contre les spores de *B. graminis* à partir de 100µM. Suite à cette phase de

Conclusions générales et perspectives

criblage, le chito-oligosaccharide BioA 187, d'origine biologique et ayant montré une bonne protection *in planta* dans diverses conditions, a été retenu pour la suite de l'étude.

Le criblage des inoculums fongiques a porté sur différents champignons (un endophyte, des différentes espèces de CMA sous différentes formes d'inoculum mycorhizien (plugs, encapsulés en microbilles d'alginate et des inoculums contenant des propagules mélangées à un substrat inerte) a mis en évidence, dans nos conditions expérimentales, l'efficacité d'un seul inoculum mycorhizien commercial à base d'une espèce de CMA *F. mosseae*. En effet, celui-ci a permis d'obtenir une diminution significative des symptômes de l'oïdium de 33% sur des plantes âgées de 8 semaines. C'est pourquoi cet inoculum mycorhizien commercial à base de *Fm* a été sélectionné pour la suite des travaux et donc associé au traitement foliaire BioA 187.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence un effet additif de la protection contre l'oïdium du blé en combinant la mycorhization des racines par *Fm* et la pulvérisation foliaire par le BioA. En effet, dans ces conditions, la protection est significativement supérieure aux deux traitements appliqués séparément et dépasse 72%. Par ailleurs, il a été montré que l'association du BioA+*Fm* n'affecte ni la colonisation des racines par *Fm*, ni la croissance du blé, ni les teneurs des feuilles en pigments photosynthétiques.

Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans cette protection, nous avons étudié différents paramètres biochimiques (accumulation des métabolites, activité enzymatique) et moléculaires (suivi de l'expression des gènes marqueurs de défense). Les suivis de l'accumulation des transcrits dans les feuilles de blé mycorhizé non infecté ont pu mettre en évidence une surexpression des gènes codants pour des marqueurs de défense comme la PAL, l'enzyme clé régulatrice du métabolisme des phénylpropanoïdes et la POX catalysant l'oxydation des composés phénoliques en présence de H₂O₂ et permettant la formation de la lignine (Kong et al., 2015, Passardi et al., 2005) en comparaison de plants de blé témoins. Ce niveau supérieur d'expression de certains gènes pourrait permettre à la plante de réagir de façon plus rapide et plus efficace lors de la pénétration par l'agent pathogène. Le renforcement pariétal consécutif se traduit le plus souvent par la formation de nouvelles barrières dénommées papilles ou appositions pariétales qui contribuent fortement à bloquer la progression de l'agent pathogène dans les tissus de la plante et à empêcher la diffusion des enzymes fongiques de dégradation des parois végétales.

Ces résultats démontrent que la réduction du niveau d'infection par *B. graminis* en réponse à la mycorhization des racines résulterait de la résistance induite par la mycorhize (MIR). Dans

Conclusions générales et perspectives

notre étude, les mécanismes associés à la MIR ont mené à une élicitation des défenses de type systémique qui aboutira à une réduction de la capacité du champignon à coloniser les tissus de la plante et donc réduire l'apparition des symptômes.

D'autre part, le mode d'action du BioA a été également évalué en conditions non infectieuses et nous avons pu également mettre en évidence des mécanismes de défenses induits dans les feuilles de blé. Il a été généralement démontré que le chitosan et ses dérivés sont reconnus comme des PAMP et sont susceptibles d'induire des réactions de défenses (Shibuya et Minami, 2001). En absence de l'agent pathogène, nous avons rapporté l'effet éliciteur du BioA et l'implication de marqueurs associés à la voie de l'AS tels que l'expression des gènes codant des protéines *PR* (*PR1*, *PR4*, *PR5*, *PR14*), l'induction de la voie des phénylpropanoïdes en plus de l'expression du gène codant la POX et de l'activité enzymatique peroxydase. L'infection du blé par *B. graminis* a été suivie par une expression des gènes *PR4*, *PR14*, *PAL*, *CHS*, *FNS* en plus de la POX chez les feuilles traitées préventivement au BioA. L'analyse métabolomique a montré qu'en contexte infectieux, BioA induit également une accumulation de cafféoyl-agmatines par comparaison aux valeurs observées chez les plants témoins infectés. Les phénylamides du blé pourraient jouer un rôle de phytoalexines, et peuvent intervenir dans le renforcement de la paroi cellulaire (Ube et al., 2019a). L'induction du métabolisme du blé à ces différents niveaux expliquerait la diminution de l'infection par l'agent pathogène menant à une protection contre *B. graminis*.

En ce qui concerne les mécanismes impliqués dans la protection du blé suite à l'application combinée BioA+*Fm*, nous avons démontré une induction des réactions des défenses, impliquant des gènes codant des protéines *PR* (*PR1* et *PR5*), plus précoce par rapport aux plantes traitées par BioA, associée à l'expression des gènes *POX*, *PR15* et à l'augmentation de l'activité de la peroxydase. En conditions infectieuses, la surexpression des gènes codant les *PR14*, *PAL*, *POX* a été détectée. De plus, nous avons démontré que deux gènes codant pour des protéines *PR* (*PR8* et *PR15*) ont été induits. La comparaison des profils d'expression des gènes couplée à l'induction de l'activité enzymatique POX a permis de conclure que le traitement combiné (BioA+*Fm*) a conduit à un renforcement des mécanismes de défense chez le blé (SAR et MIR) mis en place par les deux traitements utilisés séparément et ce en induisant des PR supplémentaires comme la *PR8* et la *PR15* par comparaison aux profils des gènes surexprimés chez les plantes de blé traités par *Fm* ou BioA séparément. Il est important de signaler que la modulation des réponses de défense de la plante et l'amplitude des réactions mis en jeu par le

traitement BioA+*Fm* expliquerait en partie son efficacité dans la protection du blé contre l'oïdium.

Ce travail a mis en évidence pour la première fois l'efficacité d'un traitement préventif combinant un inoculum racinaire fongique à base de CMA, *Fm*, et une application foliaire d'un chito-oligosaccharide BioA. En effet, jusqu'à ce jour, différents SDP avaient été souvent testés seuls, sans inoculum racinaire à base de *Fm*, contre l'oïdium des céréales tels que le tréhalose, le benzothiadiazole (BTH), le Milsana® ainsi que le chitosan pour leur faible risque écotoxologique par rapport aux fongicides de synthèse (Tayeh et al., 2014, Randoux et al. 2006, Faoro et al., 2008). Dans le cadre du traitement combinant BioA+*Fm*, nous avons mis en évidence plusieurs mécanismes de défense impliqués dans la protection du blé contre l'oïdium.

Bien que les résultats obtenus dans le présent travail soient encourageants et ont permis de mettre en évidence le potentiel de l'association (BioA+*Fm*) comme moyen de biocontrôle contre *B. graminis* f.sp. *tritici*, plusieurs questions ont été soulevées et nécessitent d'être approfondies à travers les perspectives ci-dessous :

1- Explorer d'autres voies de défense et utiliser d'autres approches méthodologiques :

Les travaux engagés dans le cadre de cette étude ont permis de souligner la complexité des mécanismes mis en jeu et invite donc à une caractérisation complémentaire afin d'élucider le mode d'action d'un traitement combinant deux moyens de biocontrôle. En effet, il serait envisageable, pour mesurer l'implication de la voie des phénylpropanoïdes, de doser les variations des teneurs en AS dans les feuilles de blé par fluorimétrie (Pál et al., 2011). Concernant la voie des octadécanoïdes impliquée dans les premières heures suivant l'infection, le dosage de l'activité enzymatique lipoxygénase (LOX) et du taux endogène de l'AJ ou du méthyl-jasmonate (MeJA) par GC-MS (Dathe et al., 1994 ; Mei et al., 2006) permettrait de vérifier la nature des mécanismes mis en jeu dans les réactions de défense du blé. De plus, une approche transcriptomique serait pertinente pour déterminer de façon plus globale les différents métabolismes de la plante qui sont affectés par ce traitement et ainsi de sélectionner certains marqueurs moléculaires plus pertinents de l'établissement de l'induction de la résistance chez le blé en réponse au traitement en combinaison (BioA+ *Fm*).

D'autres part, une étude cytologique *in planta* permettrait de caractériser l'effet de ce traitement sur le processus infectieux de *B. graminis*. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'impact de ce traitement sur la germination des spores et la pénétration du champignon pathogène dans les tissus foliaires jusqu'à la formation des haustoriums. L'observation de la formation de papilles

dans les parois au site de pénétration de *B. graminis* permettrait également de caractériser les réactions de défense localisées, *via* l'accumulation de composés phénoliques ou d'H₂O₂ au niveau de ces papilles (Mustafa et al. 2017, Tayeh et al., 2015).

2- Rechercher une activité biostimulante du traitement BioA et de la mycorhization :

L'effet du BioA 187 et de la mycorhization sur la croissance du blé (biomasse sèche, tallage et hauteur du maître brin) a été étudié et n'a montré aucune amélioration ou altération sur la plante. Les effets de ce traitement à des stades plus avancés et clés du cycle du développement du blé et à différentes dates post-traitements, tels que l'épiaison, le remplissage, le poids de mille grains, pourrait apporter quelques éléments de réponse sur l'éventuel effet biostimulant de ce traitement, à long terme.

Par ailleurs, l'absence de bénéfices de la mycorhization sur la croissance du blé pourrait être due à la non fonctionnalité de la symbiose. Pour valider cette hypothèse, la mesure de l'expression des gènes codant exemple pour des transporteurs de phosphate ou de nitrate permettrait de vérifier la fonctionnalité de la symbiose mycorhizienne (Mohanta and Bae, 2015 ; Voß et al., 2018 ; Wang et al., 2017a).

3- Optimiser l'utilisation des SDP :

- Rechercher la concentration efficace pour induire les réactions de défenses du blé

Le criblage des molécules (rhamnolipides, lipopeptides et le chito-oligosaccharide BioA) a été réalisé à une concentration fixée à 100µM. Il serait intéressant de tester l'efficacité de concentrations plus faibles dans la protection du blé contre *B. graminis*. Ce type de traitement préventif peut être aussi testé à faible concentration en double application espacées dans le temps (Renard-Merlier et al., 2007).

- Tester différents modes d'application du BioA

Dans la littérature, il a été rapporté que le chitosan peut être appliqué au niveau racinaire comme au niveau foliaire mais aussi en prétraitement des semences (El Amerany et al., 2020, Sharathchandra et al., 2004, ; Ors et al., 2016). Dans le cadre de notre étude, un seul mode d'application ainsi qu'un seul traitement préventif ont été testés, et ce de façon foliaire. Sharathchandra et al., (2004) ont obtenu une protection de 67% du millet contre le mildiou par un traitement des semences avec un produit commercial Elexa® à base de chitosan. Aussi, un prétraitement des semences de blé avant le semis pourrait être testé, ce qui permettrait, en cas

de protection, de diminuer les interventions au champ et donc les coûts de production (consommation carburant, pollution, temps de travail et charges).

4- Tester d'autres combinaisons de biocontrôle

Lors du transfert au champ l'efficacité du traitement peut varier et ce pour plusieurs raisons (doses, conditions météorologiques, cultivars, mode et fréquence d'application, choix de l'adjuvant, instabilité etc.). De manière générale, il est important aussi de signaler que le poids moléculaire du chitosan, son degré d'acétylation ou la concentration appliquée sont des éléments pouvant conditionner son mode d'action (Verlee et al., 2017). En effet, les chitosans à faible poids moléculaire semblent être plus efficaces contre la croissance mycélienne. De plus, le degré de d'acétylation est aussi déterminant pour l'activité antifongique (Hongpattarakere et Riyaphan, 2008, Tsai et al., 2002). On peut donc envisager de tester différentes combinaisons associant des chito-oligosaccharides de caractéristiques différentes avec d'autres micro-organismes bénéfiques autres que les CMA, tels que les PGPF, PGPR, ou d'autres SDP induisant des voies de défenses différentes afin d'élargir le spectre d'action et l'efficacité du traitement sur plusieurs pathosystèmes.

Enfin, il serait intéressant de tester l'efficacité de cette association entre la mycorhization et le BioA contre l'oïdium du blé à l'échelle du champ.

5- Tester la combinaison BioA+*Fm* sur d'autres champignons pathogènes du blé

Enfin, la « MIR » est souvent considérée comme un état de résistance systémique très proche de l'état d'ISR induit par des bactéries bénéfiques. L'ISR est reconnue pour entraîner une résistance de la plante contre un large spectre d'agents pathogènes, il serait donc intéressant de tester l'effet de la mycorhization combinée au BioA contre un autre agent pathogène du blé, comme par exemple le champignon hémibiotrophe *Zymoseptoria tritici*, agent de la septoriose, ou le champignon biotrophe *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, agent de la rouille noire, maladies responsables d'importantes pertes de rendement chez le blé.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Références bibliographiques

A

- Acar O, AKI C, Erduğan H. 2008. Fungal and bacterial diseases control with Elexa™ plant booster. *Fresenius Environmental Bulletin*. 17. 797-802.
- Agostini P, Bushong PM, Timmer LW. 2003. Green house evaluation of products that induce host resistance for control of Scab, Melanose and Alternaria brown spot of Citrus. *Plant Disease*. 87- pp. 69-74.
- Agreste, GRAPH'AGRI 2020
- Akiyama K, Hayashi H. 2006. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annual Botanic*. 97(6):925-31. doi: 10.1093/aob/mcl063.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–827.
- Al-Dhabaan F, Mostafa M, Almoammar H, Abd-Elsalam K.2018. Chitosan-Based Nanostructures in Plant Protection Applications, *Nanobiotechnology Applications in Plant Protection*, 10.1007/978-3-319-91161-8_13, (351-384)
- Ali S, Chandrashekar N, Rawat S, Nayanakantha NMC, Mir ZA, Manoharan A, Sultana M, Grover A. 2017. Isolation and molecular characterization of pathogenesis related PR2 gene and its promoter from *Brassica juncea* Biol. Plant., 61, pp. 763-773.
- Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, *et al.* 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*. 212–213 (2018), pp. 29-37.
- Alizadeh H, Behboudi K, Ahmadzadeh M, Javan-Nikkhah M, Zamioudis C, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biol. Control* 65(1): 14-23
- Al-Karaki GN. 2013. The Role of Mycorrhiza in the Reclamation of Degraded Lands in Arid Environments. *In* Developments in Soil Classification, Land Use Planning and Policy Implications pp: 823-836
- Allario T, Fourquez A, Magnin-Robert M, Randoux B, Siah A, Halama P, Brisset MN, Baltenbeck R, Huguency P, Reignault P.2021 Metabolites and defense genes expressions analysis in leaves of wheat facing to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. tritici. Not yet published.
- Almagro L, Gomez Ros L, Belchi-Navarro S, Bru R, RosBarcelo A, Pedreno MA. 2009. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experiment Botany*. 60(2):377–390. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern277>.
- Alsaïari S. 2012. Functional analysis of FLRS and FLR in wheat during drought stress .Carleton University.Thèse
- Antoniw J.F, Ritter C.E, Pierpoint W.S, van Loon L.C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV J. Gen. Virol., 47, pp. 79-87

Références bibliographiques

Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal Genetic Virology*, 47: 79-87.

Anzlovar S, M Dermastia 2003 The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins. *Plant Biol* 5:116–124.

Agarwal P, Agarwal PK. Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling.2014. *Mol Biol Rep*. 2014 Feb;41(2):599-611. doi: 10.1007/s11033-013-2897-4. Epub 2013 Dec 17. PMID: 24343423.

Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J Appl. Microbiol*.

Aspinall GO, Kessler G .1957. La structure de la callose de la vigne. Chimie et industrie, Londres

Audenaert K, De Meyer GB, Höfte MM. 2002. Abscisic Acid Determines Basal Susceptibility of Tomato to *Botrytis cinerea* and Suppresses Salicylic Acid-Dependent Signaling Mechanisms. *Plant Physiol*. 128: 495-501.

Awasthi, Praveen & Gupta, AJAI & Bedi, Y. S. & Vishwakarma, Ram & Gandhi, Sumit. 2016. Mannitol Stress Directs Flavonoid Metabolism toward Synthesis of Flavones via Differential Regulation of Two Cytochrome P450 Monooxygenases in *Coleus forskohlii*. *Frontiers in Plant Science*. 7. 10.3389/fpls.2016.00985.

Azcón-Aguilar C & Barea JM. 1997. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*. 6: 457-464.

Aziz A, Gauthier A, Bezier A, Poinssot B, Joubert J. M, Pugin A, Heyraud A, Baillieul F. 2007. Elicitor and resistance-inducing activities of beta -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta -1,3 glucans and alpha -1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*,58: 1463-1472

Aziz.A, Trotel-Aziz. P, Dhucq. L, JeandetP., Couderchet M, VernetG. 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*, 96, pp. 1188-1194.

B

Badawy M.E., Rabea.E. I, 2009. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit

Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949– 957.

Bari R, Jones JDG. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular Biology*.69 (4): 473-488

Barrat DHP, Derbyshire P, Findlay K, Pike M, Wellner N et al. 2009. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(31):13124-9. DOI: [10.1073/pnas.0900689106](https://doi.org/10.1073/pnas.0900689106).

Basu S, Rabara R C, Negi S. 2018. AMF: the future prospect for sustainable agriculture. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 102, 36–45. doi: 10.1016/j.pmpp.2017.11.007.

Références bibliographiques

- Batistič O, Kudla J. 2009. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793: 985-992.
- Baxter M, Lackmann MA, Mahoney KM, Workoff TE, Hamill TM. 2014. Verification of Quantitative Precipitation Reforecasts over the Southeastern United States. *Amer Meteol Soci.* DOI: 10.1175/WAF-D-14-00055.1.
- Bélanger RR, Benyagoub M. 1997. Challenges and prospects for integrated control of powdery mildews in the greenhouse. *Can J of Plant Pathol.* 19 (3):310-314.
- Benhamou N, Picard K. 2000. La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection* 80 : 137-168.
- Benhamou N, Rey P. 2012a. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable-principes de la résistance induite. *Phytoprotection.* 92 (1): 1-23.
- Benhamou N, Rey P. 2012b. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable- Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection.* 92 (1): 24-25.
- Benhamou N, Picard K. 2000. La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection* 80: 137-168.
- Benschop JJ, Mohammed S, O'Flaherty M, Heck AJR, Slijper M, Menke FLH. 2007. Quantitative Phosphoproteomics of Early Elicitor Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cellular Proteomics* 6(7): 1198-1214.
- Ben-Shalom N, Ardi R., Pinto R., Aki C, Fallik E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection.* 22(2): 285-290.
- Bernard JL, Rameil V. 2006. L'innovation en protection des cultures : quelle influence sur la consommation de produits phytosanitaires par l'agriculture française ? *Courrier de l'environnement de l'INRA* n°53, décembre 2006 : 63-82.
- Berrocal-Lobo M, Molina A. 2004. Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 17(7):763-70. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.7.763.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Solano R.*et al.*, 2002. Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The plant Journal.* 29(1):23-32.
- Bertini L, Caporale C, Testa M, Proietti S, Caruso C. Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. *FEBS Letters.* 2009; 583:2865–2871.
- Besserer A, Becard J, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Dalmas N.2008. GR24, a Synthetic Analog of Strigolactones, Stimulates the Mitosis and Growth of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora rosea* by Boosting Its Energy. *Metabolism. Plant Physiol.* 148: 402–413.
- Besserer A, Puch-Pagès V, Kiefer P et al. 2006. Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *PLOS Biol.* 4(7): e226. doi: [10.1371/journal.pbio.0040226](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226)
- Bethke G, Peshier P, Eshen-Lippold L *et al.*, 2012. Activation of the *Arabidopsis thaliana* Mitogen-Activated Protein Kinase MPK11 by the Flagellin-Derived Elicitor Peptide,

Références bibliographiques

- flg22. MPMI 254, 2012, pp. 471–480. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-11-11-0281>. © 2012 *The American Phytopathological Society*.
- Bhaskara Reddy MV, Arul J, Angers P, Couture L. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J Agric Food Chem*. 1999 Mar;47(3):1208-16. doi: 10.1021/jf981225k. PMID: 10552439.
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, King J. 2009. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. 60(2): 509–521.
- Biere A, Goverse A. 2016. Plant Mediated System Interactions Between Pathogens, Parasitic Nematodes and Herbivores Above- and Belowground. *Annual Review of Phytopathology*. Vol.54: 499-52. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100245>.
- Binder BM. Ethylene Signaling In Plants.2020. *J Biol Chem*. May 29;295(22):7710-7725. Doi: 10.1074/Jbc.REV120.010854.
- Bødker L, Kjølner R, Kristensen K, Rosendahl S. 2002. Interactions between indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and *Aphanomyces euteiches* in field-grown pea. *Mycorrhiza* 12(1):7-12
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003. 54:519–46.
- Bolay, A. 2005. Les oïdiums de Suisse (Erysiphacées). *Cryptogamica Helvetica*, 20, p. 1-176.
- Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60:379-406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.
- Bolwell GP. 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol*. 2(4):287-94. doi: 10.1016/S1369-5266(99)80051-X.
- Bonello P, Blodgett JT. 2003. *Pinus nigra*–*Sphaeropsis sapinea* as a model pathosystem to investigate local and systemic effects of fungal infection of pines. *Physiol Mole Plant Pathol* 63(5): 249-261.
- Bonfante P, Bianciotto V. 1995. Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi: morphology and cytology, in: Varma A., Hock B. (Eds.), *Mycorrhiza*, Springer Press, Berlin, pp. 229–247.
- Bonjean A. 2001. Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). *Dossier de l'environnement* de l'INRA, n°21: 29-37.
- Borah, S.N., Goswami, D., Sarma, H.K., Cameotra, S.S., and Deka, S. 2016. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize. *Front Microbiol* 7: 1505
- Bostock RM. 2005. Signal Crosstalk and Induced Resistance: Straddling the Line Between Cost and Benefit. *Annual Review of Phytopathology* 43(1):545-80.
- Both M, Csukai M, Stumpf MPH, Spanu P D. 2005. Gene Expression Profiles of *Blumeria graminis* Indicate Dynamic Changes to Primary Metabolism during Development of an Obligate Biotrophic Pathogen. *The Plant Cell*, Vol. 17, 2107–2122.

Références bibliographiques

- Boulenouar N, Marouf A, Cherif A 2011. Phytopathologie fongique et métabolites secondaires. *Annales de l'Université de Bechar* 11: 1112-6604.
- Bourras S, Praz CR, Spanu PD, Keller B.2018. Cereal powdery mildew effectors: a complex toolbox for an obligate pathogen. *Current Opinion in Microb.* 46: 23-33.
- Boutrot F, Segonzac C, Chang KN et al. 2010. Direct transcriptional control of the Arabidopsis immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(32):14502-7.
- Bravo A, Brand M, Wewer V, Dörmann P, Harisson MJ. Arbuscular mycorrhiza-specific enzymes FatM and RAM2 fine-tune lipid biosynthesis to promote development of arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist.* 214 (4): 1631-1645.
- Breen S, Williams SJ, Outram M, Kobe B, Solomon PS. 2017. Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein. *Trends In Plant Science.* 22(10):871–879.
- Breen S, Williams SJ, Winterberg B, Kobe B, Solomon PS.2016. Wheat PR-1 proteins are targeted by necrotrophic pathogen effector proteins. *Plant J.* 88 (1): 13-25.
- Briset M-N, Duge de Bernonville T. 2011. Device for determining or studying the state of stimulation of the natural defenses of plants or portions of plants. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2011161388>
- Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MFC, Cammue BPA. 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 44:393-416.
- Bruisson E, Alvarado ST, Le Stradic S, Morellato LPC. 2016 . Plant phenological research enhances ecological restoration. *Restoration Ecology.* <https://doi.org/10.1111/rec.12471>.
- Brundrett MC. 1991. Mycorrhizas in Natural Ecosystems. *Advances in Ecological Research* 21:171-313. DOI: [10.1016/S0065-2504\(08\)60099-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60099-9).
- Brundrett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist.* 154: 275-304.
- Brunner F, Stintzi A, Fritig B, Legrand M. Substrate specificities of tobacco chitinases. *The Plant Journal.* 1998; 14:225–234
- Buchel AS, Brederode FTh, Bol JF, Linthorst HJM. 1999. Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Molecular Biology* 40: 387–396.
- Burke JM, Riesenbergh LH. (2003). Fitness effect of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* 300: 1250.
- Butault JP, Delarme N, Jacquet F, Rio P, Zardet G. 2011. L'utilisation des pesticides en France: Etat des lieux et perspectives de réduction.
- Butron A, Chen YC, Rottinghaus GE, McMullen MD. 2010. Genetic variation at bx 1 controls DIMBOA content in maize. *Theor Appl Genetic.* 120 (4): 721-34

C

- Chen, H.; Seguin, P.; Jabaji, S. H. 2009. Differential expression of genes encoding the phenylpropanoid pathway upon infection of soybean seedlings by *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 31: 356-367

Références bibliographiques

- Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM, Ton J. 2014. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in Plant Science* 18: 539–545
- Caruso C, Caporale C, Poerio C, Facchiano A, Buonocore V. 1993. La séquence d'acides aminés d'une protéine de grains de blé étroitement liée aux protéines impliquées dans le mécanisme de défense des plantes. *Journal of Protein Chemistry*. 1993; 12 : 379-386.
- Caruso C, M. Nobile, L. Leonardi, L. Bertini, V. Buonocore, C. Caporale. 2001. Isolation and amino acid sequence of two new PR-4 proteins from wheat. *J. Protein Chem.* 20 (2001), pp. 327-335.
- Castellanos-Morales V, Cárdenas-Navarro R, García-Garrido JM, Illana A, Ocampo J.A, Steinkellner S, Vierheilig H. 2012. Bioprotection against *Gaeumannomyces graminis* in barley: a comparison between arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil Environ* 58: 256–261.
- Chang S, Puryear J, Cirney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular Biology Reporter* 11(2):113-116
- Chen, H.; Seguin, P.; Jabaji, S. H. 2009. Differential expression of genes encoding the phenylpropanoid pathway upon infection of soybean seedlings by *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 31: 356-367
- Comby M, Mustafa G, Magnin-Robert M, Randoux B, Fontaine J, Reignault Ph, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against aerial phytopathogens and pests. In: *Arbuscular mycorrhizas and stress tolerance of plants*. Springer, Singapore, pp 195–223 *Crop Prot.*, 22, pp. 285-290.
- Camejo D, Cedeño AG, Herrera AM. 2016. Reactive Oxygen Species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103:10-23.
- Cameron DD, Neal AL, Van Wees SCM, Ton Jurriaan. 2013. Mycorrhiza-induced resistance more than the sum of its part? *Opinion Trends in Plant Science* 18 (10): 539-545.
- Campbell MM, Sederoff RR. 1996. Variation in Lignin Content and Composition (Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants). *Plant Physiol.* 110(1): 3–13 .
- Campos -Soriano L. Garcia-Martinez J, San Segunda B. 2012. The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Mol Plant Pathol.* 13 (6). 279-592.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell.* 6: 1583-1592.
- Cao XR, Duan XY, Zhou YL, Luo Y. 2012. Dynamics in concentrations of *Blumeria graminis* f sp *tritici* conidia and its relationship to local weather conditions and disease index in wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 525-535.
- Cardon Z, Whitbeck JL. 2007. The Rhizosphere. *Academic Press*. DOI: [10.1016/B978-0-12-088775-0.X5000-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-088775-0.X5000-9)
- Cardoso IM, Kuyper TW. 2006. Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 116: 72–84.
- Caruso F, Lichtenfeld H, Giersig M, Möhwald H. 1999. Investigation of Electrostatic Interactions in Polyelectrolyte Multilayer Films: Binding of Anionic Fluorescent Probes to Layers Assembled onto Colloids. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 8523-8524.

Références bibliographiques

- Caruso C, M. Nobile, L. Leonardi, L. Bertini, V. Buonocore, C. Caporale. 2001. Isolation and amino acid sequence of two new PR-4 proteins from wheat. *J. Protein Chem.*, 20 (2001), pp. 327-335.
- Carvalho FP. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environment Science & Policy*. 9(7-8): 685-692.
- Casassola A, Brammer S P, Chaves M S, Martinelli J A, Stefanato F, Boyd L A. 2015. Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. *Toropi. Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89, 49–54.
- Caulier S, Nannon C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. 2019. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>.
- Cavagnaro TR, Smith MA, Smith SE, Jakobsen I. 2005. Functional diversity in arbuscular mycorrhizas: exploitation of soil patches with different phosphate enrichment differs among fungal species. *Plant Cell & Environment* 28 (5): 642-650. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01310.x>
- Caylak E, Tokar M. 2012. Metallic and Microbial Contaminants in Drinking Water of Cankiri, Turkey. *E- Journal of chemistry* 9 (2). DOI: [10.1155/2012/720317](https://doi.org/10.1155/2012/720317).
- Cevher-Keskin 2015. ARF1 and SAR1 GTPases in endomembrane trafficking in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14(9): 18181-18199.
- Cevher-Keskin B, Yildizhan Y, Kulen O, Onarici S. 2015. Quantitative expression analysis of TaMPK4 and TaTIP1 genes in drought tolerant and non-tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Omics* 8(3):270-277.
- Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann Jr H. 1998. Defense Activation and Enhanced Pathogen Tolerance Induced by H₂O₂ in Transgenic Tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(10):5818-5823.
- Chandanie, W.A., Kubota, M., and Hyakumachi, M. (2006). Interactions between plant growth promoting fungi and arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and induction of systemic resistance to anthracnose disease in cucumber. *Plant Soil*, 286, 209-217.
- Chang S, Puryear J, Cirney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular Biology Reporter* 11(2):113-116
- Chantret N, Salse J, Sabot F, Rahman S, Bellec A, *et al.* 2005. Molecular Basis of Evolutionary Events That Shaped the *Hardness* Locus in Diploid and Polyploid Wheat Species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell*. 2005 Apr; 17(4): 1033–1045. doi: [10.1105/tpc.104.029181](https://doi.org/10.1105/tpc.104.029181)
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4): 551-560, <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico, J.M., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R., Micol J.L., Solano R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448 666–671.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124 (4): 803-814

Références bibliographiques

Choi H M T, Calvert C R, Huss D, Barsi J C, Deverman B E, Hunter R C, Kato M, Lee S M, Abelin A C T et al. (2016). Mapping a multiplexed zoo of mRNA expression. *Development* 143, 3632-3637.

Chung T, Phillips AR, Vierstra RD. 2010. ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in Arabidopsis require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. *Plant Journal* 62: 483–493.

Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM. 2009. Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science*. 2;323(5910):95-101. doi: 10.1126/science.1164627.

Cochrane AS, Findlay DrB, Vederas JC, Ratemi ES. 2014. Key Residues in Octyl-Tridecaptin A₁ Analogues Linked to Stable Secondary Structures in the Membrane. *Chem Bio Chem First* <https://doi.org/10.1002/cbic.201402024>.

Colas AR , McKeithan WL , Cunningham TJ , Bushway PJ , Garmire LX , Duester G , Subramaniam S , Mercola M .2012. Whole-genome microRNA screening identifies let-7 and mir-18 as regulators of germ layer formation during early embryogenesis. *Genes Dev*. 26(23): 2567-79.

Colcombet J, Hirt H. 2008. Arabidopsis MAPKs: A complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 413(2):217-26. DOI: [10.1042/BJ20080625](https://doi.org/10.1042/BJ20080625)

Comby M, Gacoin M, Robineau M, Rabenoelina F, Ptas S, Dupont J, Profizi C, Baillieul F. 2017. Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different *in vitro* tests. *Microbiological Research*.202: 11-20.

Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1017-1028.

Curtis RHC, Robinson AF, Perry RN. 2009. Hatch and host location. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (eds) Root-knot nematodes. *CAB International, Wallingford*, pp 139–162.

Cutt JR, Harpester MH, Dixon DC, Carr JP, Dunsmuir P, Klessig DF.1989. Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology* 173 (1): 89-97. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90224-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90224-9).

Czarnocka W, Karpiński S. 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radic. Biol.Med.*, 122 (2018), pp. 4-20.

Czembor JH. 2002. Resistance to powdery mildew in selections from Moroccan barley landraces. *Euphytica*. 125, pages397–409.

D

Dai L, Wang Xie D, Zhang X.C, Wang X, XuY, WangY, ZhangJ. 2016.The novel gene vpPR4-1 from vitis pseudoreticulata increases powdery mildew resistance inTransgenic *Vitis vinifera* L. *front Plant Sci.*, 7, p. 695

Dalpé Y. 2005. Mycorrhizae: A potential tool for plant protection but not a panacea. *Phytoprotection -Quebec-* 86(1):53-59.

Références bibliographiques

- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J. and Hirt, H. (2014) The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol. Adv.* 32, 40–52.
- Danquah A, Zelicourt A, Boudsocq M, Neubauer J, Frey NFdit, Leonhardt N. 2015. Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* : 82, 232–244 doi: 10.1111/tpj.12808.
- Dao TTH, Linthorst HJM, Verpoorte R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem Rev.* 10:397–412.
- Dar TA, Uddin M, Khan MMA, Hakeem KR, Jaleel H. 2015. Jasmonates counter plant stress: a review. *Environ. Exp. Bot.* 115: 49-57.
- Das D, Eser BE, Han J, Sciore A, Marsh ENG. 2011. Oxygen-independent decarbonylation of aldehydes by cyano-bacterial aldehyde decarbonylase: a new reaction of di-iron enzymes. *Angew Chem Int Edn.* 2011;50:7148–7152.
- Das M K, Griffey CA. 1995. Gene action for adult resistance to powdery mildew in Wheat Disease Resistance in Wheat. *Genome* 38 (2): 277-282. <https://doi.org/10.1139/g95-034>
- Datta SK, Muthukrishnan S. 1999. Pathogenesis-related proteins in plants. 1st Edition: CRC Press: 304 p Boca Raton, FL.
- De Bruijn WJ, Vincken JP, Duran K, Gruppen H. 2016. Mass spectrometric characterization of benzoxazinoid glycosides from *Rhizopus*-elicited wheat (*Triticumaestivum*) seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 64:6267-76. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02889.
- De Bruijn WJ, Vincken JP, Duran K, Gruppen H. 2016. Mass spectrometric characterization of benzoxazinoid glycosides from *Rhizopus*-elicited wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 64:6267-76. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02889.
- De Jaeger N, De la Providencia I E, Rouhier H, Declerck S. 2011. Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* and *glomus* sp. within alginate beads: impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle *J. Appl. Microbiol.*, 111, pp. 125-135
- De Jonghe K, De Dobbelaere I, Sarrazyn R, Höfte M. 2005. Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. *Plant Pathology* 54, 219–226.
- De la Noval B, Pérez E, Martínez B, Leon O, Martínez-Gallardo N, Délano-Frier J. 2007. Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza.* 17(5):449-460. doi: 10.1007/s00572-007-0122-9.
- De la Peña E, Rodríguez Echeverría S, Win H, Putten VD, Freitas H, Moens M. 2006. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytologist.* 169: 829–840. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01602.x>.
- De leon DG, Vahter T, Zobel M, Koppel M, Edesi L, *et al.* 2020. Different wheat cultivars exhibit variable responses to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi from organic and conventional farms. *PLoS One* 15 (5) e0233878. <https://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0233878>.

Références bibliographiques

- De Meyer G, Audenaert K, Hofte M. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced Systemic Resistance in Tobacco Depends on in planta Salicylic Acid Accumulation but is not Associated with PR1a Expression. *European Journal of Plant Pathology* 105: 513–517.
- De Meyer G, Hofte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhi- zobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87: 588–593.
- De Vleeschauwer D, Gheysen G, Höfte M. 2013. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends in Plant Science*. 18 (10): 555-565.
- De Waard M A, Georgopoulos S G, Hollomon D W, Ishii, H, Leroux P, Ragsdale N N, Schwinn F J 1993. Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *A. Rev. Phytopathol.* 31, 403-421.
- De Zelicourt A, Colombet J, Hirt H. 2016. The Role of MAPK Modules and ABA during Abiotic stress signaling. *Trends in Plant Science* 21(8):677-685.
- Deepika, K.V, Sridhar, P.R, and Bramhachari, P.V. 2015. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 608–615.
- Delaney TP, Friederich L, Ryals JA. 1995. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Plant Biology*. 92: 6602-6606.
- Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA. 1995. Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Plant Biology .Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 6602-6606.
- Deleu M, Paquot M, Nylander T. 2008. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophysical Journal* 94(7):2667-79.
- Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front in Plant Sci.* 24;4:155.
- Deravel J, Krier F, Jacques P. 2014. Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *BASE*
- Deravel, J., Lemièrre, S., Coutte, F. et al. Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6255–6264 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5663-1>.
- Devireddy AR, Zandalinas SI, Gomez-Cadenas A, Blumwald E, Mittler R. 2018. Coordinating the overall stomatal response of plants: rapid leaf-to-leaf communication during light stress. *Science Signaling* 11: 1126.
- Dey D, Mann BR, Anshu A, Mann MA. 2014. Activation of protein kinase PKR requires dimerization-induced cis-phosphorylation within the activation loop. *J Biol Chem* 289(9):5747-57.
- Dimkić M, Stanković S, Nišavić M, Petković M, Ristivojević P, Fira D, Berić T. 2017. The Profile and Antimicrobial Activity of *Bacillus* Lipopeptide Extracts of Five Potential Biocontrol Strains. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00925>
- Dixon RA and Paiva N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7:1085–1097.

Références bibliographiques

- Dodgson JLA, Dodgson W. 2017. Comparison of effects of chitin and chitosan for control of *Colletotrichum* sp. on cucumbers. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 11, pp. 87-93
- Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL, Simmonds DH (2001) Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (*germin*) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 59: 297–307.
- Dong F, Pirbhai M, Zhong Y, Zhong G. 2004. Cleavage-dependent activation of a chlamydia-secreted protease. *Mol Microbiol.* 52 (5): 1487-1494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04072.x>.
- Dong H, Qin S, Zhou HX. 2010 . Effects of Macromolecular Crowding on Protein Conformational Changes. *PLoS Comput Biol.* 6(7): e1000833. doi:
- Donini, P J.R. Law JR, R.M.D. Koebner RMD, Reeves JC, Cooke RJ. 2000. Temporal trends in the diversity of UK wheat. *Theor Appl Genet.* 100:912–917.
- Douds DD, Gadkar V, Adholeya A. 2000. Mass Production of VAM fungus biofertilizer: 197-215. In KG Mukerji, BP Chamola and J Singh, eds. *Mycorrhizal Biology*, Kluwer Academic Press. New York.
- Droillard MJ, Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C. 2004. Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Letters* 574 (1-3): 42-48.
- Du Y, Chu H, Wang M, Chu IK, Lo C. 2010. Identification of flavone phytoalexins and a pathogen-inducible flavone synthase II gene (*SbFNSII*) in sorghum. *Journal of Experimental Botany.* 61(4):983–994.
- Dugassa GD, Von Alten H, Schönbeck F. 1996. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. *Plant and Soil.* 185: 173–182.
- Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185–209.

E

- Ebrahim, S., Usha k., Singh, B., 2011 Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism in Méndez-Vilas (Ed) *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, pp, 1043-1054.
- Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agric. Ecosyst. Env.*, 106, 119-133.
- Egorov Ts A, Odintsova TI. 2012. Defense peptides of plant immunity. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 38 (1): 1–9.
- El Hassni M, El Hadrami A, Daayf F, Chérif M, Ait Barka E, El Hadrami I. Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathol Mediterr.* 2004; 43:195–204.
- El Hassni M, El Hadrami A, Daayf F, Chérif M, Ait Barka E, El Hadrami I. 2004. Chitosan, antifungal product against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and elicitor of defence reactions in date palm roots. *Phytopathol Mediterr;* 43:195–204

Références bibliographiques

ELICITRA, <https://elicitra.org>.

Ellinger D, Naumann M, Falter C, Jamrow T, Manisseri C, Somerville SC, Voigt CA. 2013 Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161: 1433–1444.

Elmore JM, Lin ZJD, Coaker G. 2011. Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Current opinion in plant Biology* 14:365–371T.

Elsen A, Baimey H, Swennen R, De Waele D. 2003. Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing in nematode susceptibility. *Plant and Soil* 256: 303–313.

Elsen A, Gervacio D, Swennen R, De Waele D. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18:251–256.

Emmert E.A.B, Handelsman Jo. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171: 1-9.

Enkerli, K., Hahn, M.G. and Mims, C.W. 1997. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. *Can. J. Bot.* 75, 1494– 1508.

Epple P, Apel K, Bohlmann, H. 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109,813-820.

Erb, M. et Kliebenstein, DJ (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, 184 (1), 39- 52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>.

Erbs G, Newmann MA. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses *Mol Plant Pathol.* 4 (5): 421-425. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00179.x>

Eurostat 2017. *Annual Activity Report*. Ref. Ares(2018)1643736 - 26/03/2018: 55p.

Ezzahiri B., 2001. Les maladies du blé : identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. *Bulletin de transfert de technologie en agriculture*, N° 77, 4p.

F

Faessel L., Gomy C., Nassr N., Tostivint C., Hipper C., Dechanteloup A., 2014. Les biostimulants : définition, mode d'action et marché. *Vegenov*.

Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *J Chem Ecol.* 39:869–878.

Faoro F, Maffi D, Cantu D, Iriti M. 2008. Chemical-induced resistance against powdery mildew in barley: the effects of chitosan and benzothiadiazole. *Biocontrol*, 53: 387- 401.

Farace G, Fernandez O, Jacquens L, et al. 2014. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology* 16: 177–187.

Références bibliographiques

- Feldman M, Millet E. 2001. The contribution of the discovery of wild emmer to an understanding of wheat evolution and domestication and to wheat improvement. *Israel Journal of Plant Sciences* 49(Supplement 1):25-36. DOI: [10.1092/JCMX-WGXM-D40G-BG4P](https://doi.org/10.1092/JCMX-WGXM-D40G-BG4P).
- Feldmann F, Boyle C. 1998. Concurrent development of arbuscular mycorrhizal colonization and powdery mildew infection on three *Begonia hiemalis* cultivars. *J of Plant Dis. Protec.*105(2): 121-129.
- Feldman M, Levy AA 2005. Allopolyploidy-a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenet Genome Res* 109 (1-3): 250-258. DOI: [10.1159/000082407](https://doi.org/10.1159/000082407).
- Fichman, Y., Miller, G. and Mittler, R. (2019) Whole-plant live imaging of reactive oxygen species. *Mol. Plant*, 12 (9) 1203– 1210. DOI: [10.1016/j.molp.2019.06.003](https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.003)
- Feldman M, Millet, E. 2001 The contribution of the discovery of wild emmer to an understanding wheat evolution and domestication to wheat improvement. *Israel Journal of Plant Sciences*, 49 pp. 25–35
- Feldman M, Levy AA. 2005. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and Genome Research*. 109: 1-3.
- Fiorilli V, Vannini C, Ortolani F, Carcia-Seco D, Chiapello M *et al.*, 2018. Omics approaches revealed how arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances yield and resistance to leaf pathogen in wheat. *Scientific Reports*.8: 9625.DOI:10.1038/s41598-018-27622-8 1.
- Flamini R, De Rosso M, De Marchi F, Dalla Vedova A, Panighel A, Gardiman M. *et al.* (2013). An innovative approach to grape metabolomics: Stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics*. 9, 1243-1253. doi:10.1007/s11306-013-0530-0.
- Flor HH.1971. Current Status of the gene for gene concept. *Annual Review of Phytothology*. 9: 275-296.
- Fobert PR, Desprès C. 2005. Redox control of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*.8 (4): 378-382.
- Fonseca S, Chini A, Hamburg M, Adie B, Porzel A, *et al.* 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*:1-7.
- Foyer CH, Trebst A, Noctor G.2005. Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate, and gluathione. *In* Photoprotection, Photoinhibition, *Gene regulation and Environment* Eds. 'Demmig-Adams A, Adams B & Mattoo W': 241-258.
- Fragnière C, Serrano M, Abou-Mansour E, Métraux JP, L'Haridon F. 2011. Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. *FEBS Letters*. 585: 1847- 1852. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.039>
- Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology*.7: 1250-1257.
- Fu Z, Dong X. 2013. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology* 64(1): 839-863.
- Fusconi A, Gnani A, Trotta A, Berta G. 199. Apical meristems of tomato roots and their modifications induced by arbuscular mycorrhizal and soilborne pathogenic fungi. *New Phytologist* 142 (3): 505-516.

Références bibliographiques

Figueroa M, Hammond-Kosack K.E., Solomon P.S. 2018. A review of wheat diseases-a field perspective Mol. Plant Pathol., 19 (6), pp. 1523-1536FRAC Pathogen Risk List 2019

FRAC Pathogen Risk List 2019

Fierens E, Gebruers K, Voet AR, De Maeyer M, Courtin CM, Delcour JA. Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2009 Jun;24(3):646-54. doi: 10.1080/14756360802321831. PMID: 18951281.

Fiorilli V, Catoni M, Francia D, Cardinale F, Lanfranco L. 2011.The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* 93: 237–242.

Fiorilli, V., Vannini, C., Ortolani, F., Garcia-Seco, D., Chiapello, M., Novero, M., et al. 2018. Omics approaches revealed how arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances yield and resistance to leaf pathogen in wheat. *Sci. Rep.* 8:9625. doi: 10.1038/s41598-018-27622-8.

Flamini R, De Rosso M, De Marchi F, Dalla Vedova A, Panighel A, Gardiman M. et al. 2013. An innovative approach to grape metabolomics : Stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics.* 9, 1243-1253. doi:10.1007/s11306-013-0530-0.

FRAC Pathogen Risk List 2019

Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjaer MF, Thordal-Christensen H, Pons-Kuehnemann J (2006) Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza* 16: 413–419.

G

Gaddour K, Vicente- Carbajosa J, Lara P, Isabel- Lamonedá I, Diaz P, Carbonero P. 2001. A constitutive cystatin-encoding gene from barley (Icy) responds differentially to abiotic stimuli. *Plant Molecular Biology* 45: 599–608, 2001.

Gális I., Gaquerel E., Pandey S.P. & Baldwin I.T. 2009. Molecular mechanisms underlying plant memory in JA-mediated defence responses. *Plant, Cell & Environment* 32, 617–627.

Gallego-Giraldo L, Posé S, Pattahil S, Peralta AG, Hahn MG, et al. 2018. Elicitors and defense gene induction in plants with altered lignin compositions. *New Phytologist.* 219: 1235-1251. <https://doi.org/10.1111/nph.15258>

Gallou A, Mosquera HL, Cranenbrouk S, Suaraz JP, Declerk S. 2011. Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76(1):20-26. DOI: [10.1016/j.pmpp.2011.06.005](https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.06.005).

Gao QM, Zhu S, Kachroo P, Kachroo A. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science.* 6:228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>.

Gao Y, Liu X, Stebbing JA, He D, Laroche A, Gauder D, Xing T. 2011. *TaFLRS*, a novel mitogen-activated protein kinase in wheat defense responses. *European Journal of Plant Pathology* 131: 643-651.

Garcia-Garrido JM, Ocampo JA. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal Experimental Botany.* 53: 1377-1386.

Références bibliographiques

- Garcia-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M. 1995. The defensive role of non specific lipid- transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* 3: 72-74.
- Garron C, Ernest B, Julien G, Losier R, Davis K. 2012. Concentrations and environmental risk of chlorothalonil in air near potato fields in Prince Edward Island. *Canada Pest Management Science.* 68: 92-100.
- Genre A., Chabaud M., Faccio A., Barker D. G., Bonfante P. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungus within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20 1407–1420. 10.1105/tpc.108.059014.
- Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P., Barker D. G. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17 3489–3499. 10.1105/tpc.105.035410
- Gernns H, von Alten H, Poehling HM .2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen – is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11 :237–243.
- Gianinazzi S, Martin C, Vallée JC. 1970. Hypersensibilité au virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanti* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *Comptes Rendus de L'Académie des Sciences-Paris* 270 : 2383-2386.
- Giese H, Hippe-Sanwald S, Sommerville S, Weller J. 1997. Erysiphe graminis. In Carool GC, Tudsynski P, eds. The mycota V Part B. Berlin, Germany: *Springer-Verlag*: 55-78.
- Gill RA, Zang L, Ali B, Farooq MA, Cui P, Yang S, Ali S, Zhou W. 2015. Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of Brassica napus L. *Chemosphere* 120: 154-164
- Glazebrook J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis--2001 status. *Biotic interactions*: 301-308. PMID: 11418339DOI: [10.1016/s1369-5266\(00\)00177-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00177-1)
- Glazebrook J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. 43:205–27.
- Gobbato E, Marsh JF, Vernié T, Wang E, Maillet F, Kim J, Miller JB, Sun J, Bano SA, Ratet P, Mysore KS, Dénarié J, Schultze M, Oldroyd GE. 2013.. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Current Biology.* 2012; 22:2236–2241. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.044.
- Göhre V, Robatzek S. 2008. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol.* 46: 189–215.
- Gomez S. K., Javot H., Deewatthanawong P., Torres-Jerez I., Tang Y., Blancaflor E. B., et al. (2009). *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biol.* 9:10.
- Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T. 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *The plant journal.* 18 (3): 277-284.
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, et al. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, 8: 629-643.

Références bibliographiques

- Gouws LM, Botes E, Wiese AJ, Trenkamp S, Torres-Jerez I *et al.*, 2012. The plant growth promoting substance, lumichrome, mimics starch, and ethylene-associated symbiotic responses in lotus and tomato roots. *Front. Plant Sci.*, 2 (120): 1-20.
| <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00120>
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, et al. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, American Phytopathological Society, 19 (7), pp.711-724.
- Grant M, Lamb C. 2006. Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol* 9 p. 414-420. 411
10.1016/j.pbi.2006.05.013.
- Green J R, Carver TLW, Gurr SJ. 2002. The formation and function of infection and feeding structures. Pages 66-82 *In: The Powdery Mildews-A Comprehensive Treatise*. R. R. Bélanger, W. Bushnell, A. J. Dik, and T. L. W. Carver, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, U.S.A.
- Green TR, Ryan CA. 1972. Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. *Science*. 175 (4023): 776-777.
- Gregersen PL, Thordal-Christensen H , Förster H, Collinge DB. 1997. Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* . *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 85–97.
- Gruner R, Strompen G, Pfitzner AJP. 2003. Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the *as-1*-like element of the *PR-1a* promoter.
- Guo Q, Li Y, Lou Y, Shi M, Jiang Y *et al.* 2019. *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 induces plant systemic resistance and improves rhizosphere microecology against tomato yellow leaf curl virus disease. *Applied Soil Biology*. 137: 154-166.
- Gupta RK, Chakrabarty SK. 2013. Gibberellic acid in plant. *Plant Signaling & Behavior*. 8: e2550.
- Guyomard H, 2009: Nourrir la planète de façon durable est possible à condition que..... *Politique Etrangère*. 2-2009. <https://www.cairn.info/revue-politique-etrangere-2009-2-page-291.htm>

H

- Hadwiger LA, Beckman JM. 1980. Chitosan as a component of Pea-*Fusarium solani* interaction. *Plant Physiol* 66:205–211
- Hafez YM, Soliman NK, Saber MM, Imbabi I, Abd-Elaziz AS. 2014. Induced Resistance against *Puccinia triticina*, the Causal Agent of Wheat Leaf Rust by Chemical Inducers. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 24: 173-181.
- Hammerschmidt R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55.
- Han X., Shen T. and Lou H., 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 8, pp 950-988.
- Harrison MJ. 2005. Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 59: 19-42.

Références bibliographiques

- Harley JL, Smith SE. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London New York
- Hayman DJ, Johnson AM, Ruddlesdin I (1975) The influence of phosphate and crop species on Endogone spores and vesicular-arbuscular mycorrhiza under field conditions. *Plant Soil* 43: 489–495
- Harrier LA, Watson CA. 2003. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Advanced Agronomy*. 20: 185-225.
- Harrier, L.A., Watson, C.A., 2004. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil borne pathogens in organic and/ or other sustainable farming systems. *Pest Management Science*. 60 (2): 149–157. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.820>.
- Helber N, Wippel K, Sauer N, Schaarschmidt S, Hause B, Requena N. 2011. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell*. 23: 3812-3823.
- Hemantaranjan A, Katiyar D, Singh B, Bhanu AN. 2014. A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. *Adv Plants Agric Res*. 2014;1(1):23-30. DOI: 10.15406/apar.2014.01.00006.
- Henry, G., Deleu, M., Jourdan, E., Thonart, P. and Ongena, M. 2011 The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cellular Microbiology*, 13(11):1824-1837.
- Henry R J, Rangan P, Furtado A. 2016. Functional cereals of production in new and variable climates. *Curr. Opin. Plant Biol*. 30, 11–18. doi: 10.1016/j.pbi.2015.12.008
- Hilker M, Schmölling T 2019. Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.13526>
- Hoagland DR, Arnon DI 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, *Circular* 347.
- Hofte M, Bakker PAH. 2007. Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Soil Biology*(12): 121-133
- Microbial Siderophores A. Varma, S.B. Chincholkar (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hong, J.K., Lee, S.C. and Hwang, B.K. 2005 Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Gene*, 356, 169–180
- Hongpattarakere T, Riyaphan O. 2008. Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 30 (2008), pp. 1-9.
- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O et Lu G. 2003. Over expression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol*. 133: 170-181.
- Humphreys CP, Peter JF, Rees M, Bidartondo MI, Leake JR, Beerling JI. 2010. Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communication*. Article Number: 103.
- Hurkman WJ, Tanaka CK. 1996. Germin Gene Expression Is Induced in Wheat Leaves by Powderly Mildew Infection. *Plant Physiol*. 111(3): 735-739.

I

Iriti M, Vitalini S, Di Tommaso G, D'Amico S, Borgo M, Faoro F. 2001. New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17: 263-269.

Iriti, M., Faoro, F. 2009. Chitosan as a MAMP, Searching for a PRR. *Plant Signaling Behav.* 4 (1), 66–68. doi: 10.4161/psb.4.1.7408

Ito M, Ichinose Y, Kato H, Shiraishi T, Yamada T. 1997. Molecular evolution and functional relevance of the chalcone synthase genes of pea. *Mol. Gen. Genet.* 255:28–37.

J

Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P *et al.* 2003. An *Arabidopsis thaliana* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation *Plant Cell*, 15 (11) (2003), pp. 2503-2513.

Jakobsen BI, Abbott LK, Ronson AD. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of P³² over defined distances. *New Phytologist*. (1992), 120, 509-516.

Jansa J, Sándor TF, Rozmoš M, Püschel D, Bukovská P, Hřelová H. 2019. Arbuscular mycorrhiza and soil organic nitrogen: network of players and interactions. Review in *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 6 (10): 1-10.

Jansa J, Gryndler M. 2010. Biotic Environment of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soil. In: Koltai H., Kapulnik Y. (eds) *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9489-6_10

Jansa J, Oberholzer H-R, Egli S. 2009. Environmental determinants of the arbuscular mycorrhizal fungal infectivity of Swiss agricultural soils. *Eur J Soil Biol* 45:400–408

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. *Separation Purification Technology* 104:175–182. Doi: 10.1016/j.seppur.2012.11.017.

Javot H, Pumplun N, Harrison MJ. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment* 30: 310-322.

Jensen A, & Jakobsen I. 1980. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in barley and wheat grown in some Danish soils with different fertilizer treatments. *Plant and Soil*, 55, 403.

Jeon Y J, & Kim S K. 2001. Effect of antimicrobial activity by chitosan oligosaccharides N-conjugated with asparagines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 281–286.

Jia X, Zeng H, Wang W, Zhang F, Yin H. 2018. Chitosan Oligosaccharide Induces Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis thaliana* by Activating Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Mediated Pathways. *Mol Plant Microbe Interact.* (12):1271-1279. doi: 10.1094/MPMI-03-18-0071-R.

Jia, X., Meng, Q., Zeng, H. *et al.* 2016. Chitosan oligosaccharide induces resistance to *Tobacco mosaic virus* in *Arabidopsis* via the salicylic acid-mediated signalling pathway. *SciRep* 6, 26144. <https://doi.org/10.1038/srep26144>

Références bibliographiques

Jiang J, Moore JAM, Priyadarshi A, Classen AT. 2017. Plant-mycorrhizal interactions mediate plant community coexistence by altering resource demand. *Ecology*. 98 (1): 187-197. <https://doi.org/10.1002/ecy.1630>.

Jogaiah S, Satapute P, De Britto S, Konappa N, Udayashankar AC. Exogenous priming of chitosan induces upregulation of phytohormones and resistance against cucumber powdery mildew disease is correlated with localized biosynthesis of defense enzymes. *Int J Biol Macromol*. 2020

Jones JD, Dangl JL. 2006. The Plant immune system. *Nature* 444(7117):323-9. DOI: [10.1038/nature05286](https://doi.org/10.1038/nature05286).

Jones R, Formulating New Options. 2000 in Fruit Grower, Meister Publications, Boston, USA

Jourdan E, Ongena M, Thonart P. 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 12(4)

Jung HW, Tschapinski TJ, Wang L, Glazerbrook J, Greeberg JT. 2009. Priming in systemic plant immunity. *Science* 324: 89–91.

Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ. 2012 Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *J. Chem. Ecol* 38: 651–64.

K

Kadam SB, Pable AA, Barvkar VT. 2020. Mycorrhiza induced resistance (MIR): a defence developed through synergistic engagement of phytohormones, metabolites and rhizosphere. *Funct. Plant Biology*. 47(10):880-890.

Kamoun S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Rev. Phytopathol*. 44, 41–60.

Kauss, H., Jeblick, W., & Domard, A. (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 178(3), 385-392. Retrieved February 15, 2021, from <http://www.jstor.org/stable/23379849>

Kazan K. 2006. Negative regulation of defence and stress genes by EAR-motif-containing repressors. *Trends Plant Science*.11:109–12.

Kenrick P, Strullu-Derrien C. 2014. The Origin and Early Evolution of Roots. *Plant Physiology* 166(2).DOI: [10.1104/pp.114.244517](https://doi.org/10.1104/pp.114.244517).

Kerby K and Somerville S. 1989. Enhancement of Specific Intercellular Peroxidases Following Inoculation of Barley with *Erysiphe graminis* sp. *Hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 35:323–337.

Khaosaad T, et al. Take-all disease is systemically reduced in roots of mycorrhizal barley plants. *Soil Biology & Biochemistry* 2007; 39:727–734.

Kheiri S.A, Moosawi Jorf A.H., Malhipour S., Nikkhah. 2016. M. Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of Fusarium head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) *in vitro* and greenhouse. *Int. Journal of Biological Macromolecules*. 93(A): 1261-1272.

Références bibliographiques

Khong NG, Randoux B, Deravel J, Tisserant B, Tayeh Ch, Coutte F, Bourdon N, Jacques P, Reignault P. 2013. Induction of resistance in wheat by bacterial cyclic lipopeptides. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 78(3):479-87.

Kim B.S, Lee J.Y, Hwang B.K. 2000. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Management Science.* 56, 1029–1035.

Kim DS, Hwang BK. 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial 884 pathogens. *Journal of Experimental Botany.* 65(9):2295–2306.

Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus irregularis* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology.*21: 1204-1209

Kobae Y, Hata S. 2010. Dynamics of Periarbuscular Membranes Visualized with a Fluorescent Phosphate Transporter in Arbuscular Mycorrhizal Roots of Rice. *Plant and Cell Physiology* 51(3):341-53. DOI: [10.1093/pcp/pcq013](https://doi.org/10.1093/pcp/pcq013).

Koers S, Guzel-Deger A, Marten I, Rob M, Roelfsema G. 2011. Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels *The Plant Journal.* 68 (4): 670-680. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04719.x> .

Kombrink E, Schmelzer E. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107: 69-78.

Kour D, Rana KL, Kaur T, Sheikh I, Yadav AN. *et al.* 2020. Microbe - mediated alleviation of drought stress and acquisition of phosphorus in great millet (*Sorghum bicolor* L.) by drought - adaptive and phosphorus - solubilizing microbes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 23.101501.

Krauss M, Singer H, Hollender J. 2010. LC-high resolution MS in environmental analysis: From target screening to the identification of unknowns. *Analytica l& Bioanalytical Chemistry.* 397, 943-951. doi:10.1007/s00216-010-3608-9.

L

Larsen J, Yohalem D. 2004. Interactions between mycorrhiza and powdery mildew of cucumber. *MycologicalProgress* 3: 123–128.

Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothsein S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 84: 7542-7546.

Laluk K, Mengiste T. 2010. Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? *Arabidopsis book.* 8: e0136. doi: [10.1199/tab.0136](https://doi.org/10.1199/tab.0136).

Lamb C, Dixon R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol* 48: 251-275.

Larsen J, Yohalem D. 2004. Interactions between mycorrhiza and powdery mildew of cucumber. *Mycological Progress* 3: 123-128.

Lazniewska, J. and Macioszek, V.K.2010.Fight to the death: Arabidopsis thaliana defense response to fungal necrotrophic pathogens. *Acta Physiol. Plant.* 32, 1–10.

Le Souder C, Mazieres C, Rodes V. 1998.AGRESTE – LES CAHIERS, N°30.

Références bibliographiques

- Leake JR, Johnson D, Donnelly DP, Muckle GE, Boddy L, Read DJ. 2004. Network of power and influence the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agrosystem functioning. *Canadian Journal of Botany* 8: 1016-1045.
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez J-S, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M, Jacques P. 2005. Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4577–4584.
- Lee CS, Lee YJ, Jeun YC. 2005. Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pretreated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Pathology journal* 21: 237-243.
- León D, Vahter T, Zobel M, Koppel M., Edesi L, Davison J, Al-Quraishy S, Hozzein W. N., Moora M, Oja J, Vasar M, & Öpik M. 2020. Different wheat cultivars exhibit variable responses to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi from organic and conventional farms. *PloS one*, 15(5), e0233878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233878>.
- Leon-Reyes, A, Spoel, S.H. , De Lange, E.S. , Abe, H. , Kobayashi, M. , Tsuda, S. et al .2009. Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol.* 149, 1797–1809.
- Leonie H, Luginbueh l, Guillaume NM, Kurup S, Van Erp H *et al.*, 2017. Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*. 356 (343): 1175-1178 DOI: 10.1126/science.aan0081.
- Lepoivre P. 2003. Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondement de stratégies de lutte. De Boeck Université. Les presses agronomiques de Gembloux, Bruxelles 432p.
- Leuba JL, Stössel P.1986. Chitosan and other polyamines: Anti-fungal activity and interaction with biological membranes. In: Muzzarelli RAA, Jeuniaux C, Gooday GW, editors. *Chitin in Nature and Technology*. Plenum Press; New York, NY, USA: pp. 215–222
- Lewis DH.1973. Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biological Reviews*. 48 (2): 261-267.
- Li HE, Fisher R Liao YC. 2001. Molecular evidence for induction of phenylalanine ammonia-lyase during *Puccinia graminis* infection and elicitation in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 286-291.
- Li H, Smith S E, Hilliway R E, Ahu Y Smi FE. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist*. 172 (3). 536-543.
- Li XY, Gao L, Zhang WH, Liu JK, Zhang YJ, Wang HY, Liu DQ. 2015. Characteristic expression of wheat PR5 gene in response to infection by the leaf rust pathogen, *Puccinia triticina*. *Journal of Plant Interactions*. 10(1): 132-141.
- Li Y, Liu Z, Hou H, Lei H, Zhu X, Li X, He X, Tian C. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi-enhance resistance against *Phytophthora sojae* infection on soybean leaves is mediated by a network involving hydrogen peroxide, jasmonic acid, and the metabolism of carbon and nitrogen. *Acta Physiol Plant* 35: 3465– 3475.

Références bibliographiques

- Li Y, Yanagi A, Miyawaki Y, Okada T, Matsubara Yi. 2010. Disease tolerance and changes in antioxidative abilities in mycorrhizal strawberry plants. *J. Japanes Society for Horticultural Science*. 79: 174-178.
- Li Z, Zhao C, Zhao X, Xia Y, Sun X, Xie W, Ye Y, Lu X, Xu G. 2018. Deep annotation of hydroxycinnamic acid amides in plants based on ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and its in silico database. *Analytical Chemistry*.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology*. 148:350–382
- Limpens E, van Zeijl A, Geurts R. (2015). Lipochitoooligosaccharides modulate plant host immunity to enable endosymbioses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53 311–334. 10.1146/annurev-phyto-080614-120149.
- Lincoln JE, Sanchez JP, Zumstein K, Gilchrist DG. 2018. Plant and animal PR1 family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. *Molecular Plant Pathology* 19:2111–2123. doi: 10.1111/mpp.12685.
- Liu G, Hou CY, Wang DM. 2010. Calcium influx is required for the initiation of the hypersensitive response of *Triticum aestivum* to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Physiology Molecular Plant Pathology*. 74: 267-273.
- Liu H, Tian WX, Li B, Wu GX, Ibrahim M, Tao ZY, Wang YL, Xie GL, Li HY, Soleil GC.2012. Effet antifongique et mécanisme du chitosane contre le pathogène de la brûlure de la gaine du riz, *Rhizoctonia solani*. *Biotechnol. Lett.* 34: 2291-2298
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ .2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant Journal* 50: 529-544.
- Liu L, Sonbol FM, Huot B, Gu Y, Withers J, Mwimba M, Yao JJ, He SY, Dong X. 2016. Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat Commun* 7: 133099.
- Liu Q, Luo L, Zheng L. 2018. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *International Journal Molecular Sciences* 19 (2): 335.
- Lo Presti L, Kahmann R. 2017. How filamentous plant pathogen effectors are translocated to host cells. *Current Opinion in Plant Biology* 38, 19-24. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.005.
- Lo Presti L, Zechmann B, Kumlehn J , Liang L, Lanver D *et al.* 2017. An assay for entry of secreted fungal effectors into plant cells. *New Phytologist*. 213(2):956-964. doi: 10.1111/nph.14188.
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* 66: 513– 545.
- Lopez-Moya F, Suarez-Fernandez M, Lopez-Llorca VL. 2019. Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants. *International J. Molecular Science* 20(2),332; <https://doi.org/10.3390/ijms20020332>.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265-275.

Références bibliographiques

Lu, S., Faris, J. D., Sherwood, R., Friesen, T. L., & Edwards, M. C. 2014. A dimeric PR-1-type pathogenesis-related protein interacts with ToxA and potentially mediates ToxA-induced necrosis in sensitive wheat. *Molecular plant pathology*, 15(7), 650–663. <https://doi.org/10.1111/mpp.12122>

Lu, S, Friesen, T.L. and Faris, J.D.2011.Molecular characterization and genomic mapping of the pathogenesis-related protein 1 (PR-1) gene family in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Genet. Genomics*, 285, 485–503.

Luginbuehl L H, Menard G N, Kurup S, Van-Erp H, Radhakrishnan G V, Breakspear A, Oldroyd, G E D, Eastmond P J 2017. Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science - AAAS*. 356 (6343), pp. 1175-1178. <https://doi.org/10.1126/science.aan0081>

Luzuriaga-Loaiza P., Schellenberger R., De Gaetano Y., Obounou Akong F., Villaume S., Crouzet J. *et al.* 2018. Synthetic Rhamnolipid bolafoms trigger an innate immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*. 8:8534.

M

Ma Q, Zhao X M, Sun H, Shang HS. 2011. Ultrastructural Study on Induced Resistance of Cucumber Plants against *Sphaerotheca fuliginea* by Oligochitosan. *Plant Pathology Journal* 27: 8-13.

Maldonado-Bonilla L. D., Betancourt-Jiménez M., Lozoya-Gloria E. (2008). Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *Eur. J. Plant Pathol.* 121 439–449.

Manjunatha G, Roopa KS, Geetha NP, Shetty HS. 2008. Chitosan enhances disease resistance in pearl millet against downy mildew caused by *Sclerospora graminicola* and defense-related enzyme activation. *Pest Management Science*. 1250-1257.

Matsubara Y, Harada T, Yakuwa T. 1995. Effect of inoculation density of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores and addition of carbonized material to bed soil on growth of welsh onion seedlings. *J. Japanese Society Horticulture Science*. 64: 549-554.

Matsuoka Y. 2011.Evolution of Polyploid *Triticum* Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant and Cell Physiology*, Volume 52, Issue 5, May 2011, Pages 750–764, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr018>.

Mcgonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA. 1990. A method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscularmycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 115: 495–501.

Melchers LS, Apotheker-de Groot M, Van der, Knap JA, Ponstein AS. *et al.* 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant Journal* 5: 469-480.

Mejri S., Siah A, Coutte F, Magnin-Robert M, Randoux B, Tisserant B, Krier, Jacques J, Reignault R, Halama P 2018. Biocontrol Of The Wheat Pathogen *Zymoseptoria Tritici* Using Cyclic Lipopeptides From *Bacillus Subtilis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 29822-29833.

Mendgen K, Hahn M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 2002; 7:352–356.

Références bibliographiques

- Mendoza M. 2011. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. *Biotechnologia Vegetal*. 11(2): 67-75.
- Mersmann S, Bourdais G, Rietz S, Robatzek S. 2010. Ethylene signalling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology Preview*. DOI:10.1104/pp.110.154567 American Society of Plant Biologists.
- Metraux JP, Streit L, Stauh T. 1988. A pathogenesis-related protein in cucumber chitinase. *Physiol Mol Plant Pathol*. 33:1-9.
- Miller R.L & Jackson L.E. 1998. Survey of vesicular-arbuscular mycorrhizae in lettuce production in relation to management and soil factors. *J. Agric. Sci. Camb.*, 130, pp. 173-182
- Miozzi L, Vaira AM, Catoni M, Fiorilli V, Accotto GP, Lanfranco L. 2019. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Plant Friend or Foe in the Fight Against Viruses? *Frontiers in Microbiology* 10:1238. doi: 10.3389/fmicb.2019.01238.
- Miozzi L., Catoni M., Fiorilli V., Mullineaux P. M., Accotto G. P., Lanfranco L. 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis limits foliar transcriptional responses to viral infection and favors long-term virus accumulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24 1562–1572. 10.
- Mitchell HJ, Hall J, Barber MS. 1994. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Plant Physiology*. 104: 551–556.
- Mitsuhashi I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigashi H, Hirose S, *et al.* 2008. Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetic & Genomics* 279: 415–427.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405–410.
- Mohammadi M, Kazemi H. 2002. Changes in Peroxidase and Polyphenol Activity in Susceptible and Resistant Wheat Heads Inoculated with *Fusarium graminearum* and Induced Resistance. *Plant Science*. 162:491–498.
- Mohanta TK, Bae A. 2015. Functional Genomics and Signaling Events in Mycorrhizal Symbiosis. *Journal of Plant Interactions* 10(1).
- Molinari, S., Fanelli, E. & Leonetti, P. 2014. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in Mi-1-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology* 15, 255-264. DOI: 10.1111/mpp.12085
- Moller IM. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:561–591.
- Monnier N, Furlan A, Botcazon C, Dahi A, Mongelard G, Cordelier S, Clément C, Dorey S, Sarazin C et Rippa S. 2018. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* Are Elicitors Triggering *Brassica napus* Protection Against *Botrytis cinerea* Without Physiological Disorders. *Devant. Plant Sci.* 9: 1170. doi : 10.3389 / fpls.2018.01170
- Monnier N, Furlan AL, Buchoux S, Deleu M, Dauchez M, Rippa S, Sarazin C. 2019. Exploring the Dual Interaction of Natural Rhamnolipids with Plant and Fungal Biomimetic Plasma Membranes through Biophysical Studies. *Int J Mol Sci.*

Références bibliographiques

Morton JB. 2000. Evolution of endophytism in arbuscular mycorrhizal fungi of Glomales. *In*: Bacon CW, White JH (eds) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 121–140.

Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T. 2009 Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. Aug;230(3):517-27.

Mustafa G, Khong NG, Tisserant B, Randoux B, Fontaine J, Magnin-Robert M, Reignault Ph, Lounès-Hadj Sahraoui A 2017 Defence mechanisms associated with mycorrhiza-induced resistance in wheat against powdery mildew. *Funct Plant Biol* 44:443–454. <https://doi.org/10.1071/FP16206>

Mustafa G, Randoux B, Tisserant B, Fontaine J, Magnin-Robert M, Lounès-Hadj Sahraoui A, Reignault Ph. 2016. Phosphorus supply, arbuscular mycorrhizal fungal species, and plant genotype impact on the protective efficacy of mycorrhizal inoculation against wheat powdery mildew. *Mycorrhiza* 26:685-697.

Muzzarelli R., Tarsi R., Filippini O., Giovanetti E., Biagini G., & Varaldo P. E. 1990. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(10), 2019–2023. <https://doi.org/10.1128/aac.34.10.2019>.

N

Nagae M, Parniske M, Kawagushi M, Takeda N. 2016. The relationship between thiamine and two symbioses: Root nodule symbiosis and arbuscular mycorrhiza. *Plant Signal & Behavior*. 11(12): e1265723.. doi: [10.1080/15592324.2016.1265723](https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1265723).

Nandeeshkumar P, Sudisha J, Ramachandra K K, Prakash H S, Niranjana SR, Shekar S H. 2008. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72: 188-194.

Nawrath C, Métraux JP. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*. 11(8): 1393-404.

Nemri A, Saunders DGO, Anderson C, Upadhyaya NM, Win J, Lawrence GJ, Jones DA, Kamoun S, Ellis JG, Dodds PN. 2014. The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. *Frontiers in Plant Science* 5: 98.

Neuhaus JM, Fritig B, Linhorst HJM, Meins F, Jr, Mikkelsen JD, Ryals J. A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1996; 14:102–104.

Newmann mA, Sundelin T, Nielson JT, Erbs G. 2013. MAMP (microbe-associated molecule pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci*. 16 (4): 139.

Nguyen TN, Son S, Jordan MC, Levin DB, Ayele BT. 2016 Lignin biosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): its response to waterlogging and association with hormonal levels. *BMC Plant Biol*. 2016 Jan 25; 16:28. doi: [10.1186/s12870-016-0717-4](https://doi.org/10.1186/s12870-016-0717-4). PMID:

Nicholson RL, Hammerschmitt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of phytopathology* 30: 369-389.

Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198(1):249-66.

O

OCDE. 2016. Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2016-2025.

Oehl F., Wiemken A., Sieverding E. 2003. *Glomus aureum*, a new sporocarpic species in the Glomales from European grasslands. *Journal of Applied Botany* 77: 111–115.

Okan Acar , Cüneyt Aki and Hüseyin Erduğan Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Sciences and Arts, Department of Biology, 17020 Çanakkale, Turkey. file:///C:/Users/Nour/Downloads/F_27_161_Original_Paper_pp797_802.pdf

Ökmen B, Doehlemann G. 2014. Inside plant: Biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Current Opinion Plant Biology* 20: 19–25.

Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 2000 Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 42: 479–488.

Oldach KH, Becker D, Lörz H. 2001. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol Plant Microbe Interact.* 14(7): 832–8

Oliva R, Win J, Raffaele S, Boutemy L, Bozkurt T O, Chaparro-Garcia A, Segretin M E, Stam R, Schornack S, Cano LM, *et al.* 2010. Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* 12, 705–715.

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

Orozco-Cardenas M, Ryan CA.1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (1999), pp. 6533-6557

Ors M E, Randoux B, Selim S, Siah A, Couleaud G, Maumené C, Sahmer K, Halama P, Reignault P. 2017. Cultivar-dependent partial resistance and associated defence mechanisms in wheat against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathol.* 67:561-572. <https://doi.org/10.1111/ppa.12760>.

Ors M, Randoux B, Siah A, Couleaud G, Maumené C, Sahmer K, Reignault P, Halama P, Selim S. 2019. A Plant Nutrient- and Microbial Protein-Based Resistance Inducer Elicits Wheat Cultivar-Dependent Resistance Against *Zymoseptoria tritici*. *Phytopathology*.109(12):2033-2045. doi: 10.1094/PHYTO-03-19-0075-R.

Ors M, Siah A, Randoux B, Selim S, Couleaud G, Maumené C, Reignault P, Halama P. 2013. Cultivar-dependent efficacy and mode of action of plant resistance inducers in wheat against *Septoria tritici* leaf blotch. *In 6th meeting of the International Organization for Biological and Integrated Control.* 333-338.

Ors, M. E., Randoux, B., Selim, S., Siah, A., Couleaud, G., Maumené, C., Sahmer, K., Halama, P., and Reignault, P. 2017. Cultivar-dependent partial resistance and associated defence mechanisms in wheat against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathol.* 67:561- 572. <https://doi.org/10.1111/ppa.12760>.

Références bibliographiques

Orzali L, Forni C, Riccioni L. 2014 Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Seed Sci. Technol.* 42:132–149.

Oliva R, Win J, Raffaele S, Boutemy L, Bozkurt T O, Chaparro-Garcia A, Segretin M E, Stam R, Schornack S, Cano LM, *et al.* 2010. Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* 12, 705–715.

Jourdan, E., Ongena, M. et Thonart, P. 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 12(4):437-449

Owen D, Williams AP, Griffith GH, Withers PJA. 2015. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied of soil Ecology* 86: 41-54.

Ökmen B, and Doehlemann G. 2014. Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 19–25

P

Pan HY, Whittaker MM, Bouveret R, Berna A, Bernier F, Whittaker JW. 2007. Characterization of wheat germin (oxalate oxidase) expressed by *Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 356(4):925-929

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss 982 army knife. *Plant cell reports.* 24:255–65

Passardi F, Penel C, Dunand C. 2004. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* 9:534–40.

Patkar RN, Chattoo BB. 2006. Transgenic indica Rice Expressing ns-LTP-Like Protein Shows Enhanced Resistance to Both Fungal and Bacterial Pathogens. *Mol Breeding* 17, 159–171. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-4736-3>.

Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, *et al.* 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464:788–91.

Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M. 1994. Phenylalanine ammonia lyase in tobacco. (Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor). *Plant Physiology* 106: 877–886.

Pellegrino E, Öpik M, Bonari E, Ercoli L. 2015. Responses of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of field studies from 1975 to 2013. *Soil Biology & Biochemistry.* 84: 210-217.

Per TS, Fatma M, Asgher M, Javied S, Khan NA. 2017. Salicylic Acid and Nutrients Interplay in Abiotic Stress Tolerance. *Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone.* 221-237.

Perazzolli M, Dagostin S, Ferrari A, Elad Y, Pertot I, 2008. Induction Of Systemic Resistance Against *Plasmopara Viticola* In Grapevine By *Trichoderma Harzianum* T39 And Benzothiadiazole. *Biological Control* 47, 228–34.

Petit, Y. (2017). Comprendre l'implication des effecteurs fongiques dans l'infection d'une plante hôte: caractérisation fonctionnelle d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans*, un champignon pathogène du colza. Thèse de doctorat. Université Paris Sacley. 259 pp.

Références bibliographiques

- Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S. Analyse à l'échelle du génome des protéines de type thaumatine eucaryote (TLP) avec un accent sur le peuplier. *Biologie végétale BMC*. 2011; 11: 33–48. pmid: 21324123.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*.55: 158–161.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308-316.
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev. Biol* 28: 489-521.
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakke PAHM. 2014. Induced Systemic Resistance by beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol* 52: 347-75.
- Pieterse, C.M.J.; Van Wees, S.C.M.; Van Pelt, J.A.; Knoester, M.; Laan, R.; Gerrits, H.; Weisbeek, P.J.; Van Loon, L.C. .1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571–1580
- Pieterse, C.M.J, Jurrian T, Van Loon, L.C.2000. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? *AgBiotechNet*, Vol. 3
- Pineda A, Zheng SJ, van Loon JJA, Pieterse CMJ, Dicke M. 2010. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends Plant Sci* 15: 507-514.
- Pinochet J, Calvet C, Camprubi A and Fernandez C 1996 Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops: A review. *Plant Soil* 185, 183-190.
- Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougél C, Lemanceau P, Berta G. 2008. Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*: 1-10. DOI 10.1007/s00572-008-0205-2
- Platel R, Chaveriat L, Le Guenic S, Pipeleers R, Magnin-Robert M, Randoux B, et al. 2020. Importance of the C12 Carbon Chain in the Biological Activity of Rhamnolipids Conferring Protection in Wheat against *Zymoseptoria tritici*. *Molecules* 26 (1). <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/1/40>
- Plett JM, Kemppainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biol* 21: 1197-203.
- Polle A, Otter T, Seifert F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology* 106: 53–60.
- Pozo MJ, Azcon-Aguilar C. 2007. Unravelling mycorrhiza induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol* 10:1-6
- Pozo MJ, Azcon-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barca JM. 1999. β -1, 3- glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involment in bioprotection. *Plant Sci*. 141: 149-157.

Références bibliographiques

Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcón-Aguilar C. 2002. Localized vs systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 525 – 534.

Pozo MJ, Jung SC, Martinez -Medina A, Lopez-Raz JA, Azcon-Aguilar C, Brea JM. 2013. Root Allies: Arbuscular Mycorrhizal fungi Help Plants to Cope with Biotic Stresses. R. Aroca (ed) *Symbiotic Endophytes, Soil Biology* pp37.

Pryce-Jones, E., Carver, T., and Gurr, S. J. 1999. The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:175-182.

R

Rabbinge R., Jorrietsma ITM, Schans J. 1985. Damage components powdery mildew in winter Wheat. *Netherlands J. Plant Pathology.* 91: 235-247

Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W .2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4:1457–1465. doi:10.1021/bm034130m

Rahman MH, Hjeljord LG, Aam BB, *et al.* 2015. Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *Eur J Plant Pathol* 141, 147–158.

Rajtor M, Piotrowska-Seget Z. 2016. Prospects for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to assist in phytoremediation of soil hydrocarbon contaminants. *Chemosphere* 162, 105–116. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.071.

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 Defenses by Milsana. *Phytopathology.* 96: 1278–1286.

Read DJ, Perez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey towards relevance? *New Phytologist* 157: 475-492. DOI: [10.1046/j.1469-8137.2003.00704.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00704.x)

Reddy KS, KhanM Y, Archana K, Reddy MG, Hameeda B. 2016. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent. *Bioresour. Technol.*, 221, pp. 291-299,

Redecker C, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JP, Walker C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromyota). *Mycorrhiza* 23(7). . DOI: [10.1007/s00572-013-0486-y](https://doi.org/10.1007/s00572-013-0486-y).

Redecker D, Kodner R, Knaham LE. 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289(5486):1920-1. DOI: [10.1126/science.289.5486.1920](https://doi.org/10.1126/science.289.5486.1920)

Reignault P, Sancholle M. 2005. Plant-pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? *Comptes Rendus Biologies.* 328(9): 821-833.

Reignault Ph, Cogan A, Muchembled J, Lounes-Hadj Sahraoui A, Durand R, Sancholle M. 2001. Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist.* 149:519-529.

Références bibliographiques

- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994. 400-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae (VAM). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(25):11841-3. DOI: [10.1073/pnas.91.25.11841](https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.11841).
- Rich MK, Nouri E, Courty PE, Reinhardt D. 2017. Diet of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Bread and Butter? *Trends in Plant Science* 22(8): DOI: [10.1016/j.tplants.2017.05.008](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.05.008).
- Ritter L, Goushoeff NCI, Arbuckle T, Cole D, Raizenne M. 2006. Addressing the linkage between exposure to pesticides and human health effects- Research trends and priorities for esearch. *Journal of toxicology and Environmental Health. Part B: Critical Review*9: 441-456.
- Robineau M, Le Guenic S, Sanchez L, Chaveriat L, Lequart V, Joly N, Calonne M, Jacquard C, Declerck S, Martin P, Dorey S, Ait Barka E. 2020 Synthetic Mono-Rhamnolipids Display Direct Antifungal Effects and Trigger an Innate Immune Response in Tomato against. *Molecules* (Basel, Switzerland). 25.
- Romera FJ, Garcia MJ, Lucena C, Martinez-Medina A, Aparicio MA, Roma J, Alcantara E, Angulo M, Pérez-Vicente R. 2019. Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe Deficiency Responses in Dicot Plants. *Front Plant Sci* <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2019.00287>
- Roth R, Paszkowski U. 2017. Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion Plant Biology*. 39:50-56. doi: [10.1016/j.pbi.2017.05.008](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.008).
- Rouphael Y, Frunken P, Scheneider C, Schwarz D, Giovannetti M *et al.*, 2015a. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 196 :91-108. DOI: [10.1016/j.scienta.2015.09.002](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.002).
- Rouphael Y, Cardarelli M, Colla G. 2015b. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating the adverse effects of acidity and aluminium toxicity in zucchini squash. *Scientia Horticulturae*. 188: 97-105.
- Ryals J A, Neuschwander U M, Willitis M G, Molina A, Steiner H, Hunt M O. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8 (1996), pp. 1809-1819.
- Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner H.-Y, Johnson J, Delaney, TP, Jesse, T, Vos P, Uknes S. 1997. The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. *Plant Cell* 9: 425–439.

S

- Sadana B. 2014. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) as a Biofertilizer- a Review. *Inter Joournal of Current Microbiology and Applied Sciences*.3 (4): 380-400.
- Samuel W W, Magerøy M H, López Sánchez A, Smith LM, Furci LT E *et al.* 2019.Surviving in a Hostile World: Plant Strategies to Resist Pests and Diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 57:505-529 <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-095959>
- Sanchez L., Courteaux B, Hubert J, Kauffmann S, Renault J.H; ClémentC, Baillieul F, Dorey S. 2012. Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant. Physiol* , 160, 1630–1641.
- Sanchez-Bel P., Troncho P., Gamir J., Pozo M. J., Camañes G., Cerezo M., *et al.* 2016. The nitrogen availability interferes with mycorrhiza-induced resistance against *Botrytis cinerea* in Tomato. *Front. Microbiol.* 7:1598.

Références bibliographiques

- Sanchez-Vallet A, Lopez G., Ramos B, Delgado-Cerezo M, Llorente F, Fernandez PV *et al.*, 2012. Disruption of abscisic acid signaling constitutively activates *Aradiopsis* resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiol.* 160:2109-2124
- Schaarschmidt S, Gonzalez MC, Roitsch T, Strack D, Sonnewald U, Hause B. 2007. Regulation of Arbuscular Mycorrhization by Carbon. The Symbiotic Interaction Cannot Be Improved by Increased Carbon Availability Accomplished by Root-Specifically Enhanced Invertase Activity. *Plant Physiology.* 143(4): 1827–1840. doi: [10.1104/pp.106.096446](https://doi.org/10.1104/pp.106.096446)
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols.* 3: 11.1-1108.
- Schüßler A, Walker C 2011. Evolution of the 'Plant-Symbiotic' Fungal Phylum, Glomeromycota. In S. Pöggeler, J. Wöstemeyer Ed 1st. "Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms". 164-185.
- Schüßler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D. 2006. Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* 444: 933– 936. Schmittgen T.D, and Livak, K. J (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *NatProtoc.*, 3: 11.1-1108
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins : a focus on PR peptidases. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 941-950.
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Huang I, Lee JS, Choi YD. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 98 (8): 4788-93.
- Seybold H, Demetrowitsch TJ, Hassani MA, Szymczak S, Reim E, Haueisen J, Lübbers L, Rühlemann M, Franke A, Schwarz K, Stukenbrock EH. 2020. A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nature Communications.* 11(1):1910. doi: [10.1038/s41467-020-15633-x](https://doi.org/10.1038/s41467-020-15633-x).
- Sha R, Jiang L, Meng Q, Zhang G, Song Z. 2012. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. *J. Basic Microbiol.*, 52 (4) pp. 458-466
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG. 1995. Partitioning of intermediate carbon metabolism in VAM colonized leek. *Plant Physiol* 108:7–15.
- Shah k, Liu Y, Deirmengian C, Shokat KM. 1997. Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3565–3570.
- Sharathchandra RG, Niranjana Raj S, Shetty N P, Amruthesh KN, Shekar Shetty H. 2004. A chitosan formulation Elexa induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection* 23:881-888.
- Sharma P, Jha AP, Dubey RS, Pessarakli M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany.* ID 217037, 26 p. doi:[10.1155/2012/217037](https://doi.org/10.1155/2012/217037).
- Shaul O, Galili S, Volpin H, Ginzberg II, Ylad Y *et al.* 1999. Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Mol Plant Microbe Interact.* 12(11):1000-7. doi: [10.1094/MPMI.1999.12.11.1000](https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.11.1000).

Références bibliographiques

- Shetty NP, Jensen JD, Knudsen A, Finnie C, Geshi N *et al.* 2009. Effects of beta-1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *J. Exp. Bot.* 60(15):4287- 300. doi: 10.1093/jxb/erp269.
- Shewry PR. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60 (6): 15371553, <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>
- Shin S, Mackintosh CA, Lewiw J, Heinen SJ, Radmer L, Dill-Macky R, Baldrige GD, Zeyen RJ, Muehlbauer GJ. 2008. Transgenic wheat expression a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *Journal Experimental Botany*. 59 (9): 2371-2378
- Shinya T, Nakagawa T , Kaku H, and Shibuya N. 2015 Chitin-mediated plant-fungal interactions: catching, hiding and handshaking. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 64–71.
- Shrinkhala M. 2011. Study on the bioprotective effect of endomycorrhizae against *M. graminicola* in rice. Thèse Seutin
- Siah A, Magnin-Robert M, Randoux B, Choma C, Rivière C, Halama P, Reignault P. 2018. Naturel Agents Inducing Plant Resistance Against Pests and Disease. *Natural Antimicrobial Agents*. 121-159.
- Siaso E, Standing D, Kilham K, Johnsen D. 2009. Mycorrhizal fungi increase biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry* 41(6):1341-1343.
- Sikes BA. 2010. When do arbuscular mycorrhizal fungi protect plant roots from pathogens? *Plant Signal. Behav.* 5 763–765.
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 363: 67–69.
- Singh A K, Rai A, Pandey V, Singh N. 2017. Contribution of glomalin to dissolve organic carbon under different land uses and seasonality in dry tropics. *Journal of Environmental Management* 192: 142-149.
- Singh DP, Sharma AK, Sharma INDU, Sing D, Rana SK *et al.* 2016. Identification of resistance sources against powdery mildew (*Blumeria graminis*) of wheat. *Indian Phytopathology* 69 (4) : 413-415.
- Singh I., Giri B. 2017. “Arbuscular mycorrhiza mediated control of plant pathogens” in *Mycorrhiza - Nutrient uptake, biocontrol, eco restoration*. eds. Varma A., Prasad R., Tuteja N. (Cham: Springer International Publishing;), 131–160.
- Smith JA, Metraux JP. 1991. *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* induces systemic resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.39, p.451-461, 1991.
- Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3rd Edition, Academic Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1016/B978-012652840-4/50001-2>.
- Smith SE et Read DJ, 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Second Edition Academic Press
- Sofi MN, Bhat RA, Rashid A, Mir Na, Mir S. 2017. Rhizosphere Mycorrhizae Communities an Input for Organic Agriculture. In *Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Eco restoration*:387-413. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68867-1>.

Références bibliographiques

- Somssich I.E, Schmelzer E, Bollmann. J, Hahlbrock K.1986.Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis- related” proteins in cultured parsley cells Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83, pp. 2427-2430
- Song Y, Chen D, Lu K, Sun Z, Zeng R.2015.Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Front Plant Sci*.
- Song Y. Y., Ye M., Li C. Y., Wang R. L., Wei X. C., Luo S. M., et al. 2013. Priming of anti-herbivore defense in tomato by arbuscular mycorrhizal fungus and involvement of the jasmonate pathway. *J. Chem. Ecol.* 39 1036–1044.
- Song Y., Chen D., Lu K., Sun Z., Zeng R. (2015). Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Front. Plant Sci.* 6:786.
- Sood SG. 2003.Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiology Ecology*,45 (3): 219- 227, [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00155-7).
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME *et al.* 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SM, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CM. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760-770.
- Srivastava A C, Das Gupta K, Ajieren E, Costilla G, McGarry Rc, Ayere BG 2009. *Arabidopsis* plants harbouring a mutation in *AtSUC2*, encoding the predominant sucrose/proton symporter necessary for efficient phloem transport, are able to complete their life cycle and produce viable seed. *Ann. Bot.* 104(6): 1121–1128
- Statista, 2020. <https://fr.statista.com/statistiques/570403/ble-volume-de-production-dans-le-monde/>
- Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux JP. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35, 235-270
- 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
- Stoffelen R, Verlinden R, Pinochet J, Swennen R L, DeWaele D. 2000. Host plant response of Fusarium wilt resistant *Musa* genotypes to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae*. *Int. J. Pest Manag.* 46, 289–293.
- Stubblefield SP, Taylor TN, Trappe JM. 1987. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *American Journal of Botany* 74(12). DOI: [10.2307/2443974](https://doi.org/10.2307/2443974).
- Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Kumar A, Shekar Shetty H. 2012. Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. In: Merillon J.M. and Ramawat K.G. *Plan*
- Sutton PN, Henry MJ, Hall JL. 1999. Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta* 208, 426–430.

T

- Takamatsu S. 2004. Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycoscience* 45: 144-154.

Références bibliographiques

- Takezawa D. 1999. Elicitor- and A23187-induced expression of WCK-1, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat. *Plant Mol Biol.* 1999; 40:921–933.
- Tamasloukht B, Kuhn B, Becard G, Frankin P. 2000. RNA accumulation patterns of arbuscular mycorrhizal fungi during presymbiotic stages.
- 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(18):1620-1629.
- Tayeh C, Randoux B, Vincent D, Bourdon N, Reignault Ph. 2015. Exogenous trehalose induces defences in wheat before and during a biotic stress caused by powdery mildew. *Phytopathology.* 104 :293-305.
- Tayeh C. 2012. Induction de résistances chez le blé (*Triticum aestivum* L.) lors d'une interaction compatible avec *Blumeria graminis* (CD. E.O Speer) : mécanismes mis en jeu après applications de tréhalose et d'heptanoyl d'acide salicylique, dérivé fonctionnalisé de l'acide salicylique. PhD thesis, Université du Littoral Côte d'Opale, Calais, France.
- Terras F.R, Eggermont K, Kovaleva V. Raikhel N.V, Osborn R.W, Kester A, Rees S.B, Vanderleyden J, Cammue B.P, Broekaert W.F. 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense *Plant Cell*, 7 (1995), pp. 573-588
- Thomashow LS, Weller DM (1996). Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites, *In: Plant-Microbe Interactions*, Vol. I, G. Stacey and N. Keen, eds., Chapman and Hall, New York, N.Y. pp. 187-235.
- Tisdall JM. 1991. Fungal hyphae and structural stability of soil. *Australian Journal of Soil Research.* 29: 729–743
- Toro KS, Brachmann A. 2016. The effector candidate repertoire of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *BMC Genomics.*17.101.
- Tosa Y, Akiyama T, Ogura H. 1990. Cytological aspects of interactions between formae speciales of *Erysiphe graminis* and genera of gramineous plants, and their evolutionary implications. *Revue canadienne de botanique.* 68(6): 1249-1253.
- <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/download/publication/publie/GraFra2020Chap12.1/Graf2041%20-%20COP.pdf>
- Tsai G J, Su W H, Chen H C, Pan C L. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*, 68 (2002), pp. 170-177.
- Twamley T, Gaffney M, Feechan A, 2019. A microbial fermentation mixture primes for resistance against powdery mildew in wheat. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 1241.

U

- Ube N., Yabuta Y., Tohnooka T., Ueno K., Taketa S., Ishihara A. 2019a Biosynthesis of Phenylamide Phytoalexins in Pathogen-Infected Barley. *Int J Mol Sci.* doi: [10.3390/ijms20225541](https://doi.org/10.3390/ijms20225541)

Références bibliographiques

Ube N., Harada D., Katsuyama Y., Osaki-Oka K., Tonooka T., Ueno K., Taketa S., Ishihara A. 2019b Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry*, DOI: [10.1016/j.phytochem.2019.112098](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112098)

USDA. 2016. *World Agricultural Production. USDA Foreign Agricultural Service, Washington DC 20250*. Available at: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf> .

V

Van der Ent S., Van Wees S. C. M, Pieterse C. M. J. (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70 1581–1588. DOI: [10.1016/j.phytochem.2009.06.009](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.009).

van der Heijden MG, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205(4):1406-23. doi: [10.1111/nph.13288](https://doi.org/10.1111/nph.13288). Epub 2015 Feb 2.

Van Loon L.C, Van Strien E. A., .1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of pr-1 type proteins physiological and molecular plant pathology 55, 85–97 :1999.0213

Van Loon L.C.1982.Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection R.K.S. Wood (Ed.), *Active Defense Mechanisms in Plants*, Plenum Press, New York . pp. 247-273

Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36 453–483. DOI: [10.1146/annurev.phyto.36.1.453](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453).

Van Loon LC, Geraats BP, Linthorst HJ. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 11: 184–191

Van Peer R, Niemann GJ, Schippers B .1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Trichoderma reesei*. *Plant Pathology* 36:728–734.

Van Verk MC, Bol JF, Linthorst HJM. 2011. WRKY Transcription Factors Involved in Activation of SA Biosynthesis Genes. *BMC Plant Biology*. 11:89.

Van Wees S, Van der Ent S, Pieterse C. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* 11(4):443-8.

Van Wees SC M, Lujendijk M, Smoorenburg I, Van Loon LC, Pieterse CM.J.1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* 41 537–549. DOI: [10.1023/A:1006319216982](https://doi.org/10.1023/A:1006319216982)

Vander P., Varum KM., Domard A., El Gueddari N., Moerschbacher BM.1998. Comparison of the Ability of Partially *N*-Acetylated Chitosans and Chitoooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves. *Plant Physiol.* 118(4): 1353–1359.

Varnier AL, Sanchez L, Vatsa P, Boudesocque L, Garcia-Brugger A, Rabenoelina F, Sorokin A, Renault JH, Kauffmann S, Pugin A, Clement C, Baillieul F, Dorey S. 2009. Bacterial

Références bibliographiques

rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant Cell and Environment*.32 : 178-193.

Vera P, Conejero V.1988.Pathogenesis-related proteins of tomato: p-69 as an alkaline endoproteinase *Plant Physiol.*, 87, pp. 58-63

Verlee A, Mincke S, Stevens CV. 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*.164: 268-283.

Vielba-Fernández A, Polonio A, Ruiz-Jiménez L, de Vicente A, Pérez-García A, Fernández-Ortuno D. 2020. Fungicide Resistance in Powdery Mildew Fungi. *Microorganisms* 2020, 8(9), 1431; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091431>.

Vierheilig H, Steinkellner S, Khaosaad T, Garcia-Garrido J M. 2008. The Biocontrol Effect of Mycorrhization on Soilborne Fungal Pathogens and the Autoregulation of the AM Symbiosis: One Mechanism, Two Effects? *Mycorrhiza*. 307-320.

Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177– 206.

Vlot AC, Liu PP, Cameron RK, Park SW, Yang Y, Kumar D, Zhou F, Padukkavidana T, Gustafsson C, Pichersky E *et al.* 2008. Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56: 445– 456.

Voigt CA. 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*. 5(168):1–6.

Vos C m, Tesfahuna A N, Panis P, De Waele D, Elsen A. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. *Applied Soil Ecology* 61: 1-6.

W

Wan, J, Zhang, X.-C, Neece, D, Ramonell, KM, Clough, S, Kim, S.-y, Stacey, MG, Stacey, G. 2008. Une kinase de type récepteur LysM joue un rôle essentiel dans la signalisation de la chitine et la résistance aux champignons chez *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20, 471–481.

Wang X, Zhao S, Bücking H .2016. Arbuscular mycorrhizal growth responses are fungal specific but do not differ between soybean genotypes with different phosphate efficiency. *Ann Bot* 118:11–21 <https://doi.org/10.1093/aob/mcw074>

Walker C, Giovannette M, Avio L, Citerlisi AS, Nicolson TH. 1995. A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas : *Glomus viscosum*.

Wang C, Li X, Song F. 2012. Protecting Cucumber from Fusarium Wilt with Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 43(22)

Wang B, Qui YL. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16, 299–363. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6>.

Wang Y-H, Wang M, Li Y, Wu A, Huang J. 2018. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nitrogen uptake of *Chrysanthemum morifolium* under salt stress. *PLoS ONE* 2018, 13, e0196408.

Références bibliographiques

- Wang, X, Yang, B, Li K, Kang Z, Cantu D, Dubcovsky J. 2016. A conserved *Puccinia striiformis* protein interacts with wheat NPR1 and reduces induction of pathogenesis-related genes in response to pathogens *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29 (2016), p. 977
- Wang, G. H. 1992. Inhibition and inactivation of five species of food borne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, 55, 916–925.
- Waters MT, Gutjahr C, Bennett T, Nelson DC. 2017. Strigolactone signaling and evolution *Annual Review Plant Biology*, 68 (2017), pp. 291-322
- Wei Y. D, Zhang Z. G, Andersen C.H, Schmelzer E, Gregersen P.L., Collinge D. B, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H. 1998. An epidermis/papilla-specific oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus *Plant Mol. Biol.*, 36, pp. 101-112
- Whipps J M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82, 1198–1227. doi: 10.1139/b04-082.
- Wilkinson. SW, Magerøy. MH, López Sánchez. A, Smith. LM, Furci. L., Cotton. TEA, Krokene. P, Ton. J. 2019. Surviving in a Hostile World: Plant Strategies to Resist Pests and Diseases in *Annu. Rev. Phytopathol.* 2019.57 :505-529
- Wilkinson MJ, Manoogian ENC, Zadourian A, Lo H, Fakhouri S, Shoghi A, Wang X, Fleischer JG, Navlakha S, Panda S, Taub PR 2019. Ten-Hour Time-Restricted Eating Reduces Weight, Blood Pressure, and Atherogenic Lipids in Patients with Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.004.
- Wipf D, Kranjiski F, van Tuinen D, Recorbet G, Country EP, 2019. Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *New Phytologist*. 223 (3):1127-1142. <https://doi.org/10.1111/nph.15775>.
- Wojakowska A, Perkowski J, Góral T, Stobiecki M. 2013. Structural characterization of flavonoid glycosides from leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) using LC/MS/MS profiling of the target compounds. *Journal of Mass Spectrometry*. 48:329-39. doi: 10.1002/jms.3160.
- Wyss U. 2002. Feeding Behavior of Plant-Parasitic Nematodes. In *The Biology of Nematodes*, Donald L Lee ' . Ed CRC.

Z

- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF .1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 14 pp. 415-421
- Zamioudis C, Pieterse C. 2012. Zamioudis C, Pieterse CM. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(2) :139-50
- Zhang Z, Collinge B. D, Thordal-Christensen H. 1995. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus *Plant J.*, 8, pp. 139-145
- Zhao X, Wang M, Wang W, Liu Q, Li J, Yin H. 2019. The Application of Chito/Chitin Oligosaccharides as Plant Vaccines. In: Zhao L. (eds) *Oligosaccharides of Chitin and Chitosan*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9402-7_10.

Références bibliographiques

Zhu M, Hu Z, Zhou S, Wang L, Dong T, Pan Y and Chen G (2014) Molecular characterization of six tissue-specific or stress-inducible genes of NAC transcription factor family in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Plant Growth Regul* 4:730-744.

Zimmermann, G., Bäumlein, H., Mock, H. P., Himmelbach, A., & Schweizer, P. 2006. The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in Basal host resistance. *Plant physiology*, 142(1), 181–192. <https://doi.org/10.1104/pp.106.083824>.

Zipfel C, Oldroyd GED. 2017. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*. 543(7645):328-336. DOI: [10.1038/nature22009](https://doi.org/10.1038/nature22009)

Valorisation

Communications par affiches

- **N. Raouani**, B. Tisserant, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, M. Calonne, S. Declerck, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui :

‘Inoculation du blé avec un champignon mycorhizien *Rhizophagus irregularis* et *Trichoderma harzianum* encapsulés dans des billes d’alginate comme moyen de biocontrôle contre l’oïdium’’, 14 -15 Juin 2018, SFR Condorcet- Calais- France

- **N. Raouani**, B. Tisserant, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, M. Calonne, S. Declerck, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui :

‘Essais de protection du blé contre l’oïdium à l’aide d’un inoculum à base de champignons mycorhiziens en combinaison avec *Trichoderma* encapsulé dans des billes d’alginate’’, 27- 29 Juin 2018, 5èmes journées Francophones des mycorhizes-Dunkerque- France

- **N. Raouani**, B. Tisserant, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui

‘Effet de différentes molécules bio-sourcées sur la protection du blé tendre contre l’oïdium’’, 2- 3 Avril 2019, Journées Jeunes Chercheurs Transfrontalières- Reims- France

- **N. Raouani**, B. Tisserant, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui :

‘Effet de différentes molécules bio-sourcées sur la protection du blé tendre contre l’oïdium’’, 4 Avril 2019, Journées des Doctorants "Conférences autour du Biocontrôle", Reims- France

⇒ **Prix meilleur Poster**

- **N. Raouani**, B. Tisserant, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui :

‘Screening of new molecules as biocontrol agents against wheat powdery mildew’’, 19 – 24 May 2019, 14th International IUPAC Conference of Crop Protection- Ghent Belgium

- **N. Raouani**, M. Magnin-Robert, B. Randoux, B. Tisserant, J. Fontaine, L. Chaveriat, V. Lequart, N. Joly, P. Martin, E. Claverie, P. Jacques, Ph. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui:

“ New potential molecules as biocontrol agents against wheat powdery mildew”, 25 - 26 Juin 2019, SFR Condorcet- Reims –France

- **N. Raouani**, M. Magnin-Robert, B. Randoux, J. Fontaine, L. Chaveriat, V. Lequart, N. Joly, P. Martin, E. Claverie, P. Jacques, Ph. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: “ Screening of new molécules to protect wheat against powdery mildew”, 19-22 Novembre 2019, 2nd edition of the International Symposium Plant BioProTech Marrakesh, Morocco.

- **N. Raouani**, B. Randoux, M. Magnin-Robert, J. Fontaine, L. Chaveriat, V. Lequart, N. Joly, P. Martin, E. Claverie, P. Jacques, Ph. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui :

“Criblage de molécules prometteuses pour lutter contre l’oïdium du blé”, 29-30 Janvier 2020, Phloème : biennales de l’innovation céréalière – Paris- France

Communications orales

- **N. Raouani**, B. Tisserant, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: “ In vitro assays of new biomolecules as biocontrol agents against powdery mildew” October 2017 / Bioscreen comitee

- **N. Raouani**, B. Tisserant, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: “Screening of biosourced molecules as biocontrol agents against wheat powdery mildew” 24 Janvier 2018 /1er Smartbiocontrol Symposium – Gand- Belgique

- **N. Raouani**, B. Tisserant, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: “New biosourced molecules and Arbuscular Mycorrhizal Fungi as biocontrol agents against wheat pathogens” 25 Octobre 2018 / Bioscreen's scientific meeting – Université de l’Artois – Béthune – France

- **N. Raouani**, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: “ Results of screening of new molécules as biocontrol agents against powdery mildew “ 3 Juin 2019 / Kruishoutem, Belgique

- **N. Raouani**, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: Arbuscular mycorrhizal fungi "An ecosystem engineers”, 23 Septembre 2019, webinar – Interreg SMARTBIOCONTROL

- **N. Raouani**, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: “Screening of new molécules to protect wheat against powdery mildew “Plant

Bioprotech 1st International Symposium on Plant Bioprotection Sciences & Technologies.
Marrakech (Maroc), 19-22 november 2019

- **N. Raouani**, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: "Association d'une molécule bio-sourcée avec un champignon mycorhizien arbusculaire pour lutter contre l'oïdium du blé" 14 Janvier 2021, J2C2 (visioconférence)
- **N. Raouani**, M. Magnin- Robert, B. Randoux, J. Fontaine, P. Reignault, A. Lounès-Hadj Sahraoui: Arbuscular mycorrhizal fungi " An ecosystem engineers" , 23 September 2019 , webinar – Interreg V SMARTBIOCONTROL

Criblage de molécules et de champignons pour le biocontrôle de l'oïdium du blé : sélection d'un chito-oligosaccharide et d'un champignon mycorhizien à arbuscules, application combinée et mécanismes de défense induits

Le blé (*Triticum aestivum* L.), deuxième céréale la plus cultivée à l'échelle mondiale, est la cible de divers champignons pathogènes foliaires, tel que *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*), responsable de l'oïdium. A ce jour, le recours aux produits phytosanitaires conventionnels pour lutter contre cette maladie reste nécessaire afin de préserver les rendements. Toutefois, l'émergence de résistances aux fongicides chez l'agent pathogène et l'impact potentiellement négatif de ceuci sur l'environnement et la santé humaine incitent à se tourner vers des solutions plus durables. Ainsi, mon projet de thèse, qui s'inscrit dans le cadre du projet INTERREG V BioScreen, avait pour objectif de développer des outils de biocontrôle de l'oïdium du blé reposant sur l'utilisation de molécules à activités antifongiques et/ou stimulateurs de défense des plantes (SDP) et de microorganismes vivants bénéfiques comme les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA). Après une étape de criblage visant à sélectionner les molécules appartenant à diverses familles chimiques (rhamnolipides, chito-oligosaccharides, lipopeptides, cyclodextrines) et les inoculums fongiques les plus efficaces dans nos conditions de culture, notre étude s'est focalisée sur l'association du chito-oligosaccharide BioA187, utilisé en application foliaire, et de l'inoculum fongique à base du CMA *Funnelformis mosseae* (*Fm*) introduit dans le substrat de culture. Le traitement combiné BioA187+*Fm* a permis d'obtenir un taux de protection du blé contre l'oïdium de 72%, contre 33 et 42% pour BioA187 et *Fm* utilisés seuls, respectivement. L'induction des défenses chez le blé a été évaluée via l'étude de l'expression de certains gènes marqueurs de plusieurs voies de défense (Protéines PR, voie des phénylpropanoïdes, composés pariétaux), par RT-qPCR. En contexte non infectieux, le BioA187 induit l'expression de plusieurs gènes codant des protéines PR, alors que les gènes *PAL* et *POX* (PR9) sont plus amplement exprimés chez les plantes mycorhizées par *Fm*. Dans le cadre de l'association BioA 187+*Fm*, une induction des gènes PR et de gènes de la voie des phénylpropanoïdes a été observée. Lors de l'infection du blé par l'agent pathogène, une analyse métabolomique a révélé l'accumulation de phénylamides, composés connus pour leur activité antimicrobienne, notamment chez les plantes traitées par BioA187. Les gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes et des gènes PR sont surexprimés chez le blé traité (BioA187, BioA187+*Fm*). L'application de BioA 187 semble renforcer l'expression des défenses chez les plantes mycorhizées, ces dernières présentant par ailleurs des défenses induites de façon constitutive. Parallèlement, l'activité enzymatique POX est élicitée dans les tissus foliaires en réponse au traitement par BioA187 (conditions BioA 187 et BioA 187+*Fm*), en absence de *Bgt*, puis plus fortement stimulée en réponse à l'infection par *Bgt*. En revanche, les plantes mycorhizées par *Fm* n'ont pas montré d'augmentation de l'activité POX. En conclusion, l'ensemble de nos résultats a mis en évidence l'intérêt d'utiliser l'association BioA187+*Fm* comme moyen de biocontrôle de l'oïdium du blé, via le renforcement des réactions de défense de la plante.

Mots-clés: blé, oïdium, Stimulateur de Défense des Plantes, chito-oligosaccharide bio-sourcé, champignon mycorhizien arbusculaire, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, MIR, résistante induite

Screening of molecules and fungi for biocontrol of wheat powdery mildew: Selection of a chito-oligosaccharide and an arbuscular mycorrhizal fungus, combined application and induced defense mechanisms

Wheat (*Triticum aestivum* L.), the second most widely produced cereal in the world, is the host of different pathogens, such as the causal agent of powdery mildew *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*). The use of conventional fungicides still remains necessary to control this disease and to secure wheat yields. However, the emergence of fungicide resistance in the pathogen population and the potential threat towards the environment and human health are prompting a move towards more sustainable control strategies. Therefore, my thesis work, which is part of the INTERREG V BioScreen project, aimed to develop tools for the biocontrol of wheat powdery mildew based on the use of molecules with antifungal and/or plant defense inducer properties/activities and beneficial microorganisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). After a screening step aiming at selecting the most effective molecules belonging to various chemical families (rhamnolipids, chito-oligosaccharides, lipopeptides, cyclodextrins) and fungal inocula against wheat powdery mildew, our study focused on the association of the chito-oligosaccharide BioA187, used in foliar application, and the fungal inoculum based on the AMF *Funnelformis mosseae* (*Fm*) incorporated in the culture substrate. The combined treatment BioA187+*Fm* resulted in a higher protection rate of wheat against powdery mildew (72% compared to 33 and 42%, respectively) for BioA187 and *Fm* used separately. The defense induction in wheat was assessed by studying the expression of some marker genes of several defense pathways (PR-proteins, phenylpropanoid pathway, parietal compounds), by RT-qPCR. Under non-infectious conditions, BioA187 induces the expression of several genes encoding for PR proteins, whereas the *PAL* and *POX* (PR9) genes are overexpressed in plants mycorrhized by *Fm*. Considering the BioA187+*Fm* association, inductions of PR-encoding genes and genes involved in the phenylpropanoid pathway have been observed. After wheat was infected with the pathogen, a metabolomic analysis revealed the accumulation of phenylamides, compounds known for their antimicrobial activity, in particular in plants treated with BioA187. The genes involved in the phenylpropanoid pathway and PR-encoding genes are over-expressed in treated wheat (BioA187, BioA187+*Fm*). The application of BioA187 enhanced the expression of defenses by mycorrhization, which also constitutively induced defenses. In addition, POX activity was elicited in leaf tissue in response to BioA187 treatment alone or combined with *Fm* inoculation, in the absence of *Bgt*, and to a larger extent stimulated after *Bgt* infection. On the other hand, no induction of POX activity was observed on plants mycorrhized by *Fm*. In conclusion, taken all together, our findings highlighted the interest of using the BioA187+*Fm* association as a tool for the biocontrol of wheat powdery mildew, via the reinforcement of the plant defense.

Keywords: wheat, powdery mildew, plant defense inducer, bio-sourced chito-oligosaccharide, arbuscular mycorrhizal fungus, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, MIR, induced resistance