



HAL
open science

Analyse fonctionnelle du mécanisme de résistance à la septoriose médié par le gène *Stb16q* chez le blé tendre.

Mélissa Battache

► **To cite this version:**

Mélissa Battache. Analyse fonctionnelle du mécanisme de résistance à la septoriose médié par le gène *Stb16q* chez le blé tendre.. Sciences agricoles. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC063 . tel-04861103

HAL Id: tel-04861103

<https://theses.hal.science/tel-04861103v1>

Submitted on 2 Jan 2025

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.

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT

THESE

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Soutenue le 06 décembre 2022

Mélissa BATTACHE

**Analyse fonctionnelle du mécanisme de résistance à la septoriose
médié par le gène *Stb16q* chez le blé tendre**

Sous la direction de :

Thierry LANGIN et Cyrille SAINTENAC

Membres du jury :

Didier LE THIEC – Directeur de Recherche, UMR 1434 SILVA	Président
Alia DELLAGI – Professeure, UMR1318 JPB	Rapporteuse
Maria MANZANARES-DAULEUX – Professeure, UMR1349 IGEPP	Rapporteuse
Ellen DUGUE-GOUDEMAND – Directrice de Recherche, Florimond-Desprez	Examinatrice
Emmanuel VANROBAYS – Maître de Conférences, UMR 9263/1103 iGReD	Examinateur
Thierry MARCEL – Chargé de Recherche, UR1290 BIOGER	Examinateur
Thierry LANGIN – Directeur de Recherche, UMR1095 GDEC	Directeur de Thèse
Cyrille SAINTENAC – Chargé de Recherche, UMR1095 GDEC	Co-encadrant de Thèse

UMR 1095 INRAE – UCA
« Génétique, Diversité et Écophysiologie des Céréales »
Équipe Maladies Des Céréales (MDC)
5 chemin de Beaulieu – 63000 Clermont-Ferrand

RESUME

La septoriose, causée par le champignon *Zymoseptoria tritici*, est l'une des maladies du blé les plus dévastatrices en Europe. Parmi les différentes stratégies de lutte contre cette maladie, l'utilisation de variétés de blé résistantes est l'une des plus efficaces, écologiques et durables. Cependant, le développement de ces variétés est limité par le manque de connaissances sur la génétique et surtout sur les mécanismes moléculaires et physiologiques sous-tendant les résistances à la septoriose. L'objectif de cette Thèse est de mieux comprendre le mécanisme de résistance associé au gène majeur de résistance *Stb16q* en identifiant où, quand et comment ce récepteur kinase riche en cystéine (CRK) arrête les isolats avirulents de *Z. tritici* au cours de la pathogénèse. Une analyse cytologique quantitative conduite à partir de feuilles de lignées de blé quasi-isogéniques (NILs) pour le gène *Stb16q* inoculées avec des isolats marqués à la GFP a révélé que *Stb16q* arrêtaient les isolats avirulents à deux stades différents. Un premier blocage majeur est observé lors de la pénétration dans les feuilles par les stomates, avec 92 % de tentatives de pénétration infructueuses, tandis que le deuxième arrêt se produit lors de la colonisation de l'apoplasme, puisque les hyphes ayant pénétré par les stomates ne se développent pas au-delà de la cavité sous-stomatique. L'infiltration artificielle d'isolats de *Z. tritici* directement dans l'apoplasme des NILs *Stb16q* confirme ces résultats, avec un contournement partiel de la résistance médiée par *Stb16q* lors de l'infiltration d'isolats avirulents. Des analyses similaires menées sur quatre autres NILs portant les gènes *Stb5*, *Stb6*, *Stb7* ou *Stb9* suggèrent fortement que le blocage de *Z. tritici* lors de sa pénétration par les stomates est un mécanisme majeur commun dans les résistances médiées par les gènes *Stb*. Afin d'identifier le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) et physiologique(s) conduisant à l'arrêt des isolats avirulents de *Z. tritici* par *Stb16q*, une mesure de l'ouverture stomatique et des analyses métabolomiques ont été réalisées au cours de la cinétique d'infection. Ces expériences ont montré que *Stb16q* induisait une fermeture stomatique partielle et spécifique suite à l'infection par un isolat avirulent ainsi qu'une suraccumulation du sinapoylagmatine et de huit autres métabolites possiblement impliqués dans les voies de biosynthèses des phénylpropanoïdes et dérivés. Cet ensemble de résultats nous permet de proposer un modèle fonctionnel du mécanisme de résistance médié par *Stb16q*, qui, à long terme, pourrait servir de base à l'amélioration de la résistance variétale et à l'élaboration de nouvelles stratégies pour le contrôle de la septoriose.

Mots-clés : *Zymoseptoria tritici*, blé, résistance, gènes *Stb*, pénétration, stomate, septoriose

ABSTRACT

Septoria tritici blotch (STB), caused by the fungus *Zymoseptoria tritici*, is one of the most devastating wheat diseases in Europe. Among the different STB control strategies, the use of resistant wheat varieties is the main environmentally sustainable and efficient one. However, the development of these varieties is limited by the lack of knowledge on genetics and on the molecular and physiological mechanisms underlying resistance to STB. The objective of this Thesis was to get insight into the resistance mechanism mediated by the *Stb16q* gene by identifying when, where, and how this cysteine-rich receptor-like kinase stops avirulent isolates of *Z. tritici* during pathogenesis. Quantitative cytological analysis conducted on leaves of *Stb16q* near-isogenic lines (NILs) inoculated with GFP-labelled isolates revealed that *Stb16q* stops the avirulent isolates at two different stages. A first major blocking stage is observed during leaf penetration through stomata, with 92% of unsuccessful penetration attempts. The second blocking stage occurs during apoplast colonization, as the hyphae that managed to penetrate leaf through stomata did not develop past the sub-stomatal cavity. Artificial infiltration of *Z. tritici* isolates directly into the apoplast of *Stb16q* NILs confirms these results, with a partial bypass of *Stb16q*-mediated resistance following infiltration of avirulent isolates. Similar analyses conducted on four other wheat NILs carrying the *Stb5*, *Stb6*, *Stb7* or *Stb9* genes strongly suggest that hindering *Z. tritici* during stomata penetration is a common major mechanism in *Stb*-mediated resistances. To identify the molecular and physiological mechanism(s) leading to the arrest of avirulent *Z. tritici* isolates by *Stb16q*, stomatal aperture measurements and metabolomic analyses were performed during infection kinetic. These experiments showed that *Stb16q* induced a partial and specific stomatal closure following infection by an avirulent isolate as well as the upregulation of sinapoylagmatine and of height other metabolites possibly involved in phenylpropanoids and derivatives biosynthesis pathways. Together, these results allow us to propose a functional model of the *Stb16q*-mediated resistance mechanism, which, in the long term, could serve as a basis for the improvement of varietal resistance and for the development of new strategies to control STB.

Keywords: *Zymoseptoria tritici*, wheat, resistance, *Stb* genes, penetration, stomata, STB

REMERCIEMENTS

Je souhaiterai en tout premier lieu remercier les membres du jury de Thèse, **Christophe Tatout**, **Maria Manzanares-Dauleux**, **Alia Dellagi**, **Ellen Goudemand-Dugue**, **Didier Le Thiec** et **Thierry Marcel** qui ont gentiment accepté d'évaluer ce travail.

Un grand merci à mon directeur de Thèse, **Thierry Langin**. Merci de m'avoir accueilli dans l'équipe, merci pour les longues discussions scientifiques (ou non) et pour ta bienveillance, tes encouragements, et pour m'avoir forcé, de concert avec Cyrille, à prendre des congés. Merci car tu as fortement contribué à mon affirmation dans le monde de la recherche, et ça ce n'était pas gagné.

Un immense et chaleureux merci à mon encadrant de Thèse, **Cyrille Saintenac**. Merci de m'avoir fait confiance initialement et d'avoir partagé avec moi ton Antre du bazar pendant plus de 4 ans maintenant (et je n'en dirai pas plus à ce sujet !). Merci pour toutes les discussions que nous avons eues ensemble, qu'elles aient été scientifiques et sérieuses, scientifiques et farfelues ou absolument pas scientifiques. Merci d'avoir supporté mes innombrables et fluctuantes humeurs : d'avoir supporté avec humour mes râleries et bavardages quotidiens, de m'avoir rassurée quand la confiance était au plus bas, encouragée dans les moments de fatigue ou de lassitude, orientée quand j'étais perdue et d'avoir ri dans les moments de joie. Merci infiniment pour ta bonne humeur et ton optimisme (quasi) constants, ta bienveillance, ta patience, ta disponibilité et ton investissement à toutes épreuves malgré les moments de surcharge. Sincèrement, je n'aurais pas pu imaginer meilleur encadrant.

Je souhaiterai également remercier chaudement l'ensemble de la famille (ou secte) MDC pour avoir contribué à mon épanouissement professionnel et personnel. Un grand merci à vous d'avoir supporté ma « mauvaise humeur » matinale. Vous avez été des goûteurs hors pair et challengeant (et patients) pour mes premiers pas (et les suivants) en pâtisserie. Merci aux irréductibles, **Florence Cambon**, **Olivier Soudière**, **Géraldine Philippe** et **Ludovic Bonhomme**. **Florence**, merci de m'avoir tout appris au laboratoire, et de m'avoir transmis (enfin je l'espère) ta rigueur et ta persévérance. Tu fais partie des personnes les plus gentilles que j'ai pu rencontrer au cours de cette Thèse, et nos discussions, parfois qualifiées de discussions TupperWare par certains, ont été, plus que tu ne le penses, une vraie soupape de pression. **Olivier**, merci d'avoir été un confident sans jugement pendant ces 4 années, mes histoires de cœur, familiales et personnelles n'ont maintenant plus de secrets pour toi. Merci aussi pour ton caractère de mer**, j'ai trouvé un sacré compétiteur de râleries et grâce à toi, me sentais un peu moins seule. **Géraldine**, merci d'une part pour la légèreté (et le grain de folie)

que tu as introduite dans l'équipe cette dernière année et à l'inverse, pour nos discussions psychanalytiques qui m'auront apporté un regard nouveau sur les gens, et sur ma personne. **Ludo**, merci pour l'appui et les conseils scientifiques que tu m'as prodigués, et merci également pour les encouragements, c'était peut-être anodin pour toi, mais ils ont été d'une grande aide morale aux bons moments.

Merci à ceux qui sont partis, **Andréa, David, Tarek, Francis, Mélanie, Juliette** et à l'équipe DOPM (partis de la secte) et ceux qui sont encore là, **Samir the explorer, Shimplal, Larissa, Jean-Noël** pour avoir contribué à cet environnement bienveillant et léger qu'est la Team MDC. Un merci spécial à **Philippe Lecomte**, pour m'avoir encouragé à voir les choses toujours de façon positive et à **Christine Piotte** pour m'avoir appris à me détendre.

Merci à l'équipe CPCC, **Stéphane Bernard, Marc Deffradas, Michael Deneffe, Raphaël Giroud** et **Richard Blanc** pour m'avoir suivi dans la mise au point, parfois un peu bizarre, de mes expérimentations. Un merci spécial à **Richard** pour sa bonne humeur et son soutien expérimental et mental (et pour les frayeurs pendant que je manipulais !).

Merci également à toutes les équipes collaboratrices de m'avoir accueilli dans leur labo et pour leurs supports scientifiques : **Guillaume Marti** et **Sylvie Fournier** de la plateforme MetaToul-Agromix du LRSV, **Annabelle Varrot** et **Emilie Gillon** de l'équipe GBMS du CERMAV, **Marc-Henri Lebrun** et **Kaori Sakai** de l'équipe EGIP de BIOGER.

Merci aux autres non-permanents du GDEC pour les bons moments partagés. Merci aux autres angles du triangle des Bermudes (j'ai hâte de Shi-Fume-Mi à nouveau avec vous). **Florian**, merci pour ta personnalité...hors norme (je ne dirai pas le mot en Au*****), les délires partagés (et oubliés pour certains, 4 ans c'est long) depuis le début de cette aventure et le soutien (plus implicite qu'explicite) tout le long. Nous sommes arrivés ensemble, nous avons mené de nombreuses batailles (et pas forcément dans le même camp, ton coude s'en souviendra je l'espère) et nous achèverons cette aventure ensemble. Merci. **Lena**, merci pour tes punchlines de l'espace, ton esprit aiguisé qui aura fait de moi sa muse pour une de ses fameuses chansons et ton intérêt pour « Plus Mel la vie » (et pour le séjour à Montpellier !). Merci à **Jean, Emile** et à la Team In Basculas Veritas pour les levés de coude libérateurs d'esprit. **Loriane** pour ton grain de folie, ton adorable beauferie et tes cris de corbeaux, **Aline** pour ton esprit surprenant (et perché), tes qualités artistiques et nos discussions philosophiques (ou pas), **Maxime** pour avoir tenté de m'apprendre des éléments d'Histoire et avoir enrichi mon vocabulaire.

Je tenais à remercier grandement et chaudement ces trois femmes époustouflantes rencontrées au cours de cette aventure et qui ont occupé et occupent toujours une place particulière. Un grand merci à **Jeanne**, notre happiness manager, ma contrepartie, ma super voisine, pour ta

bonne humeur constante, ta bienveillance, tes conseils, ton écoute et ton implication phénoménale dans notre bien-être mental. **Fatiha** et **Julie**, mes deux chéries, un immense merci pour les soirées cocooning, les soirées confidences, les séances de sport pas très sérieuses, les fous rires et les sorties variées. Merci pour votre soutien sans failles, pour avoir su déchiffrer mes côtés les plus sombres, les avoir acceptés et anticipés parfois, merci d'être toujours là pour moi et ce, malgré des vies bien chargées. Ces quelques phrases sont loin d'être suffisantes pour vous exprimer toute ma reconnaissance, mais je saurai me rattraper !

Merci à toutes ces autres personnes qui font ou ont fait partie de cette aventure de près ou de loin. À celles qui ont décidé de partir en cours de route, merci...d'être partis, votre départ m'a ouvert de nouvelles opportunités, de nouvelles joies. À celles qui ont choisi de rester même dans les temps difficiles, merci de vous être accrochées, d'avoir été et d'être toujours là. Un merci spécial aux « Vieux du parc à chien », **Annie**, **Christophe**, **Valérie** et particulièrement **Myriam** pour les moments partagés, pour votre soutien et votre compréhension malgré la distance physique ou mentale qui s'est installée. À celles fraîchement arrivées, presque au pire moment, mais qui ont choisi d'entrer dans ma vie malgré tout, merci pour votre persévérance et votre ouverture d'esprit.

Enfin, un merci sincère et infini à ma famille extraordinaire, mon repère ultime, sans qui je n'en serai pas là, ni celle que je suis, aujourd'hui. Cette Thèse, elle vous est dédiée. À ma petite sœur **Sarah**, le minimoy, pour sa joie de vivre communicative et pour la tendresse et la bienveillance de ses encouragements (les stomates te remercient de leur avoir porté un peu d'intérêt !). À mon petit grand frère **Alexis**, pour m'avoir beaucoup fait rire et me faire encore beaucoup rire et pour la légèreté des moments passés ensemble, et je ne parle pas que des moments de beuverie (je finirai par te battre aux fléchettes !). À mon petit frère **Yannis**, le geek, pour les services rendus et pour avoir refait le monde avec moi lors des longues discussions passionnées de nos longs trajets en voiture (pas merci pour les retards par contre !). À vous trois, merci pour votre soutien et votre amour, je suis fière de vous, fière d'être votre grande sœur et je vous aime. Et pour finir, à **mes deux parents chéris**, aucun mot ne serait assez fort pour vous exprimer toute ma gratitude et l'amour que je vous porte. Vous avez été et êtes toujours là pour nous, pour nous soutenir quels que puissent être nos choix, pour nous supporter quelles que puissent être nos humeurs, pour nous accompagner et nous aider quels que puissent être les chemins que nous empruntons, pour nous aimer inconditionnellement quels que soient les épreuves, le moment, la distance. Celle que je suis et où j'en suis, c'est à vous que je le dois. Alors merci du fond du cœur. Merci pour les aides, pour les conseils, pour les réprimandes (oui je vais me reposer !), pour les petites ou grandes attentions, pour la tendresse, pour les appels, pour les débats, pour les encouragements... Bref, merci pour tout.

LISTE DES FIGURES ET TABLES

FIGURE 1. Exemples schématiques de stratégies d'infection d'agents phytopathogènes foliaires à différentes étapes de la pathogénèse.	4
FIGURE 2. Composants des mécanismes de défenses des plantes.	12
FIGURE 3. Modèle d'invasion spatial de l'immunité des plantes.	13
FIGURE 4. Signaux de danger reconnus par les récepteurs de l'immunité.	14
FIGURE 5. Quatre types d'interactions selon la nature quantitative/qualitative de la résistance, répartis en fonction des aspects phénotypiques et génétiques de la résistance.	21
FIGURE 6. Illustration des quatre étapes de la pathogénèse de <i>Z. tritici</i> en l'absence de résistance.	23
FIGURE 7. Surface foliaire couverte de pycnides 21 jours après inoculation de différents isolats de <i>Z. tritici</i> sur les NILs <i>Stb16q</i>	60
FIGURE 8. Surface foliaire couverte de pycnides 21 jours après inoculation de différents isolats de <i>Z. tritici</i> sur les NILs <i>Stb5</i> , NILs <i>Stb6</i> , NILs <i>Stb7</i> et NILs <i>Stb9</i>	61
FIGURE 9. Analyse cytologique quantitative des différentes étapes de la pathogénèse de <i>Z. tritici</i> sur les NILs <i>Stb6</i>	62
FIGURE 10. Analyse cytologique quantitative des différentes étapes de la pathogénèse de <i>Z. tritici</i> sur les NILs <i>Stb9</i>	62
FIGURE 11. Analyse cytologique quantitative des différentes étapes de la pathogénèse de <i>Z. tritici</i> sur les NILs <i>Stb5</i>	63
FIGURE 12. Taux de pénétrations réussies et efficacité de blocage à la pénétration à 9 jpi des différents NILs <i>Stb</i>	64
FIGURE 13. Alignement des séquences protéiques de Gnk2 et des deux domaines DUF26 de STB16. ...	84
FIGURE 14. Tests d'interactions entre les domaines 2xDUF26 recombinants et différents composés.	85
FIGURE 15. Sites de N-glycosylation des domaines 2xDUF26 de STB16 prédits <i>in silico</i>	86
FIGURE 16. Sites de phosphorylation <i>in vitro</i> de la protéine recombinante HisMBP-KinStb16.	89
FIGURE 17. Alignement des domaines cytoplasmiques de STB16 et d'autres RLKs impliquées dans l'immunité.	90
FIGURE 18. Quantification des phytohormones au cours de la cinétique d'infection de <i>Z. tritici</i> sur les NILs <i>Stb16q</i>	94
FIGURE 19. Analyse globale des variations du métabolome des NILs <i>Stb16q</i> au cours de la cinétique d'infection par <i>Z. tritici</i>	95
FIGURE 20. Variations d'abondance de 9 métabolites au cours de la cinétique d'infection de <i>Z. tritici</i> sur les NILs <i>Stb16q</i>	96
FIGURE 21. Modèle du mécanisme de résistance médié par le gène <i>Stb16q</i>	100
FIGURE 22. Facteurs impactant l'efficacité du mécanisme de résistance gouverné par les gènes <i>Stb</i>	108
FIGURE SUPPLEMENTAIRE 1. Rapport de production et de purification des domaines 2xDUF26 recombinants en cellules d'insecte.	112
FIGURE SUPPLEMENTAIRE 2. Fonctionnement de la technique de BioLayer Interferometry (BLI). ...	113
FIGURE SUPPLEMENTAIRE 3. Production de la protéine HisMBP-KinStb16 en système procaryote.	115
TABLE 1. Profil de virulence des différents isolats de <i>Z. tritici</i> inoculés sur les NILs <i>Stb</i>	58

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN – Acide DésoxyriboNucléique

ADP – Adénosine DiPhosphate

ATP – Adénosine TriPhosphate

Ca²⁺ – Calcium

CDPK – Calcium-Dependent Protein Kinase

COV – Composés Organiques Volatiles

CRK – Cysteine-rich Receptor-like Kinase

CRRSP – Cysteine-Rich Receptor-like Secreted Protein

CSIR – Cell Surface Immune Receptor

DAMP – Damage-Associated Molecular Pattern

DUF26 – Domain of Unknown Function 26

ECM – ExtraCellular Matrice

GFP – Green Fluorescent Protein

HCAA – HydroxyCinnamic Acid Amide

HR – Hypersensitive Response

IIR – Intracellular Immune Receptor

IM – Invasion Molecules

IPR – Invasion Pattern Receptor

jpi – jour post-inoculation

LC-MS/MS – Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

LRR – Leucine-Rich Repeat

MAMP – Microbe-Associated Molecular Pattern

MPT – Modification Post-Traductionnelle

NBS-LRR – Nucleotide-Binding Site and Leucine-Rich Repeat domain

NIL – Near-Isogenic Line

NLP – Necrosis and ethylene-inducing Like Protein

PAMP – Pattern-Associated Molecular Pattern

PCD – Programmed Cell Death

PCWDE – Plant Cell Wall Degrading Enzyme

PR protéine – Pathogenesis-Related protein

QTL – Quantitative Trait Loci

RLCK – Receptor-Like Cytoplasmic Kinase

RLK – Receptor-Like Kinase

RLP – Receptor-Like Protein

RMN – Résonance Magnétique Nucléaire

ROS – Reactive Oxygen Species

SDS-PAGE – Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

STB – Septoria Triticum Blotch

WAK – Wall-Associated receptor-like Kinase

TABLE DES MATIÈRES

RESUME	i
ABSTRACT	ii
REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLES	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	3
1. LES STRATEGIES D'INFECTION DES AGENTS PATHOGENES.....	4
1.1. LES EVENEMENTS PRE-PENETRATION.....	4
1.1.1. L'adhésion.....	4
1.1.2. Le développement épiphyte, motilité et tropisme.....	6
1.2. L'ETAPE DE PENETRATION.....	7
1.2.1. Les différents modes de pénétration.....	7
1.2.2. Les molécules d'aide à la pénétration.....	7
1.2.3. Les structures spécialisées dans la pénétration.....	8
1.3. L'ETAPE DE COLONISATION.....	9
1.3.1. Biotrophie.....	9
1.3.2. Nécrotrophie.....	10
2. LES MECANISMES DE DEFENSES DES PLANTES.....	12
2.1. LA RECONNAISSANCE DES AGENTS PATHOGENES.....	12
2.1.1. Les récepteurs de l'immunité.....	12
2.1.2. Les signaux de danger.....	14
2.2. LES REPONSES DE DEFENSE CHEZ LES PLANTES.....	16
2.2.1. Les réponses de défenses contre les étapes pré-pénétration.....	16
2.2.2. Les réponses de défenses contre l'étape de pénétration.....	17
2.2.3. Les réponses de défenses contre l'étape de colonisation.....	19
2.3. RESISTANCES QUANTITATIVES, RESISTANCES QUALITATIVES ET CONCEPTS ASSOCIES.....	21
3. LES PARTICULARITES DES INTERACTIONS BLE / <i>Z. TRITICI</i>.....	23
3.1. UNE STRATEGIE D'INFECTION ORIGINALE MAIS ENCORE MAL COMPRISE.....	23
3.1.1. Un mécanisme d'adhésion inconnu.....	24
3.1.2. Un développement épiphyte stochastique et prolongé.....	24
3.1.3. Une étape de pénétration par les stomates et sans appressorium.....	25
3.1.4. Une étape de colonisation mal caractérisée.....	27
3.1.5. Une phase de latence anormalement longue.....	28
3.2. LA RESISTANCE DU BLE CONTRE <i>Z. TRITICI</i> , UNE BOITE NOIRE.....	29
3.2.1. Des résistances génétiques atypiques.....	29
3.2.2. Des mécanismes de résistance inconnus.....	30
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	33

<u>CHAPITRE 1 : « OU » ET « QUAND » LA RESISTANCE MEDIEE PAR STB16 SE MET-ELLE EN PLACE ?</u>	36
INTRODUCTION.....	36
ARTICLE – BLOCKED AT THE STOMATAL GATE, A KEY STEP OF WHEAT <i>STB16Q</i> -MEDIATED RESISTANCE TO <i>ZYMOSEPTORIA TRITICI</i>	38
CONCLUSION.....	56
<u>CHAPITRE 2 : « OU » ET « QUAND » <i>Z. TRITICI</i> EST-IL ARRETE AU COURS D’AUTRES INTERACTIONS INCOMPATIBLES ?</u>	57
INTRODUCTION.....	57
MATERIELS ET METHODES.....	58
RESULTATS.....	60
CONCLUSION.....	65
<u>CHAPITRE 3 : « COMMENT » LA RESISTANCE MEDIEE PAR STB16 SE MET-ELLE EN PLACE ?</u>	67
INTRODUCTION.....	67
ARTICLE DE REVUE – CYSTEINE-RICH RECEPTOR-LIKE KINASES (CRK), THE NEW TRENDY AND YET ENIGMATIC PROTEIN FAMILY IN PLANT IMMUNITY.....	68
AXE 1 – LA RECONNAISSANCE DE <i>Z. TRITICI</i>.....	84
RESULTATS.....	85
CONCLUSION.....	86
AXE 2 – LA TRANSDUCTION DU SIGNAL.....	88
RESULTATS.....	89
CONCLUSION.....	91
AXE 3 – LES REPONSES DE DEFENSES.....	94
RESULTATS.....	95
CONCLUSION.....	97
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	100
VERS UN MODELE DE LA RESISTANCE MEDIEE PAR LE GENE <i>STB16Q</i>.....	100
LA RECONNAISSANCE DE <i>Z. TRITICI</i>	100
Une reconnaissance précoce de l’agent pathogène est essentielle lors des interactions incompatibles.....	100
Quels sont les scénarios plausibles pour le mécanisme de reconnaissance de <i>Z. tritici</i> par <i>STB16</i> ?.....	102
LES REPONSES MOLECULAIRES ET PHYSIOLOGIQUES GOUVERNEES PAR <i>STB16</i>	104
Quels sont les réponses de défenses mises en place par <i>STB16</i> ?.....	104
D’autres rôles pour <i>STB16</i> ?.....	106
LES GENES <i>STB</i> DANS LA RESISTANCE CONTRE <i>Z. TRITICI</i> : UN MEME MECANISME POUR PLUSIEURS LEVIERS D’ACTIVATION ?.....	107
UN MECANISME DE RESISTANCE GENERALISE ?.....	107
QUELS FACTEURS IMPACTENT L’EFFICACITE DU MECANISME DE RESISTANCE ?.....	107
<u>CONCLUSION</u>	110
<u>ANNEXES AU CHAPITRE 3</u>	112
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	118

AVANT-PROPOS

Le blé fait partie des premières céréales domestiquées et a été, pendant 8 000 ans, la base de l'alimentation des grandes civilisations d'Europe, d'Asie de l'Ouest et du Nord de l'Afrique (Curtis, 2002). Aujourd'hui encore, en tant que source majeure de macro-, micro-nutriments et d'énergie couvrant 20-25 % des apports caloriques journaliers (Shiferaw et al., 2013), cette céréale occupe une position centrale dans l'alimentation quotidienne de plus de trois milliards de personnes dans le monde (Facts & Figures on Food and Biodiversity | IDRC - International Development Research Centre). Ajouté à cela plus de 219 millions d'hectares cultivés pour 761 millions de tonnes produites en 2020 (FAOSTAT - Crops and livestock products), le blé est agronomiquement et nutritionnellement l'une des céréales les plus importantes à l'échelle mondiale.

La Chine, l'Inde, la Russie, les Etats-Unis et la France comptent pour plus de 50 % de la production mondiale de blé en 2019 (FAOSTAT - Food Balances (2010-)). Cela implique qu'une grande majorité de pays dépend du commerce international pour satisfaire ses besoins en blé. En 2019, le commerce mondial de blé a été estimé à 30 % de la production globale, avec 230 millions de tonnes échangées, et l'Europe - avec la France et l'Ukraine en tant que 4 et 5^{ème} pays exportateurs mondiaux - constitue le 1^{er} exportateur mondial (FAOSTAT - Food Balances (2010-)). Bien que ces échanges mondiaux puissent limiter l'insécurité alimentaire dans certains pays, ils créent toutefois des interdépendances. Une forte perturbation du commerce mondial de blé peut ainsi provoquer une augmentation des prix du marché se répercutant sur des millions de personnes, pouvant même aller jusqu'au déclenchement d'instabilités politiques (d'Amour et al., 2016; D'Odorico et al., 2014; Gutiérrez-Moya et al., 2020). Le blé est par conséquent une céréale d'importance économique et géopolitique majeure.

En 2019, 88 % de la production de blé, soit 670 millions de tonnes, a été dédiée à l'alimentation, humaine (68 %) ou animale (20 %) (Grote et al., 2021). En plus de l'émergence de nouveaux modes de consommation dans les pays émergents (Kearney, 2010; Mason et al., 2012), la croissance démographique aura un fort impact sur la consommation de cette céréale puisque des projections estiment que la demande en blé à des fins alimentaires devrait encore augmenter de 70 % d'ici 2050 pour satisfaire une population mondiale prédite de 9 milliards de personnes (Nelson et al., 2010; Tester and Langridge, 2010). En plus d'un usage alimentaire, en 2019, 12 % du blé produit a été valorisé en tant que constituant de nombreux produits non alimentaires à usage quotidien et, dans un cadre de préoccupations environnementales, la demande en blé

pour de tels usages devrait augmenter sensiblement dans les prochaines années (Arvalis, 2006; Grote et al., 2021).

La sécurité alimentaire mondiale, mise en péril par (i) une population grandissante, (ii) la dépendance au commerce international, (iii) les instabilités géopolitiques et (iv) les effets négatifs du changement climatique sur la productivité et les préoccupations environnementales, est donc l'un des challenges majeurs du 21^{ème} siècle. Dans ce contexte et pour répondre à la future demande, une augmentation de la production de blé, estimée de 38 % annuel (Tester and Langridge, 2010), est indispensable. Cette augmentation de production s'axe autour de trois enjeux : l'extension des surfaces dédiées à la culture de blé, l'augmentation du rendement annuel de production et la réduction des pertes pré- et post-récoltes. L'amélioration des pratiques culturales ainsi que l'amélioration du blé vers une plus grande tolérance aux conditions environnementales difficiles ; l'amélioration du blé vers la sélection de traits agronomiques d'intérêt ; et l'amélioration du blé vers la résistance aux maladies, sont autant d'outils potentiels pour atteindre les objectifs et constituent ainsi les objets principaux de la recherche actuelle.

Les pertes en production mondiale de blé sont causées, à hauteur de 21,5 % entre 2010 et 2014, par 31 ravageurs et agents pathogènes (Savary et al., 2019). Parmi eux, les maladies fongiques, incluant les rouilles, la fusariose, la septoriose et l'oïdium, sont celles qui provoquent les pertes les plus importantes à l'échelle mondiale (Savary et al., 2019). En Europe, 2^{ème} producteur et 1^{er} exportateur mondial de blé, 25 % des pertes enregistrées sont associés à des ravageurs et agents pathogènes, dont la septoriose et la rouille jaune sont les principaux agents causals (Savary et al., 2019). La septoriose notamment peut causer des pertes jusqu'à 50 % de rendement durant les épidémies sévères sur des blés sensibles (Fones and Gurr, 2015). Durant les épidémies moins sévères, cette maladie fongique engendre en moyenne 5 à 10 % de pertes de rendement annuelles, représentant une valeur de 120-700 millions d'euros, et ce, malgré la mise en place de mesures de contrôle intensives, telles que la sélection de blé pour la résistance à la septoriose et l'utilisation de fongicides (Fones and Gurr, 2015; Savary et al., 2019). Aussi, 70 % des fongicides utilisés en Europe, représentant une valeur de plus de 400 millions d'euros, sont dédiés à la lutte contre cette maladie chaque année (O'Driscoll et al., 2014; Torriani et al., 2015). La septoriose représente donc un challenge important et persistant envers la production de blé européenne.

INTRODUCTION

Un organisme vivant se définit basiquement par sa capacité de reproduction, de croissance, de développement, d'homéostasie et par un certain degré de réponse aux stimuli, le tout en interaction avec un environnement qui peut être complexe et changeant. Si presque tous les organismes interagissent avec d'autres organismes dans leur environnement, certains dépendent partiellement voire entièrement de ces interactions pour assurer ces fonctions primaires, ou, en d'autres termes, pour leur survie et/ou leur reproduction. Pour nombre de ces organismes, parmi lesquels on peut citer entre autres les nématodes, les insectes herbivores et les microorganismes, les plantes représentent, en tant que sources importantes de nutriments et d'eau, un partenaire d'interaction de choix (Agrios 2005, Chapitre 1).

De nombreux microorganismes établissent ainsi des relations étroites avec les plantes dans le but d'accéder à des ressources nécessaires à leur survie et reproduction. Le type d'interaction établie entre ces protagonistes est traditionnellement un critère de classification des microorganismes. Les microorganismes établissant des relations à bénéfices réciproques avec les plantes sont qualifiés de symbiotiques. Les endophytes et épiphytes colonisent les tissus internes ou externes des plantes, en interagissant de façon « neutre » avec la plante, c'est-à-dire sans apporter de bénéfice ni causer de dommages (visibles sous forme de symptômes) à la plante. Enfin, les relations établies entre les plantes et les agents pathogènes incluant bactéries, oomycètes et champignons – sur lesquels se focalisera cette partie introductive – se font au détriment de la plante et sont susceptibles de conduire au développement d'une maladie végétale (Agrios 2005, Chapitres 1-2).

Les plantes, loin d'être des organismes passifs, ont développé un système de défense sophistiqué ayant pour objectif de préserver leurs propres intérêts en réponse à l'infection par un agent potentiellement pathogène. Les interactions entre un agent pathogène et une plante sont ainsi souvent décrites comme une course évolutive complexe, où chacun des protagonistes met en œuvre une stratégie élaborée – d'infection pour l'agent pathogène, de défense pour la plante – dont la plus efficace dans un environnement donné déterminera le devenir de l'interaction. La compréhension d'une interaction plante - agent pathogène et de son issue (résistance ou sensibilité de la plante à l'agent pathogène) nécessite donc une compréhension à la fois des stratégies d'infection mises en place par un agent pathogène donné et des mécanismes de défenses mis en place par la plante, l'un n'étant pas dissociable de l'autre (Peyraud et al., 2017).

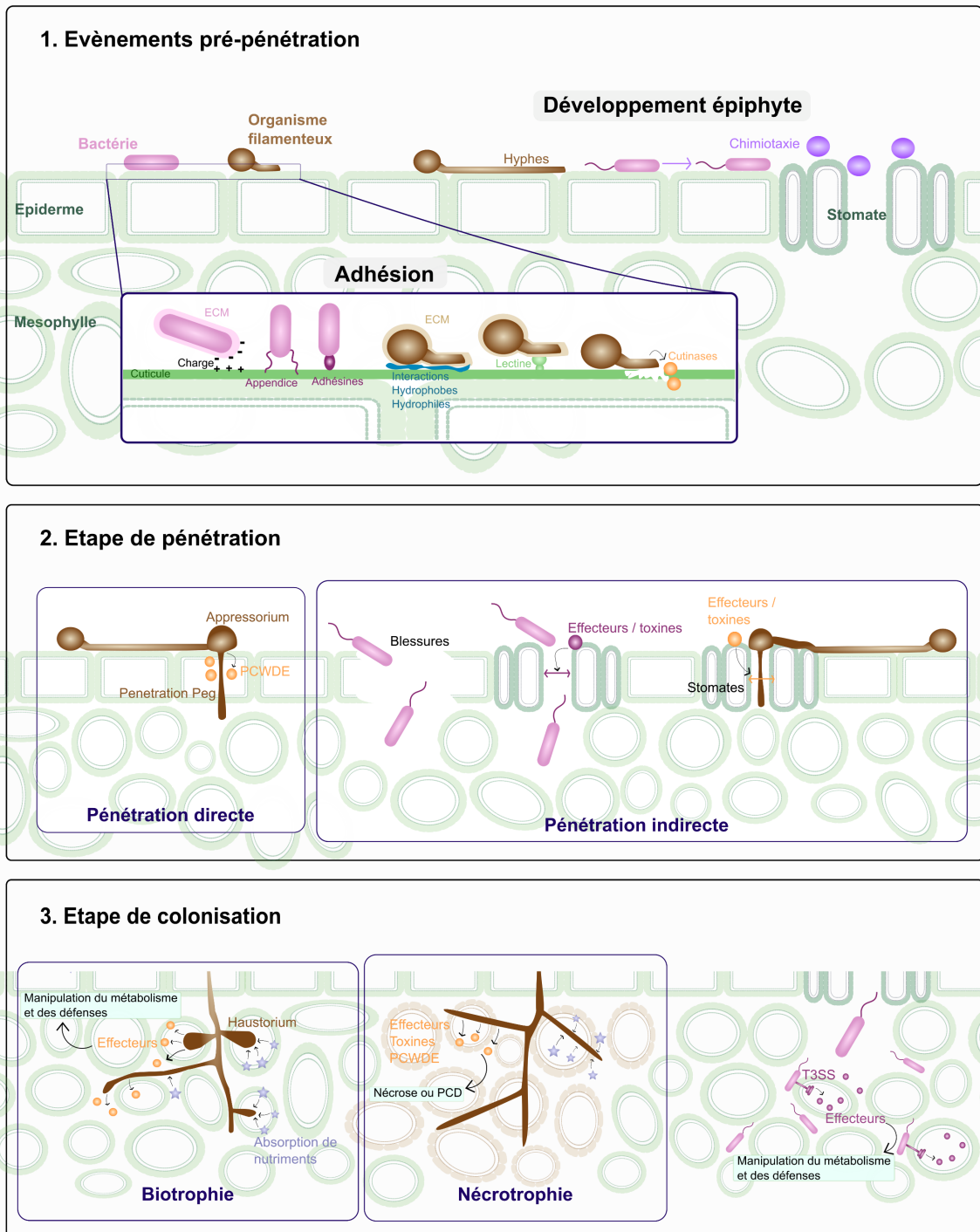


FIGURE 1. EXEMPLES SCHEMATIQUES DE STRATEGIES D'INFECTION D'AGENTS PHYTOPATHOGENES FOLIAIRES A DIFFERENTES ETAPES DE LA PATHOGENESE.

(1) Les évènements pré-pénétration comprennent des mécanismes d'adhésion variés (composés adhésifs dans les parois des agents pathogènes, dans des appendices ou dans des matrices extracellulaires (ECM) ; production d'effecteurs (orange); interactions hydrophobes, hydrophiles ou électrostatiques avec la surface végétale ou interactions avec des récepteurs végétaux de type lectine) et une phase de développement épiphyte où les hyphes des agents pathogènes filamenteux et les cellules des bactéries s'orientent en fonction de différents signaux (exemple de chimiotaxie pour les bactéries qui s'orientent vers des composés (en violet) émis par les stomates). (2) Deux modes de pénétration existent : la pénétration directe de la cuticule et des parois, et la pénétration indirecte par des ouvertures naturelles (stomates et blessures). Les agents pathogènes sécrètent des composés afin de faciliter cette étape, comme des enzymes de dégradation des parois végétales (PCWDE) ou des effecteurs/toxines induisant l'ouverture stomatique. Les agents pathogènes filamenteux développent en plus des structures spécialisées dans la pénétration (appressoria et hyphe de pénétration (penetration peg)). (3) Les agents pathogènes envahissent les espaces intra et/ou intercellulaires de la plante avant de se reproduire. Ils sécrètent des effecteurs apoplasmiques et cytoplasmiques avec différents rôles (manipulation du métabolisme et des défenses / nécroses ou PCD par exemple) selon leurs modes trophiques (biotrophie / nécrotrophie), parfois à l'aide de structures spécialisées comme les haustoria (chez les agents pathogènes filamenteux biotrophes) ou le système de sécrétion de type 3 (T3SS, chez les bactéries).

1. LES STRATEGIES D'INFECTION DES AGENTS PATHOGENES

Qu'ils se développent de façon systémique ou dans des niches spécifiques au sein de la plante, tous les agents pathogènes suivent un processus d'infection défini, appelé pathogénèse. La pathogénèse se caractérise par quatre grandes étapes et trois lieux d'interactions principaux (Agrios 2005, Chapitre 2; Boddy 2016; Pfeilmeier, Caly, et Malone 2016) (FIGURE 1):

1. Les **événements pré-pénétration** constituent la première étape de la pathogénèse. La plupart des agents pathogènes sont en tout premier lieu en contact avec la **surface externe** – aérienne ou souterraine – de la plante. L'interaction avec la surface végétale et l'adaptation à un environnement extérieur fluctuant représentent donc un premier enjeu pour les microorganismes pathogéniques, qui doivent survivre assez longtemps épiphytiquement pour initier l'infection et se mouvoir afin de trouver un point d'entrée dans la plante optimal (Lindow and Brandl, 2003).
2. La deuxième étape cruciale de la pathogénèse est la **pénétration** dans les tissus végétaux, autrement dit la **transition de l'extérieur à l'intérieur des tissus la plante**.
3. L'installation et la **colonisation** constituent la troisième étape de la pathogénèse. Les **tissus internes** des plantes représentent un environnement pouvant être relativement stressant pour les microorganismes, dans la mesure où ils sont gardés par des défenses végétales et limités en nutriments directement assimilables. Un agent pathogène doit donc parvenir à s'établir dans un environnement végétal inhospitalier afin d'en exploiter les ressources.
4. Enfin, la **reproduction** constitue la quatrième étape de la pathogénèse durant laquelle les agents pathogènes, une fois établis, produisent des descendants pour assurer la survie de l'espèce.

Si les étapes de la pathogénèse sont globalement communes à la majorité des agents pathogènes, ces derniers entrent en interaction avec la plante en mettant en place une grande diversité de stratégies à chacune d'entre elles.

1.1. LES EVENEMENTS PRE-PENETRATION

Face à un environnement extérieur fluctuant, deux prérequis à l'infection résident dans l'adhésion et le développement de l'agent pathogène à la surface de la plante (FIGURE 1.1).

1.1.1. L'ADHESION

Les agents pathogènes, qu'ils atteignent la plante sous forme de spores (pour les organismes filamenteux) ou de cellules (pour les bactéries), doivent dans un premier temps adhérer à la surface de la plante. Cette adhésion apparaît critique pour la réussite de l'infection. Chez les

organismes filamenteux, le processus d'adhésion permet par exemple aux spores de germer – processus qui nécessite la plupart du temps une forte humidité – sans être délogées de la surface de la plante, mais est aussi une condition nécessaire à la différenciation de structures d'infection telles que les appressoria (Nicholson and Epstein, 1991; Braun and Howard, 1994; Epstein and Nicholson, 1997).

Les mécanismes d'adhésion sont divers par leur nature et leur localisation. Des composés variés aux propriétés adhésives (constitutives ou induites par des facteurs environnementaux) sont présents dans les parois, dans les membranes plasmiques, sur des appendices spécifiques, ou encore sont sécrétés dans des matrices extracellulaires (ECM, « Extracellular Matrice »). De nombreux champignons et oomycètes, comme *Colletotrichum graminicola*, *Magnaporthe oryzae*, *Ustilago maydis* ou *Cladosporium fulvum*, sécrètent ainsi autour de leurs spores et de leurs hyphes, et dans des conditions d'humidité favorables, une ECM préformée ou synthétisée *de novo* qui contient majoritairement des glycoprotéines et divers lipides et polysaccharides (Epstein and Nicholson, 1997; Tucker and Talbot, 2001; Wanke et al., 2020). En plus de la production de matériaux adhésifs, certains agents pathogènes sécrètent également des protéines de pathogénicité (**effecteurs**) dont certaines, comme les cutinases sécrétées par les spores des champignons *Uromyces viciae-fabae* ou *Blumeria graminis*, ont pour fonction de modifier la surface de la plante afin de faciliter entre autres l'adhésion du microorganisme (Deising et al., 1992; Tucker and Talbot, 2001).

Ces mécanismes d'adhésion sont médiés par des interactions hydrophobes, hydrophiles ou électrostatiques entre l'agent pathogène et la surface de la feuille directement ou entre l'agent pathogène et des récepteurs végétaux de type lectines. Ces interactions sont pour certaines non-spécifiques, tandis que d'autres peuvent conduire à une adhésion plante- et/ou site-spécifique (Nicholson and Epstein, 1991; Romantschuk, 1992; Tucker and Talbot, 2001; Danhorn and Fuqua, 2007). A titre d'exemple, la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *synringae* adhère sur l'ensemble des feuilles de multiples plantes tandis que les bactéries *P. syringae* pv. *phaseolicola* et *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi* adhèrent préférentiellement aux stomates des feuilles de pois communs et de jacinthes respectivement (Romantschuk et al., 1993, 1994; Doorn, 1994). Les mécanismes sous-tendant ces spécificités ne sont toutefois pas encore bien connus, mais il a été suggéré qu'ils pourraient reposer sur des interactions spécifiques, comme une interaction électrostatique entre une bactérie chargée négativement et des cellules stomatiques chargées positivement (Boher et al., 1996), ou sur des répertoires d'adhésines (et de récepteurs

végétaux correspondants) propres à une interaction plante – microorganisme donnée (Romantschuk et al., 1993; Mhedbi-Hajri et al., 2011).

1.1.2. LE DEVELOPPEMENT EPIPHYTE, MOTILITE ET TROPISME

Une fois en surface de la plante, les agents pathogènes doivent être en mesure d'atteindre de nouvelles sources de nutriments, un environnement plus favorable à leur croissance et/ou un site de pénétration optimal. Pour les organismes filamenteux, ce processus repose le plus souvent sur le développement d'hyphes (plus rarement sur des spores motiles). Une fois adhérees à la surface de la plante, les spores mobilisent leurs réserves nutritionnelles (lipides et sucres) pour développer un tube germinatif. Ce tube germinatif différencie à son tour des structures d'infection pour la pénétration de la plante et/ou des hyphes de croissance pour l'exploration de la surface végétale (Carlile, 1995; Agrios, 2005; Meng et al., 2009). Les bactéries, elles non-capables de se développer sous différentes formes, utilisent des appendices appelés flagelles et pili qui, en plus de leurs rôles dans l'adhésion à la plante, leur permettent de se mouvoir dans des substrats liquides, solides ou visqueux (Harshey, 2003).

L'orientation de la croissance des hyphes et de la motilité des bactéries est un aspect essentiel dans la pathogénèse d'un agent pathogène. Ainsi, les bactéries, les spores et les hyphes peuvent percevoir des signaux variés leur permettant une croissance directionnelle – attractive ou répulsive – adaptée à leur environnement (Brand and Gow, 2009; Matilla and Krell, 2018). Les bactéries et les spores motiles se dirigent principalement par chimiotaxie positive, c'est-à-dire par attraction vers différentes substances chimiques dérivées des plantes, comme les acides aminés libérés par les racines, l'acide jasmonique ou le xylose induits lors de blessures de la surface de la plante ou encore le sucrose issu de la photosynthèse émis par les stomates (Kroupitski et al., 2009; Leonard et al., 2017; Matilla and Krell, 2018). Si certains agents pathogènes filamenteux ne présentent aucune réponse tropique (Wynn, 1981), la plupart d'entre eux perçoivent des signaux diversifiés, incluant différentes substances chimiques (chémotropisme), la présence d'autres hyphes (autotropisme négatif), l'oxygène (aérotropisme), la lumière (phototropisme) ou l'eau (hydrotropisme) (Wynn, 1981; Carlile, 1995; Brand and Gow, 2009). Un des tropismes couramment répandus chez les organismes filamenteux – comme par exemple chez les champignons des rouilles (*Puccinia* spp. et *Uromyces* spp.) – est le thigmotropisme, c'est-à-dire la perception du contact avec ou du relief d'une surface (Collins et al., 2001; Talbot, 2003; Boddy, 2016). *Uromyces appendiculatus* se développe ainsi perpendiculairement à la feuille pour maximiser les chances de rencontrer un

stomate et est capable de reconnaître une surface (crête) de hauteur définie correspondant aux stomates (Allen, 1991).

1.2. L'ETAPE DE PENETRATION

Après adhésion et orientation vers un site de pénétration optimal, une seconde étape cruciale à laquelle se confronte un agent pathogène lors de l'infection d'une plante est la pénétration dans les tissus végétaux. Là encore, une grande diversité de stratégies a été développée par les agents pathogènes pour réaliser cette étape (FIGURE 1.2).

1.2.1. LES DIFFERENTS MODES DE PENETRATION

Bien que certains agents pathogènes, comme la bactérie *Xylella fastidiosa* (Nadarasah and Stavrinos, 2011), atteignent passivement l'intérieur de la plante au moyen de vecteurs comme des insectes, les deux modes de pénétration classiquement employés par les agents pathogènes sont la pénétration directe des surfaces végétales ou la pénétration indirecte par exploitation des ouvertures naturelles et des blessures en surface de la plante (Misaghi, 1982; Agrios, 2005; Boddy, 2016). La pénétration directe de la cuticule et/ou des parois cellulaires végétales est le mode d'entrée le plus communément retrouvé chez les agents pathogènes filamenteux (Mendgen et al., 1996; Agrios, 2005). Les bactéries, quant à elles, ne sont pas capables de percer une brèche dans les tissus végétaux. Elles, et certains agents pathogènes filamenteux comme les rouilles (Voegelé, 2006; Boddy, 2016; Solanki et al., 2019), exploitent donc exclusivement les blessures et/ou les ouvertures naturelles présentes en surface des plantes (Misaghi, 1982; Agrios, 2005). Parmi les ouvertures naturelles, les plus représentées en surface des plantes et donc les plus exploitées comme voies d'entrée sont les **stomates** – des pores formés par une paire de cellules de garde – dont l'ouverture et la fermeture finement régulées permettent de contrôler les échanges de gaz et d'eau à la surface de la feuille (Misaghi, 1982; Agrios, 2005; Buckley, 2019).

Que le mode de pénétration soit direct ou indirect, les agents pathogènes ont développé un ensemble diversifié de stratégies pour contourner des barrières végétales structurales et physiologiques et s'introduire à l'intérieur de la plante.

1.2.2. LES MOLECULES D'AIDE A LA PENETRATION

Les stratégies de pénétration des agents pathogènes reposent en grande partie sur la sécrétion de molécules avec des rôles variés. Dans de nombreux cas, les agents pathogènes sécrètent, en quantité plus ou moins importante, différents effecteurs dont une partie est représentée par les

enzymes de dégradation des parois (« plant cell wall degrading enzymes », PCWDE). Ces PCWDE incluent par exemple des laccases, des cellulases, des pectinases ou des cutinases impliquées dans la dégradation respectivement de la lignine, de la cellulose, de la pectine ou de la cutine composant les parois des cellules végétales et la cuticule des organes aériens (Mendgen et al., 1996; Zeilinger et al., 2016). D'autres types d'effecteurs ont pour fonction de manipuler des processus physiologiques de la plante, notamment la régulation de l'ouverture stomatique. Par exemple, AvrB de *P. syringae*, en induisant l'hyperphosphorylation de la protéine végétale RIN4, régule positivement les pompes à protons AHA1 et AHA2 situées dans les membranes des cellules de garde et impliquées dans l'ouverture stomatique (Liu et al., 2009, 2011). Des composés de nature non-protéique – des métabolites par exemple – sont également produits par les agents pathogènes et ont pour rôle la dérégulation de l'ouverture stomatique ou la création de blessures à la surface des plantes. Parmi eux, les plus connus sont les phytotoxines coronatine et syringoline A sécrétées par *P. syringae* (Melotto et al., 2006; Melotto and Kunkel, 2013), mais on peut également citer la phytotoxine fusicoccine ou le métabolite acide oxalique produits respectivement par les champignons *Fusicoccum amygdali* (Turner and Graniti, 1969) et *Sclerotinia sclerotiorum* (Guimarães and Stotz, 2004), qui tous induisent l'ouverture des stomates ou empêchent leur fermeture. Enfin, certains agents pathogènes, comme les bactéries *P. syringae*, *Xanthomonas campestris* ou *Pantoea ananatis*, produisent des agents de nucléation de la glace qui, à basses températures, entraînent des dommages à la surface de la plante pour faciliter leurs passages dans les tissus végétaux internes (Pfeilmeier et al., 2016).

1.2.3. LES STRUCTURES SPECIALISEES DANS LA PENETRATION

Les stratégies de pénétration des agents pathogènes filamenteux reposent également en partie sur le développement de structures plus ou moins spécialisées (Mendgen et al., 1996). Certains organismes filamenteux subissent une modification seulement mineure de leurs hyphes, avec par exemple un gonflement des hyphes, comme chez *Cladosporium fulvum* qui pénètre par des stomates ouverts (Thomma et al., 2005) ; avec à l'inverse le développement de micro-hyphes, comme chez *Ustilago maydis* où les hyphes sont restreints à 1/5 de leurs tailles avant pénétration de la cuticule (Snetselaar and Mims, 1994) ; ou encore avec l'agrégation d'hyphes formant des « infections cushions » comme c'est le cas des champignons racinaires *Fusarium oxysporum* et *Rhizoctonia solani* (Mendgen et al., 1996). De nombreux autres organismes filamenteux sont capables de différencier, à l'extrémité des tubes germinatifs ou des hyphes de surface, des structures appelées appressoria qui sont hautement spécialisées dans la pénétration des tissus végétaux. Ces appressoria sont plus ou moins complexes, unicellulaires ou

multicellulaires, et dans les cas les plus spécialisés, comme ceux de *Magnaporthe oryzae* ou de *Colletotrichum lindemuthianum*, renforcés par mélanisation (Mendgen et al., 1996; Veneault-Fourrey et al., 2005; Meng et al., 2009; Boddy, 2016). Ces appressoria, dont émergent des hyphes de pénétration fin (« penetration peg »), peuvent exercer une pression de turgescence importante – 8 MPa pour ceux de *M. oryzae* – qui permet, avec l'action de PCWDE, de rompre la cuticule des organes aériens et des parois des cellules végétales (Mendgen et al., 1996; Agrios, 2005; Meng et al., 2009; Boddy, 2016).

1.3. L'ETAPE DE COLONISATION

Après pénétration dans les tissus végétaux, un agent pathogène doit parvenir à s'établir dans un environnement végétal inhospitalier et à en exploiter les ressources afin de se reproduire. C'est généralement lors de cette troisième étape de la pathogénèse, la colonisation, que les premiers symptômes de la maladie apparaissent. Durant cette étape, le lieu et le type d'interaction de l'agent pathogène avec la plante diffèrent considérablement selon la combinaison plante - agent pathogène (Agrios, 2005; Boddy, 2016). Les bactéries par exemple se développent soit dans les espaces intercellulaires foliaires ou racinaires (bactéries apoplasmiques), soit dans le système vasculaire des végétaux (bactéries vasculaires), mais sont rarement capables de se développer intracellulairement (Fatima and Senthil-Kumar, 2015; Leonard et al., 2017) tandis que les organismes filamenteux sont eux capables de se développer inter- ou intracellulairement, souvent les deux (Agrios, 2005). Quel que soit le lieu de colonisation (intra- ou intercellulaire), les stratégies de nutrition, les effets sur l'hôte et les symptômes induits par les agents pathogènes sont très variés (FIGURE 1.3). Aux deux extrêmes, les **biotrophes** et les **nécotrophes** opèrent de façons très différentes. Entre les deux, un troisième groupe d'agents pathogènes, les **hémibiotrophes**, partage des caractéristiques des deux précédents groupes – une phase initiale de biotrophie suivie d'une phase de colonisation nécotrophique (Singh and Singh, 2018).

1.3.1. BIOTROPHIE

Les mécanismes de colonisation des agents pathogènes biotrophes – comme les champignons des rouilles (*Uromyces* spp, *Puccinia* spp...), les agents responsables des oïdiums (*Blumeria graminis*, *Plasmopara viticola*...) ou les bactéries *Xanthomonas* spp. (Boddy, 2016) – sont souvent qualifiés de « sophistiqués » et « discrets ». Ce groupe d'agents pathogènes établit en effet des relations « longue durée » avec des cellules végétales vivantes, notamment au moyen d'effecteurs sécrétés stimulant et détournant le métabolisme de leur hôte tout en évitant, voire supprimant, leurs défenses.

Les biotrophes – et hémibiotrophes dans la phase initiale de colonisation – adoptent globalement quatre stratégies de nutrition (Fatima and Senthil-Kumar, 2015; Boddy, 2016) : (i) l'absorption de nutriments directement assimilables présents dans les tissus végétaux à l'aide de transporteurs passifs ou actifs ; (ii) la conversion de composés non assimilables en nutriments assimilables ; (iii) une sécrétion locale et strictement régulée de PCWDE pour le relargage de nouveaux nutriments assimilables et (iv) la sécrétion d'effecteurs ciblant différentes composantes de la machinerie cellulaire végétale, modulant ainsi à leur avantage les hormones et le métabolisme de la plante. Ces effecteurs sont sécrétés dans l'apoplasme (effecteurs apoplasmiques) ou dans le cytoplasme des cellules végétales (effecteurs cytoplasmiques) à l'aide de systèmes élaborés (Macho, 2016; Mapuranga et al., 2022). Une grande partie des biotrophes filamenteux peuvent par exemple différencier des structures d'infection spécialisées dans la nutrition et dans la sécrétion d'effecteurs cytoplasmiques, telles que des haustoria se positionnant dans l'espace périplasmique entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique des cellules de la plante (Koeck et al., 2011; Mapuranga et al., 2022).

Un grand nombre d'effecteurs apoplasmiques et cytoplasmiques sécrétés par les agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes ont aussi des rôles dans l'évasion, ou la suppression des défenses de la plante (Macho, 2016; Pfeilmeier et al., 2016; Mapuranga et al., 2022). Certains, comme les effecteurs apoplasmiques Avr4 et Ecp6 de *Cladosporium fulvum* (Jaswal et al., 2020), masquent la présence de l'agent pathogène ; d'autres, comme l'effecteur apoplasmique PNPi de *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*, contrent les mécanismes de défenses végétaux en interagissant avec les protéines de défense (Koeck et al., 2011), quand d'autres encore, comme l'effecteur cytoplasmique CSEP0064 chez *Blumeria graminis*, inhibent les défenses de la plante en régulant la transcription de molécules de défenses ou en dégradant les transcrits correspondants (Jaswal et al., 2020).

1.3.2. NECROTROPHIE

Les mécanismes de colonisation des agents pathogènes nécrotrophes – comme les champignons des pourritures *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* ou le champignon des flétrissures *Fusarium oxysporum* (Boddy, 2016) – et des agents pathogènes hémibiotrophes durant leur seconde phase de colonisation sont souvent décrits comme moins complexes et reposant sur une approche par « force brute » conduisant à la mort des cellules végétales et, par conséquent, au relargage de nutriments exploitables par le microorganisme (Shao et al., 2021). En réalité, ces agents pathogènes sécrètent un arsenal très diversifié de facteurs de pathogénicité pour parvenir à exploiter les ressources de la plante.

En plus de sécréter massivement diverses PCWDE pour dégrader les parois cellulaires végétales (Fatima and Senthil-Kumar, 2015; Boddy, 2016), les agents pathogènes nécrotrophes produisent des toxines, des effecteurs et d'autres protéines phytotoxiques spécifiques à l'hôte ou large spectre. Ces molécules ont divers modes d'action – comme la production ROS (« Reactive Oxygen Species ») ou la perméabilisation des membranes plasmiques – qui conduisent à la mort physiologique (nécrose) des cellules végétales (Horbach et al., 2011; Boddy, 2016). Les NLPs (« Necrosis and ethylene-inducing like proteins »), initialement caractérisées chez *Fusarium oxysporum*, représentent par exemple un groupe de protéines phytotoxiques interférant avec l'intégrité des membranes plasmiques (Laluk and Mengiste, 2010). La mort physiologique des cellules végétales induit le relargage de nombreux composés dérivés des plantes et toxiques pour les agents pathogènes (Shao et al., 2021). D'autres groupes de protéines sécrétées ont donc pour rôle de détoxifier l'environnement de l'agent pathogène, comme par exemple le transporteur *BcAtrB* de *Botrytis cinerea* qui permet d'exporter la camalexine qui est un métabolite toxique pour le champignon (Westrick et al., 2021).

Enfin, au-delà de la production de composés toxiques induisant la mort physiologique des cellules végétales, certains agents pathogènes nécrotrophes sont capables de manipuler les défenses de la plante afin de provoquer la mort génétiquement programmée des cellules végétales. C'est le cas par exemple de *Parastagnospora nodorum* qui sécrètent les effecteurs SnTox2-8 agissant comme des activateurs de la mort cellulaire programmée de type apoptotique en ciblant notamment les gènes de blé *Snn2-8* (alors qualifiés de gènes de sensibilité) (Shao et al., 2021).

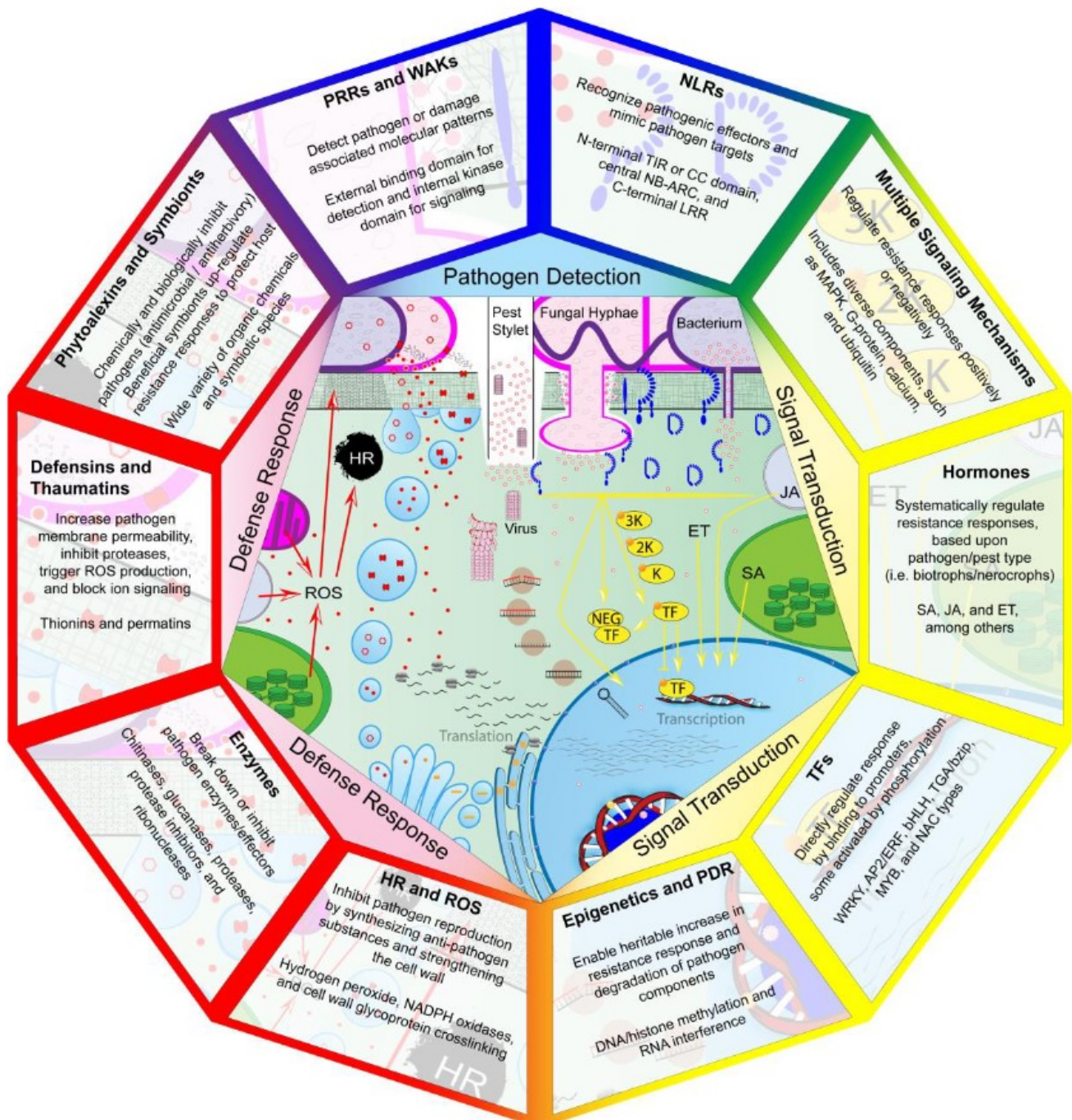


FIGURE 2. COMPOSANTS DES MECANISMES DE DEFENSES DES PLANTES.

En bleu, les composants impliqués dans la reconnaissance de l'agent pathogène. En jaune, les composants impliqués dans la transduction du signal. En rouge, les composants impliqués dans les réponses de défenses induites.

PRR = pattern recognition receptors ; WAK = wall-associated kinase ; NLR = nucleotide-binding domains and leucine-rich repeats ; SA= acide salicylique ; JA = acide jasmonique ; ET= éthylène ; TFs= transcription factors ; PDR = pathogen-derived resistance ; HR = hypersensitive response.

Figure issue de (Andersen et al., 2018).

2. LES MECANISMES DE DEFENSES DES PLANTES

La surface de la plante, première barrière rencontrée par un agent pathogène, est considérée comme un système de défense préexistant, ou constitutif, dans la mesure où elle empêche l'adhésion et/ou la pénétration d'un grand nombre de micro-organismes (Reignault and Sancholle, 2005; Muthamilarasan and Prasad, 2013; Chakraborty et al., 2017). Ce système de défense constitutif inclut des barrières structurelles (cuticule, couches de cires, trichomes, parois cellulaires rigides...) et chimiques, avec une variété de composés antimicrobiens (composés sulfurés, saponines...) présents en surface de la plante sous leur forme active. Les agents pathogènes ont toutefois développé des stratégies capables de contourner ces défenses végétales constitutives, par exemple avec la sécrétion de PCWDE (Introduction – Section 1). En réponse aux stratégies d'infection variées des agents pathogènes, les plantes ont également dû développer des mécanismes de défenses variés (FIGURE 2). Le premier enjeu rencontré par la plante est de reconnaître la présence d'un agent pathogène afin d'activer son système de défense dit induit. Une fois la présence d'un agent pathogène reconnue, un deuxième enjeu rencontré par la plante est la mise en place de réponses de défenses, c'est-à-dire de nouvelles barrières physiques et chimiques susceptibles d'interrompre l'agent pathogène dans sa pathogénèse. Mettre en place et entretenir de tels mécanismes de défenses – comprenant la reconnaissance de l'agent pathogène et l'activation d'une ou plusieurs réponses de défense – s'accompagne souvent d'un coût énergétique plus ou moins important pour une plante et se fait au détriment de sa croissance et de sa reproduction (Huot et al., 2014). Ces mécanismes doivent donc être orchestrés minutieusement à la fois dans le temps et l'espace.

2.1. LA RECONNAISSANCE DES AGENTS PATHOGENES

La première étape de la mise en place d'un mécanisme de défense est la reconnaissance de l'agent pathogène, en d'autres termes du « soi » et du « non-soi ». Les plantes possèdent un système de surveillance complexe reposant sur des récepteurs protéiques appelés IPRs (« Invasion Patterns Receptors »). Les IPRs sont ainsi capables de reconnaître des signaux de danger, ou « Invasion Molecules » (IMs), et d'initier la transduction du signal perçu en réponses de défenses (Kourelis and van der Hoorn, 2018).

2.1.1. LES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE

Les IPRs peuvent être classés en deux groupes, les CSIRs (« Cell Surface Immune Receptors ») (anciennement appelés PRR, « Pattern Recognition Receptors ») et les IIRs (« Intracellular Immune Receptors »), qui sont distincts par leurs localisations, leurs natures et leurs

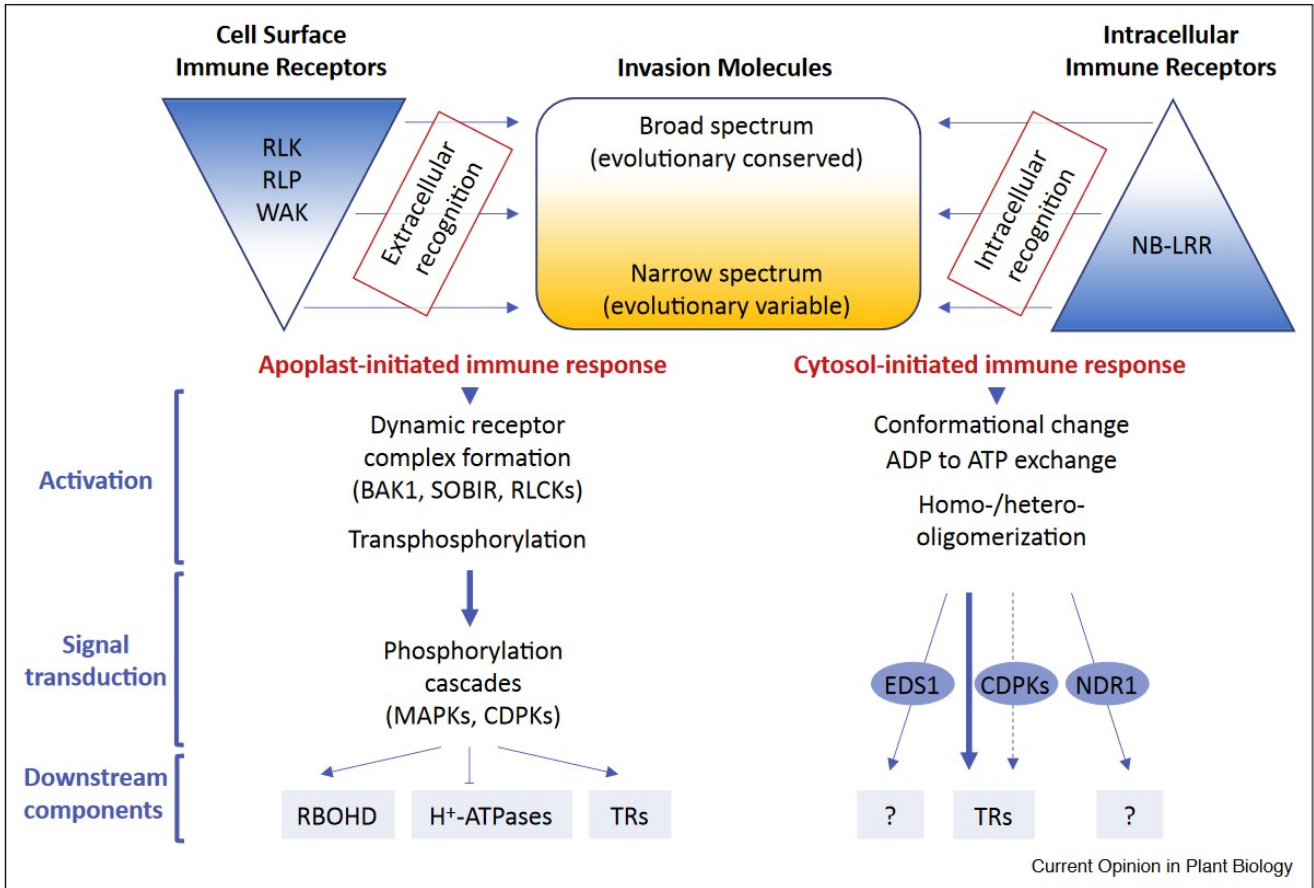


FIGURE 3. MODELE D'INVASION SPATIAL DE L'IMMUNITE DES PLANTES.

La reconnaissance de l'agent pathogène se fait par la détection de signaux de danger (Invasion Molecules) *via* deux types de récepteurs, les CSIRs (Cell Surface Immune Receptors) et les IIR (Intracellular Immune Receptors), distincts par leurs natures moléculaires, leurs localisations, et leurs mécanismes d'activation.

Figure issue de (Kanyuka and Rudd, 2019).

mécanismes d'activation (**FIGURE 3**) (Cook et al., 2015; Kanyuka and Rudd, 2019; van der Burgh and Joosten, 2019).

2.1.1.1 LES RECEPTEURS DE SURFACE (CSIRs)

Les récepteurs du premier groupe, les CSIRs, sont des récepteurs transmembranaires capables de reconnaître une grande diversité de signaux extracellulaires (Kanyuka and Rudd, 2019; Schellenberger et al., 2019). La diversité de signaux perçus par ces récepteurs reflète la nature variée de leurs domaines extracellulaires – nature représentant un premier critère de classification des CSIRs (Schellenberger et al., 2019). Parmi les 14 types de domaines extracellulaires identifiés jusqu'à présent, les LRR (« Leucine-Rich Repeat »), qui lient majoritairement des IMs protéiques, sont les plus représentés dans l'immunité et les mieux caractérisés (Schellenberger et al., 2019; Jose et al., 2020). Les CSIRs sont également classés selon la présence ou l'absence d'un domaine kinase intracellulaire : les RLKs (« Receptor-like Kinases ») en possèdent un tandis que les RLPs (« Receptor-like Proteins ») en sont dépourvus.

Le mécanisme d'activation des défenses gouvernées par ces récepteurs de surface repose sur le recrutement de co-récepteurs membranaires (autres RLKs ou RLPs) ou cytoplasmiques (RLCKs, « Receptor-like cytoplasmic kinases ») conduisant à la formation de complexes protéiques, appelés complexes immunitaires. Des événements de phosphorylation – strictement régulés pour moduler l'activation et l'intensité des réponses de défenses – sont alors initiés au sein de ces complexes immunitaires, et initient à leur tour une cascade de phosphorylation intracellulaire aboutissant à l'activation de multiples acteurs des défenses (Tang et al., 2017; Kanyuka and Rudd, 2019). Un des CSIRs les mieux caractérisés est la LRR-RLK FLS2 qui forme un complexe immunitaire avec la LRR-RLK BAK1 et la RLCK BIK1 (entre autres). Après liaison à l'IM protéique flg22 dérivé de bactéries, BAK1 phosphoryle BIK1, qui à son tour phosphoryle FLS2 et BAK1, se dissocie du complexe immunitaire et active des réponses défenses et notamment la fermeture stomatique (Introduction – Section 2.2.2) (Li et al., 2014; Macho and Zipfel, 2014).

2.1.1.2 LES RECEPTEURS INTRACELLULAIRES (IIRs)

Les récepteurs du deuxième groupe, les IIRs, sont des récepteurs intracellulaires capables de reconnaître des signaux protéiques intracellulaires (Kanyuka and Rudd, 2019). Ces récepteurs intracellulaires appartiennent à la grande famille des NBS-LRR (« Nucleotide-Binding Site and Leucine-Rich Repeat domains ») et sont de deux types selon la présence ou non d'un motif TIR (« toll/interleukin-1 receptor-like ») à leurs extrémités N-terminal : TIR-NBS-LRR et non-TIR-

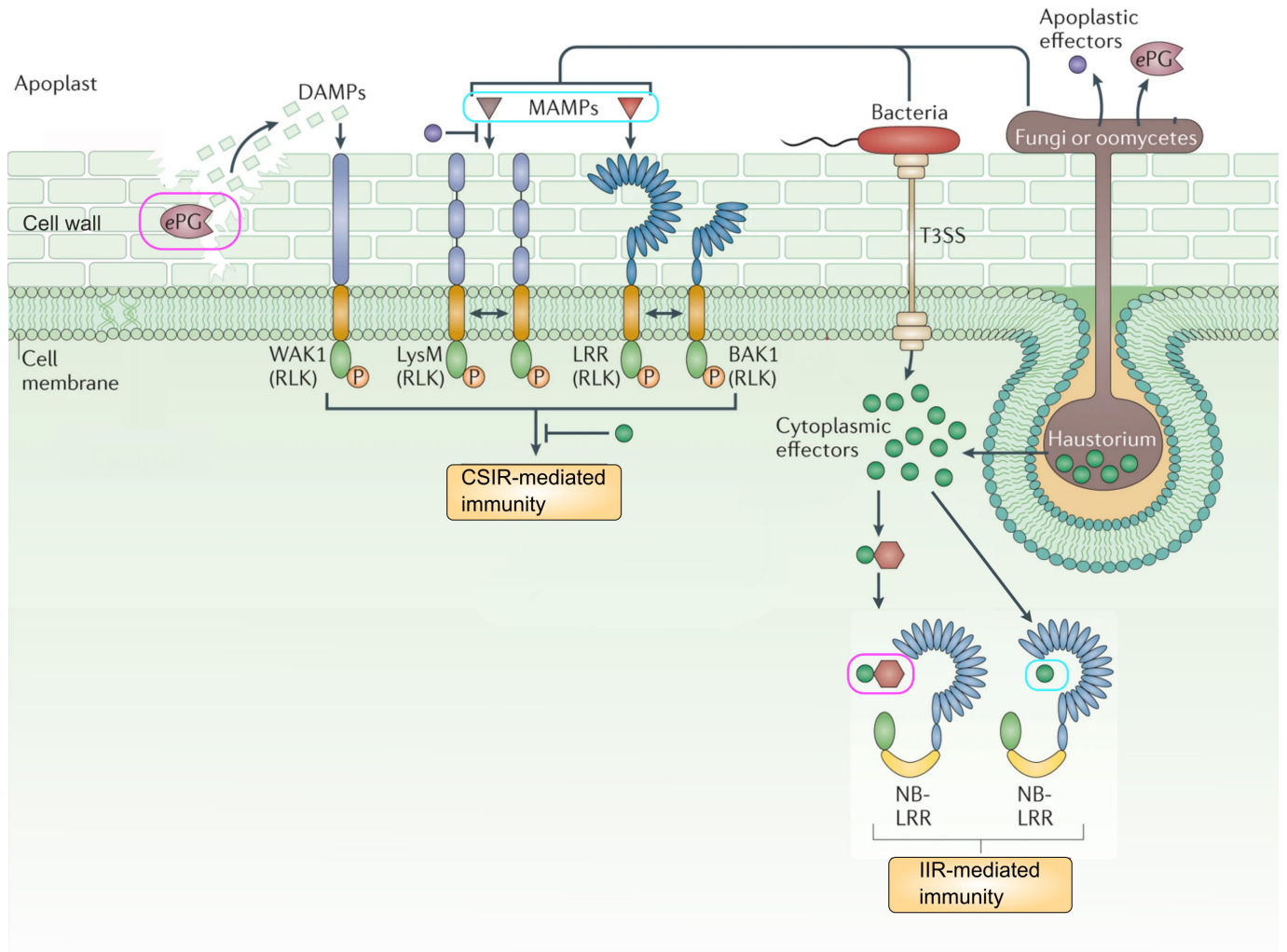


FIGURE 4. SIGNAUX DE DANGER RECONNUS PAR LES RECEPTEURS DE L'IMMUNITE.

Les agents pathogènes produisent des effecteurs apoplasmiques ou cytoplasmiques, qui sont reconnus par les IPRs soit de façon directe (reconnaissance du « non-soi », cercles bleus), soit de façon indirecte en interagissant avec des protéines végétales ou en dégradant des composés végétaux (reconnaissance des perturbations du « soi », cercles roses).

PAMP / MAMP = pathogen- or microbe-associated molecular patterns ; DAMP = damage-associated molecular patterns ; RLK = receptor-like kinase ; ePG = enzymes de dégradation ; T3SS = système de sécrétion de type 3.

Figure adaptée de (Wirthmueller et al., 2013).

NBS-LRR (Dubey and Singh, 2018). En absence d'IMs, ces IIRs sont maintenus dans un état d'auto-inhibition par des interactions intramoléculaires. A la suite de la perception d'un IM, un changement de conformation a lieu au sein de l'IIR qui est alors capable d'échanger de l'ADP contre de l'ATP. La liaison à l'ATP induit un second changement de conformation qui conduit à l'oligomérisation de l'IIR ainsi activé (Burdett et al., 2019). Le complexe formé par l'oligomérisation de l'IIR est appelé résistosome et est responsable de l'activation des réponses de défenses de la plante, notamment de la réponse hypersensible (HR) (Muthamilarasan and Prasad, 2013; Dubey and Singh, 2018).

2.1.2. LES SIGNAUX DE DANGER

Les IPRs sont capables de reconnaître des IMs issus non seulement de l'agent pathogène lui-même (détection du « non-soi », reconnaissance directe), mais également des perturbations subies par la plante lors de la pathogénèse (détection des perturbations du « soi », reconnaissance indirecte) (FIGURE 4).

2.1.2.1 RECONNAISSANCE DU « NON-SOI »

Les composés structuraux des agents pathogènes constituent une première classe d'IMs perçus comme du « non-soi » et sont appelés PAMPs ou MAMPs (« Pathogen- or Microbe-Associated Molecular Patterns »). Ces PAMPs et MAMPs – exposés en surface de l'agent pathogène ou sous forme de monomères dans l'apoplasme du fait de dommages causés à l'agent pathogène – sont reconnus de façon apoplasmique par les CSIRs en se liant directement à leurs domaines extracellulaires (reconnaissance directe) (Boller and Felix, 2009; Kourelis and van der Hoorn, 2018; Schellenberger et al., 2019). Le PAMP le plus étudié et le mieux caractérisé est la flagelline, une sous-unité composant les flagelles de plusieurs bactéries. Un fragment de 22 acides aminés de la flagelline (flg22) est ainsi perçu par la LRR-RLK FLS2 chez plusieurs espèces de plantes, tandis que chez la tomate, c'est un autre fragment (flgII-28) qui est reconnu par la LRR-FLS3 (Schellenberger et al., 2019). Elf18 (composant du facteur d'élongation Tu), les peptidoglycanes (constituants principaux de la paroi) et les lipopolysaccharides (composants de la matrice extracellulaire) sont d'autres IMs structuraux bactériens reconnus par des CSIRs (Zipfel, 2014; Schellenberger et al., 2019). Pour les agents pathogènes filamenteux, c'est la chitine, composante principale des parois fongiques, qui représente le PAMP le plus étudié. Cette chitine est reconnue par des LysM-RLKs ou des LysM-RLPs divers, dont les représentants les plus étudiés sont la LysM-RLP CEBiP et la LysM-RLK CERK1 (Lee et al., 2014; Zipfel, 2014).

Une deuxième classe d'IMs perçus comme du « non-soi » par liaison directe avec les IPRs sont les effecteurs sécrétés par les agents pathogènes. Puisque ces effecteurs sont sécrétés dans l'apoplasme ou dans le cytoplasme des cellules végétales (Introduction – Section 1), ils sont reconnus aussi bien par des CSIRs que par des IIRs. Par exemple, un fragment des effecteurs conservés NLPs (nlp20) et une PCWDE fongique de type xylanase sont reconnus respectivement par le CSIR RLP23 et la LRR-RLP Eix2 chez la tomate (Kourelis and van der Hoorn, 2018; Schellenberger et al., 2019), tandis que les effecteurs PopP2 et AVR-Pita, deux protéases putatives sécrétées respectivement par la bactérie *Ralstonia solanacearum* et le champignon *Magnaporthe oryzae*, sont reconnus respectivement par les NBS-LRR RRS1-R chez *Arabidopsis* (Deslandes et al., 2003) et Pi-Ta chez le riz (Jia et al., 2000).

2.1.2.2 RECONNAISSANCE DES PERTURBATIONS DU « SOI »

Un grand nombre d'IPRs détectent, plutôt que des molécules du « non-soi » par reconnaissance directe, les perturbations du « soi » liées à l'invasion par l'agent pathogène. Ce mécanisme de reconnaissance indirecte fait l'objet d'un modèle appelé « Leurres et Gardes » (« Decoy and Guardes ») ou « Guard Model » et repose sur la reconnaissance d'un composé végétal modifié par un effecteur (Spoel and Dong, 2012; Kourelis and van der Hoorn, 2018). Par exemple, le changement de conformation de la protéine végétale RIN4, qui fait suite à l'hyperphosphorylation de RIN4 induite par l'AvrB de *P. syringae* (Introduction – Section 1.2.2), est reconnue par le NBS-LRR RPM1 qui active des réponses de défenses (Kourelis and van der Hoorn, 2018). Plus souvent décrit pour les NBS-LRR (Spoel and Dong, 2012), ce mécanisme de reconnaissance indirecte par surveillance de protéines végétales est également retrouvé chez les CSIRs. C'est le cas par exemple pour la LRR-RLP Cf-2 de tomate, qui reconnaît la présence d'isolats de *Cladosporium fulvum* sécrétant l'effecteur Avr2 en « surveillant » sa cible, la protéase Rcr3 (Kourelis and van der Hoorn, 2018). Enfin, si ce modèle de « garde » est plutôt associé dans la littérature à une surveillance de protéines végétales, d'autres composés végétaux peuvent faire l'objet de surveillance par les IPRs. Les CSIRs sont en effet capables de reconnaître des composés, appelés DAMPs (« Damage-Associated Molecular Pattern »), issus de la dégradation de plusieurs types de molécules du « soi » par l'agent pathogène (Boller and Felix, 2009; Hou et al., 2019). La RLK WAK1 chez *Arabidopsis thaliana* reconnaît par exemple des oligogalacturonides issus de la dégradation par des PCWDE de la pectine contenue dans la paroi végétale (Stephens et al., 2022).

2.2. LES REPONSES DE DEFENSE CHEZ LES PLANTES

À l'instar des stratégies d'infection des agents pathogènes, les réponses de défenses des plantes induites par les IPRs suite à la reconnaissance de l'agent pathogène sont variées (FIGURE 2) et visent à contrôler, par effet miroir avec la pathogénèse, le développement épiphyte de l'agent pathogène, son entrée dans les tissus végétaux et/ou sa colonisation (Zhang et al., 2020).

2.2.1. LES REPONSES DE DEFENSES CONTRE LES ETAPES PRE-PENETRATION

Les réponses de défenses visant à contrôler les étapes pré-pénétration reposent principalement sur la mise en place de barrières chimiques, avec la sécrétion ou l'émission vers la surface de composés répulsifs et/ou antimicrobiens qui ont pour but de réguler l'attraction, l'adhésion, la germination et/ou le développement épiphyte des agents pathogènes (Zhang et al., 2020). Les racines par exemple sécrètent un mucilage protecteur composé de diverses molécules, d'ADN extracellulaire et de cellules vivants « détachées » («border cells») et impliqué dans les défenses contre les agents pathogènes du sol, comme l'oomycète *Aphanoyces euteiches* (Cannesan et al., 2012; Driouich et al., 2013) ou le champignon *Nectria haematococca* (Wen et al., 2009).

Plusieurs réponses de défenses liées à la sécrétion ou l'émission de composés antimicrobiens en surface sont aussi impliquées dans le contrôle des étapes pré-pénétration de la pathogénèse des agents pathogènes foliaires (Pasechnik et al., 1997; Neri et al., 2007; Quintana-Rodriguez et al., 2015; Montilla-Bascón et al., 2016; Lazazzara et al., 2018; Ricciardi et al., 2021). En réponse au champignon *Puccinia coronata*, des feuilles d'un cultivar résistant d'avoine sécrètent par exemple en surface des polyamines libres, telles que l'agmatine, la spermine et la spermidine, à plus forte concentration que les feuilles d'un cultivar sensible (Montilla-Bascón et al., 2016). Ces polyamines libres, lorsqu'appliquées de façon exogène, augmentent la résistance pré-pénétration du cultivar sensible, possiblement en inhibant le développement du tube germinatif fongique, son tropisme et la différenciation de ses appressoria (Montilla-Bascón et al., 2016). Une étude des composés organiques volatiles (COVs) émis par la vigne en réponse à l'oomycète *Plasmopara viticola* constitue un autre exemple et a révélé une plus grande abondance de COVs, tels que les terpenoïdes, chez les cultivars résistants comparés au cultivar sensible testé ainsi qu'un effet inhibiteur direct de certains de ces COVs sur le développement de l'agent pathogène (Lazazzara et al., 2018).

2.2.2. LES REPONSES DE DEFENSES CONTRE L'ETAPE DE PENETRATION

Les principales réponses de défenses mises en place pour contrôler l'étape de pénétration reposent elles sur des barrières physiques, avec d'une part le renforcement des parois végétales et d'autre part – pour les agents pathogènes dont le mode d'entrée est le stomate – la régulation de l'ouverture stomatique.

2.2.2.1 RENFORCEMENT DES PAROIS VEGETALES

En réponse à la reconnaissance d'un agent pathogène, divers processus de renforcement de la paroi sont mis en place par la plante, dont le renforcement oxydatif des liaisons entre composants de la paroi (Lamb and Dixon, 1997; Hückelhoven, 2007) ou l'apposition de protéines, de polymères de renforcement et de composés antimicrobiens dans la paroi (Hückelhoven, 2007; Underwood, 2012; Malinovsky et al., 2014). La lignine, un des polymères phénoliques apposés à la paroi, protège la paroi à la fois contre la pression mécanique exercée par l'agent pathogène au moment de l'étape de pénétration, et à la fois contre les PCWDE sécrétées par l'agent pathogène, en donnant des propriétés hydrophobes à la paroi (Hückelhoven, 2007). L'apposition locale de matériel de renforcement de la paroi au niveau du site d'attaque d'un agent pathogène filamenteux est appelée papille. La composition des papilles varie d'une espèce de plante à l'autre mais inclut majoritairement de la callose ainsi que d'autres composés comme des polymères phénoliques, des ROS, des protéines et d'autres polysaccharides (Hückelhoven, 2007; Underwood, 2012; Malinovsky et al., 2014).

Le rôle exact du renforcement de la paroi dans la résistance à la pénétration demeure toutefois encore incertain puisqu'il n'existe pas d'évidences directes de l'arrêt de l'agent pathogène par cette réponse elle-même (Hückelhoven, 2007; Chowdhury et al., 2014). Il a tout de même été suggéré que ces mécanismes de renforcement étaient cruciaux dans la mesure où ils constitueraient une barrière physique qui ralentirait l'agent pathogène dans sa pathogénèse et permettrait à la plante de mettre en place d'autres réponses de défenses (Assaad et al., 2004; Hückelhoven, 2007; Bhuiyan et al., 2009; Ellinger et al., 2013; Chowdhury et al., 2014, 2017).

2.2.2.2 IMMUNITE STOMATIQUE

Pour les agents pathogènes qui utilisent les ouvertures naturelles comme voies d'entrée, une autre barrière physique rencontrée est le stomate. Il a longtemps été considéré que les stomates étaient des voies d'entrée passives pour les agents pathogènes. En 2006, Melotto et al. démontrent pour la première fois que les stomates se ferment activement en réponse à *Pseudomonas syringae* pour empêcher l'entrée de cette bactérie dans les tissus d'*A. thaliana*,

et que *P. syringae* sécrète en retour une toxine, la coronatine, permettant de contrer cette fermeture stomatique (Melotto et al., 2006). Cette bataille pour le contrôle de l'ouverture stomatique entre plante et agent pathogène illustre le rôle clé que jouent les stomates dans l'immunité. Depuis, cette réponse de défense, référée en tant qu'immunité stomatique, a été décrite chez de nombreux autres pathosystèmes bactériens et fongiques (Chen and Howlett, 1996; Grimmer et al., 2012; Arnaud and Hwang, 2015; Ye et al., 2020; Yang et al., 2021).

L'immunité stomatique dépend de deux mécanismes physiologiques distincts : la fermeture des stomates et la mort des cellules de garde (Ye et al., 2020; Wang and Gou, 2021). Le premier mécanisme, médié par les CSIRs, repose sur l'activation de diverses voies de signalisation (ABA, ROS, Ca^{2+} ...) conduisant à l'activation de canaux anioniques dans les cellules de garde (Kimura et al., 2017; David et al., 2019; Wang and Gou, 2021; Rodrigues and Shan, 2022). Par exemple, en réponse à flg22, le complexe immunitaire FLS2/BAK1/BIK1 phosphoryle la protéine OST1 pour activer la protéine SLAC1 servant de canal anionique (Wang and Gou, 2021). Le récepteur immunitaire CERK1 active également OST1 et SLAC1 en réponse à la chitine (Ye et al., 2020), mais peut aussi se servir de la cascade de phosphorylation MAPK, des ROS et du Ca^{2+} comme voies de signalisation pour activer d'autres canaux anioniques (Ye et al., 2020; Wang and Gou, 2021). L'activation des canaux anioniques conduit à un efflux d'anions, une dépolarisation de la membrane plasmique et en conséquence une perte de turgescence des cellules de garde, qui ferment alors le stomate. Le mécanisme de l'immunité stomatique par mort des cellules de garde a été lui aussi observé à plusieurs reprises (Chen and Howlett, 1996; Pujol et al., 2016; Ye et al., 2020) mais – même s'il a été proposé une implication du Ca^{2+} et des CDPKs (« Calcium-dependent protein kinases ») (Ye et al., 2020) – les acteurs moléculaires et voies de signalisation mis en jeu ne sont pas encore connus.

Enfin, il est à noter que, bien qu'initialement associés à une résistance à la pénétration, les stomates ont plus récemment été montrés comme impliqués dans une résistance post-pénétration. Il a en effet été démontré que certains agents pathogènes refermaient les stomates derrière eux après leur entrée dans les tissus pour créer un environnement apoplasmique aqueux favorable à leurs multiplications (Wang et al., 2020; Roussin-Léveillé et al., 2022; Wu and Liu, 2022) et qu'en réponse, les plantes réouvraient les stomates afin de les priver d'eau et limiter leurs multiplications (Zhang et al., 2019; Liu et al., 2022c; Wu and Liu, 2022).

2.2.3. LES REPONSES DE DEFENSES CONTRE L'ETAPE DE COLONISATION

Certains agents pathogènes parviennent à entrer dans les tissus de la plante malgré les premières lignes de défense mises en jeu pour prévenir l'étape de pénétration (Introduction – Section 1.2). Ils sont alors confrontés à des réponses de défenses visant à contrôler leur propagation dans les tissus. Si le renforcement de la paroi végétale est, comme pour la résistance à la pénétration, une barrière physique probablement impliquée dans la limitation de la propagation de l'agent pathogène, d'autres réponses de défenses sont induites dans les tissus végétaux, comme le burst oxydatif, la production de molécules antimicrobiennes ou encore, dans les cas les plus extrêmes, la réponse hypersensible.

2.2.3.1 LE BURST OXYDATIF

Le burst oxydatif, caractérisé par une accumulation intra- et intercellulaire intense et rapide de ROS (« Reactive Oxygen Species »), est l'une des premières réponses faisant suite à la perception d'un agent pathogène (Wojtaszek, 1997; Chakraborty et al., 2017). Les principales sources de ROS durant les stresses biotiques proviennent des NADPH/NADH oxydases, localisées dans la membrane plasmique, et des peroxydases, localisées dans la paroi végétale, qui sont activées par les IPRs en réponse à la reconnaissance d'un agent pathogène (Lamb and Dixon, 1997; Doehlemann and Hemetsberger, 2013; Kimura et al., 2017). En plus de leurs rôles dans le renforcement de la paroi végétale, dans l'immunité stomatique et dans la signalisation de l'immunité, les ROS ont un effet antimicrobien direct sur les agents pathogènes, en impactant notamment l'intégrité structurelle et fonctionnelle d'un ensemble de biomolécules telles que les protéines, lipides ou acides nucléiques (Lamb and Dixon, 1997; Doehlemann and Hemetsberger, 2013; Andersen et al., 2018; Singh et al., 2021). Une exposition prolongée aux ROS peut ainsi induire la mort cellulaire de l'agent pathogène et/ou des cellules végétales.

2.2.3.2 LES PROTEINES DE DEFENSES

Les protéines de défenses, appelées PR protéines (« Pathogenesis-related proteins »), accumulées dans les espaces intra et intercellulaires, font partie des molécules de défenses essentielles contre les agents pathogènes (Sudisha et al., 2012; Doehlemann and Hemetsberger, 2013; Chakraborty et al., 2017; Zhang et al., 2020). Regroupées en 17 familles (van Loon et al., 2006), ces protéines ont des rôles variés et contribuent, en plus de leur activité antimicrobienne, à la rigidification de la paroi végétale et à la transduction du signal de défense. Parmi elles, on peut citer par exemple la β -1,3-glucanase (PR-2) et les endochitinases PR-3 et PR-4, impliquées respectivement dans la dégradation des glucanes et de la chitine constitutifs de la paroi

fongique, la thaumatine-like protéine PR-5, qui ralentit la croissance des champignons en s'intercalant dans la paroi fongique ou encore la peroxydase PR-9, qui catalyse la lignification des parois végétales et augmente la production de ROS (Sudisha et al., 2012).

Les protéases, capables de catalyser la dégradation d'autres protéines, participent également aux réponses de défenses, comme l'ont démontré plusieurs approches de génétique inverse (Jashni et al., 2015; Andersen et al., 2018; Balakireva and Zamyatnin, 2018; Thomas and Van der Hoorn, 2018; Wang et al., 2020). Les modes d'action précis des protéases dans l'immunité, ainsi que leurs substrats, ne sont cependant pas bien connus, mais il a été proposé qu'elles participeraient à la réduction de l'activité des enzymes fongiques, libèreraient des éliciteurs pour amplifier les défenses et réguleraient différentes voies de signalisation endogènes en interagissant notamment avec les IPRs.

2.2.3.3 LES METABOLITES SECONDAIRES

D'autres classes de molécules de défenses avec une activité antimicrobienne sont les phytoalexines – des métabolites secondaires de faible masse moléculaire synthétisés *de novo* suite à la perception d'un agent pathogène (Chakraborty et al., 2017) – et les phytoanticipines – des métabolites secondaires synthétisés constitutivement et stockés sous forme inactive jusqu'à perception de l'agent pathogène (Ahmad et al., 2011). Ces métabolites, chimiquement diversifiés, sont spécifiques des espèces de plante et non de l'agent pathogène perçu (Ahuja et al., 2012). Parmi les plus connus, on peut citer la phytoalexine camalexine d'*A. thaliana* et son rôle antimicrobien contre de nombreux agents pathogènes dont les champignons nécrotrophe et hémibiotrophe *Botrytis cinerea* et *Leptosphaeria maculans* (Ahuja et al., 2012), ou la phytoanticipine α -tomatine et son rôle antifongique contre *Cladosporium fulvum* (Shin et al., 2014).

2.2.3.4 LA MORT CELLULAIRE DE TYPE HR

Enfin, une dernière réponse de défense importante chez les plantes est la réponse hypersensible, ou HR (« hypersensitive response »). La HR est une forme de mort cellulaire programmée (PCD, « Programmed Cell Death ») associée à une restriction, ou à la mort, de l'agent pathogène et apparaît souvent macroscopiquement sous la forme de lésions nécrotiques localisées et restreintes (Künstler et al., 2016; Balint-Kurti, 2019). Cette réponse de défense contribue de façon importante à la résistance contre les agents pathogènes biotrophes, tandis qu'elle s'avèrerait inefficace – voire même bénéfique – pour les agents pathogènes nécrotrophes

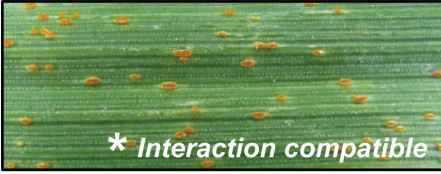
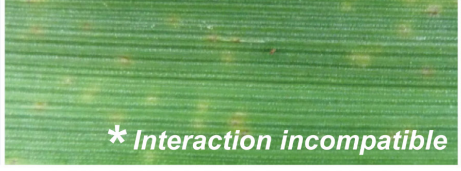
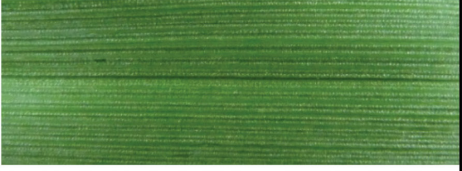
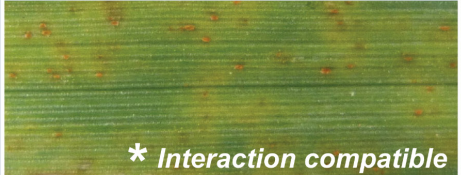

 <p>* <i>Interaction compatible</i></p>	<p>Génétiquement qualitative</p>	<p>Génétiquement quantitative</p>
<p>Phénotypiquement qualitative</p>	<p>Gène majeur conférant une résistance totale</p>  <p>* <i>Interaction incompatible</i></p>	<p>QTLs conférant une résistance totale</p> 
<p>Phénotypiquement quantitative</p>	<p>Gène majeur conférant une résistance partielle</p>  <p>* <i>Interaction compatible</i></p>	<p>QTLs conférant une résistance partielle</p> 

FIGURE 5. QUATRE TYPES D'INTERACTIONS SELON LA NATURE QUANTITATIVE/QUALITATIVE DE LA RESISTANCE, REPARTIS EN FONCTION DES ASPECTS PHENOTYPIQUES ET GENETIQUES DE LA RESISTANCE.

Chaque catégorie est illustrée par un exemple de champignons des rouilles (*Puccinia*) inoculés sur l'orge. En haut à gauche, pour la comparaison, sont illustrés les symptômes résultant d'une interaction avec une accession d'orge sensible. * = concepts d'interaction compatible/incompatible lorsqu'un gène majeur est impliqué dans une relation gène-à-gène avec un agent pathogène.

Figure adaptée de (Niks et al., 2015).

(Künstler et al., 2016; Balint-Kurti, 2019; Pitsili et al., 2020). La HR serait également importante pour l'activation de l'immunité systémique acquise (SAR) (Balint-Kurti, 2019).

Les mécanismes sous-tendant l'activation de la HR sont encore largement inconnus. La HR est une réponse de défense souvent associée à un mécanisme médié par les NBS-LRR (Introduction – Section 2.1.1.2). Il a été suggéré que les résistosomes formés à la suite de l'activation des NBS-LRR induisaient la HR en perméabilisant la membrane plasmique ou en induisant un influx d'ions qui activerait des défenses telles qu'un burst oxydatif intense et qu'une accumulation de sets spécifiques de PR protéines et de protéases exécutrices de mort cellulaire (Künstler et al., 2016; Pitsili et al., 2020). La HR est également une réponse de défense induite par des CSIRs. C'est le cas par exemple de la HR médiée par les gènes *Cf* de tomate, codant pour des LRR RLPs, dans le cadre de la résistance contre *Cladosporium fulvum* (Ökmen and de Wit, 2012). Les mécanismes sous-tendant l'activation de la HR médiée par les CSIRs ne sont pas encore élucidés, mais pourraient impliquer des NBS-LRR dans les voies de signalisation en aval des CSIRs. Le gène *NRC1*, codant pour un NBS-LRR, est par exemple requis pour la HR et la résistance médiées par la LRR-RLP *Cf-4* de la tomate (Gabriëls et al., 2007).

2.3. RESISTANCES QUANTITATIVES, RESISTANCES QUALITATIVES ET CONCEPTS ASSOCIES

Les différents mécanismes de défenses décrits ci-dessus peuvent conduire ou non à la résistance de la plante contre un agent pathogène. La résistance d'une plante contre un agent pathogène donné dépend en effet en grande partie (mais pas seulement) de sa génétique ainsi que de la nature et de l'efficacité des réponses de défenses mises en œuvre. Cette résistance est généralement qualifiée de **qualitative** ou de **quantitative**, qui font référence à deux aspects distincts (phénotypique ou génétique) de la résistance (Zhang et al., 2013b) (FIGURE 5).

D'un point de vue phénotypique, une résistance quantitative fait référence à une résistance incomplète, c'est-à-dire à une résistance qui atténue la sévérité de la maladie, mais durant laquelle l'agent pathogène est tout de même capable de se reproduire dans une certaine mesure. A l'inverse, une résistance phénotypiquement qualitative désigne une résistance totale, c'est-à-dire une résistance qui conduit à l'absence de symptômes/maladie en bloquant la totalité de l'agent pathogène dans sa pathogénèse (Niks et al., 2015).

D'un point de vue génétique, une résistance quantitative ou polygénique fait référence à une résistance médiée par plusieurs loci appelés QTLs (« quantitative trait loci »), chacun

contribuant en une certaine proportion au niveau de résistance. Ces QTLs sont généralement associés à la régulation des processus de développement de la plante, à la promotion de la transduction du signal de défense ou à l'amplification des réponses de défenses (Zhang et al., 2013b; Niks et al., 2015). Une résistance génétiquement qualitative désigne, quant à elle, une résistance contrôlée par un unique gène de résistance (Niks et al., 2015). Dans le cadre d'une résistance génétiquement qualitative, lorsqu'une plante portant un gène de résistance – codant pour un IPR – interagit spécifiquement avec un agent pathogène portant un gène dit d'avirulence – codant pour un facteur d'avirulence, c'est-à-dire un effecteur reconnu par l'IPR – l'interaction est qualifiée de relation **gène-à-gène** (Flor, 1971).

Les deux aspects phénotypiques et génétiques de la résistance sont souvent associés, c'est-à-dire qu'une résistance incomplète est souvent médiée par des QTLs et une résistance totale par un gène de résistance (Zhang et al., 2013b). Dans le cadre d'une résistance génétiquement qualitative, une relation gène-à-gène conduisant à une résistance phénotypiquement qualitative est qualifiée **d'interaction incompatible**, et à l'inverse **d'interaction compatible** lorsqu'elle conduit à l'apparition de symptômes. Plusieurs cas existent toutefois où une résistance polygénique conduit à une résistance totale et où un gène de résistance n'a qu'un effet partiel sur le degré de résistance (Niks et al., 2015). Une interaction compatible peut ainsi faire référence à une absence de résistance, comme à différents degrés de résistance phénotypiquement quantitative.

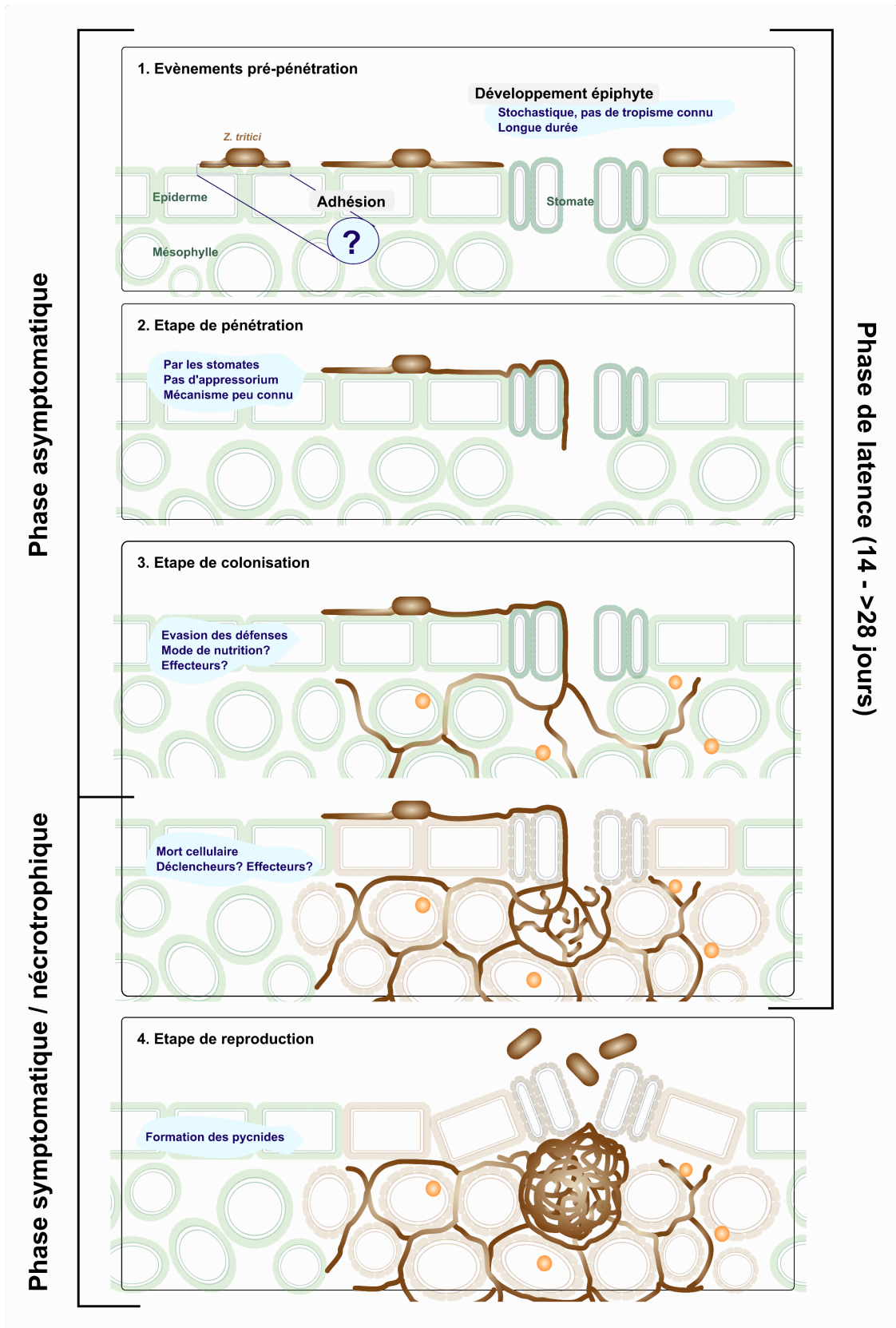


FIGURE 6. ILLUSTRATION DES QUATRE ETAPES DE LA PATHOGENESE DE *Z. TRITICI* EN L'ABSENCE DE RESISTANCE.

(1) Évènements pré-pénétration avec des mécanismes d'adhésion inconnu et un développement épiphyte stochastique et longue durée. (2) Étape de pénétration avec un mode de pénétration indirecte par les stomates et une absence d'appressorium. (3) Étape de colonisation strictement apoplasmique en deux phases : une phase asymptomatique avec évasion des défenses, mode de nutrition incertain et effecteurs (orange) inconnus sécrétés et une phase avec mort des cellules végétales (déclencheur(s) inconnu(s)) et apparition des premières chloroses et nécroses. (4) Étape de reproduction avec formation des pycnides dans les cavités sous-stomatiques.

3. LES PARTICULARITES DES INTERACTIONS BLE / *Z. TRITICI*

Zymoseptoria tritici (anciennement *Mycosphaerella graminicola* ou *Septoria tritici*) est un champignon ascomycète de la famille des *Mycosphaerellaceae* capable d'infecter les plantes graminées comme le ray-grass (*Lolium* spp.), le seigle (*Secale cereale*) ou les pâturins (*Poa* spp.) (Suffert et al., 2011). *Z. tritici* est toutefois considéré comme un agent pathogène spécialisé des espèces du genre *Triticum*, dont *Triticum durum* (blé dur, tétraploïde) et *Triticum aestivum* (blé tendre, hexaploïde) qui sont les deux espèces de blé principalement cultivées dans le monde (Orton et al., 2011). La septoriose, ou STB (« *Septoria tritici* blotch »), qui est la maladie foliaire polycyclique résultante de l'infection du blé par *Z. tritici*, a été décrite pour la première fois en 1842 (Ghaffary et al., 2018). Ce n'est cependant que dans les années 1970 que cette maladie devient réellement problématique pour la production de blé (Avant-propos) (Ghaffary et al., 2018). Depuis, en plus de son fort impact économique, *Z. tritici* est également apparu comme un modèle pour l'étude des champignons de la famille des *Mycosphaerellaceae*, une des plus grandes familles de champignons phytopathogènes. Un vaste panel de plantes d'intérêt économique est impacté par ces champignons, parmi lesquels on peut citer *Mycosphaerella fijiensis* (*Pseudocercospora fijiensis*) et *Pseudocercospora cladosporioides* qui sont les agents responsables de la cercosporiose chez la banane et l'olive respectivement, *Phaeoisariopsis griseola* qui est l'agent causal de la tache angulaire chez le haricot ou encore *Cladosporium fulvum* qui est l'agent causal de la cladosporiose chez la tomate (Thomma et al., 2005; Kema et al., 2008; Videira et al., 2017). Pour ces raisons, comprendre et caractériser les interactions entre les deux protagonistes de ce pathosystème blé / *Z. tritici* est un enjeu fondamental qui fait l'objet de nombreuses études depuis les années 1980.

3.1. UNE STRATEGIE D'INFECTION ORIGINALE MAIS ENCORE MAL COMPRISE

Z. tritici se distingue de la plupart des agents pathogènes filamenteux par une pathogénèse comportant des particularités telles qu'un développement épiphyte stochastique, une étape de pénétration par les stomates sans structures spécialisées et une colonisation strictement apoplasmique (FIGURE 6). Bien que le pathosystème blé / *Z. tritici* soit l'un des pathosystèmes les plus étudiés, de grandes lacunes demeurent cependant encore dans la compréhension de la pathogénèse de *Z. tritici*.

3.1.1. UN MECANISME D'ADHESION INCONNU

La pathogénèse de *Z. tritici* est initiée à la surface des feuilles, soit par des spores asexuées (les pycnidiospores), soit par des spores sexuées (les ascospores) (Suffert et al., 2011; O'Driscoll et al., 2014; Steinberg, 2015). Toutefois, le mécanisme d'adhésion des spores et hyphes de *Z. tritici* à la surface des feuilles de blé n'est pas connu (FIGURE 6.1).

Dans une étude cytologique de 2000, une ECM a pu être observée *in vitro* autour des spores germantes (Duncan and Howard, 2000). Les auteurs n'ont cependant pas observé d'ECM associée aux spores ou aux tubes germinatifs de *Z. tritici* durant leur interaction avec la surface de la plante, et aucune des sondes testées (colorants, lectines...) pour identifier les constituants de cette ECM – sondes utilisées pour la caractérisation d'ECM dans d'autres pathosystèmes – n'a révélé d'affinité pour l'ECM. La composition et le rôle de cette ECM sont donc encore inconnus. En revanche, trois des lectines testées – avec des spécificités pour l' α -D-mannose, l' α -D-glucose, le D-mannose, le D-glucose et le N-acetyl-D-glucosamine – ont montré une affinité pour les spores et les tubes germinatifs de *Z. tritici* (Duncan and Howard, 2000). Plutôt qu'un mécanisme d'adhésion médié par une ECM comme pour les autres agents pathogènes filamenteux, il est donc envisageable que le processus d'adhésion de *Z. tritici* soit médié par des composés directement présents dans la paroi fongique. Enfin, bien qu'une forte adhésion des spores de *Z. tritici* ait pu être démontrée *in vitro* (Duncan and Howard, 2000), une étude *in vivo* a révélé que les spores et hyphes de *Z. tritici* étaient facilement délogés par simple humidification des feuilles, suggérant que le mécanisme d'adhésion en surface des feuilles, quel qu'il soit, est plutôt de faible intensité (Fones et al., 2017).

3.1.2. UN DEVELOPPEMENT EPIPHYTE STOCHASTIQUE ET PROLONGE

Si la plupart des agents pathogènes filamenteux requièrent des signaux topologiques et/ou chimiques lors de l'étape de développement épiphyte pour s'orienter rapidement vers un site de pénétration optimal (Introduction – Section 1.1.2), pour *Z. tritici*, cette étape de la pathogénèse (FIGURE 6.1) est ou a été sujette à controverses.

3.1.2.1 UN DEVELOPPEMENT EPIPHYTE SANS TROPISME ?

L'existence d'un tropisme pour la croissance des hyphes de *Z. tritici* en surface et, cas échéant, la nature des signaux perçus, n'ont pas pu être démontré jusqu'à présent et plusieurs contradictions sont retrouvées dans la littérature. Deux études cytologiques ont reporté une croissance de surface non-stochastique en suggérant un tropisme des hyphes de *Z. tritici* vers les stomates, voies d'entrée de cet agent pathogène dans les feuilles de blé (Cohen and Eyal,

1993; Duncan and Howard, 2000). Les études plus récentes ont, au contraire, décrit le développement épiphyte de *Z. tritici* comme un phénomène stochastique, en se basant sur les résultats d'une modélisation de la croissance de *Z. tritici* en surface des feuilles (Fones et al., 2017) et sur l'observation d'une croissance hyphale multidirectionnelle avec des hyphes pouvant parfois passer sur un stomate et croître le long des cellules de garde le composant sans y pénétrer (Kema, 1996; Shetty et al., 2003; Siah et al., 2010; Haueisen et al., 2019). Un développement stochastique des hyphes en surface a également été décrit pour certains autres champignons de la famille des *Mycosphaerellaceae* (Rathaiah, 1977; Thomma et al., 2005).

3.1.2.2 UN DEVELOPPEMENT EPIPHYTE LONGUE DUREE

La plupart des agents pathogènes filamenteux présentent une étape de développement épiphyte relativement courte (de 24 à 72 heures post-inoculation (hpi) en conditions contrôlées) avant de pénétrer les tissus de la plante (Yirgou and Caldwell, 1963; Stubbs and Plotnikova, 1972; Kochman and Brown, 1976; Liu and Harder, 1996; Mochizuki et al., 2015). Bien qu'il ait longtemps été admis qu'une grande partie des hyphes de *Z. tritici* pénétraient la feuille peu de temps après la germination des spores (dans les 24 - 48 hpi) (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Rohel et al., 2001), des études cytologiques plus récentes montrent une étape de développement épiphytique longue (de 2 à 12 jours post-inoculation (jpi)) durant laquelle le champignon reste à la surface de la feuille plus ou moins longuement avant de rentrer progressivement dans le tissu foliaire (Shetty et al., 2003; Siah et al., 2010; Fones et al., 2017; Haueisen et al., 2019; Fantozzi et al., 2021). Particulièrement, Fones et al. ont montré que *Z. tritici* était capable de demeurer presque exclusivement en surface pendant plus de 10 jpi (Fones et al., 2017). Plusieurs autres champignons de la famille des *Mycosphaerellaceae*, comme *C. fulvum* ou *C. beticola*, présentent une étape de développement épiphyte ou endophyte plus longue que la moyenne (Lazarovits and Higgins, 1976; Thomma et al., 2005). Il a été suggéré que le mode de croissance de ces champignons était le vestige d'un mode de vie pré-pathogénique en tant qu'épiphytes ou endophytes (Thomma et al., 2005; Fones et al., 2017).

3.1.3. UNE ETAPE DE PENETRATION PAR LES STOMATES ET SANS APPRESSORIUM

Concernant l'étape de pénétration de *Z. tritici*, si quelques études ont rapporté l'existence d'une pénétration directe de l'épiderme en tant que mécanisme de pénétration secondaire (Cohen and Eyal, 1993; Rohel et al., 2001; Siah et al., 2010; Ors et al., 2018), la plupart s'accorde à présenter les stomates comme voie d'entrée exclusive (FIGURE 6.2) (Kema, 1996; Duncan and Howard, 2000; Shetty et al., 2003; Keon et al., 2007; Jing et al., 2008; Kettles and Kanyuka,

2016; Fones et al., 2017; Haueisen et al., 2019; Fantozzi et al., 2021; Valente et al., 2022). Ce mode de pénétration stomatique, dont dépend la majorité des bactéries, est globalement peu utilisé de façon exclusive par les agents pathogènes filamenteux, qui pour une grande partie sont aussi capables de pénétrer directement les tissus végétaux (Introduction – Section 1.2).

Les quelques agents pathogènes filamenteux utilisant ce mode de pénétration exclusivement – comme les rouilles ou certaines espèces du genre *Cercospora* de la famille des *Mycosphaerellaceae* (Yirgou and Caldwell, 1963; Wynn, 1976; Edwards and Bowling, 1986; Kim et al., 2011; Solanki et al., 2019; Rangel et al., 2020) – différencient le plus souvent des appressoria et sécrètent des effecteurs ou toxines pour optimiser cette étape de pénétration (Introduction – Section 1.2). Là, *Z. tritici* se distingue encore par son absence d'appressoria. Même si les hyphes de *Z. tritici* développent souvent, mais pas systématiquement, des renflements à leurs extrémités lors des événements de pénétration (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Duncan and Howard, 2000; Shetty et al., 2003; Siah et al., 2010), le génome de *Z. tritici* ne possède pas le répertoire de gènes classiquement identifiés comme caractéristiques de la formation des appressoria (Goodwin et al., 2011). Ces renflements sont donc désignés comme des « structures de type appressoria » et leur rôle exact lors de cette étape de pénétration est encore inconnu. Excepté *ZtFus3*, dont la mutation induit des hyphes se développant le long du stomate sans jamais le pénétrer mais dont le rôle exact n'a pas été déterminé (Cousin et al., 2006), aucun effecteur ou toxine sécrétés par *Z. tritici* et associés au processus de pénétration n'a été identifié et caractérisé à ce jour. Le processus de pénétration de *Z. tritici* demeure donc largement méconnu.

Z. tritici partage les particularités de son mode de pénétration (un mode de pénétration stomatique exclusif sans structures spécialisées) avec certaines autres espèces de *Mycosphaerellaceae* – comme *Mycosphaerella citri* (Whiteside, 1972), *Mycosphaerella fijiensis* (Churchill, 2011) et *Cladosporium fulvum* (Joosten and de Wit, 1999; De Wit, 2000; Thomma et al., 2005) – et avec *Leptosphaeria maculans*, un champignon hémibiotrophe responsable de la jambe noire ou de la nécrose du collet du colza (Hammond et al., 1985; Howlett, 2004). Bien que les pathosystèmes *C.fulvum* / tomate et *L. maculans* / colza aient été étudiés intensivement depuis les années 1980, les processus physiologiques et moléculaires régissant la reconnaissance et la pénétration du stomate sont encore largement méconnus pour ces deux champignons également.

3.1.4. UNE ETAPE DE COLONISATION MAL CARACTERISEE

3.1.4.1 UNE COLONISATION STRICTEMENT APOPLASMIQUE

Après l'étape de pénétration, la plupart des agents pathogènes filamenteux s'établissent dans les tissus de la plante en développant des hyphes inter- et intracellulaires (Introduction – Section 1.3). Ce n'est pas le cas des hyphes de *Z. tritici* qui, une fois dans la cavité sous-stomatique du stomate pénétré, se développent en contact étroit avec les cellules du mésophylle sans toutefois les pénétrer, c'est-à-dire en demeurant exclusivement apoplasmique (FIGURE 6.3) (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Duncan and Howard, 2000; Rohel et al., 2001; Shetty et al., 2003; Siah et al., 2010; Haueisen et al., 2019). Une fois encore, *Z. tritici* partage cette particularité de niche colonisée avec d'autres membres de la famille *Mycosphaerellaceae* – dont *Mycosphaerella fijiensis* (Churchill, 2011), *Mycosphaerella citri* (Mondal and Timmer, 2003), *Cercospora beticola* (Rangel et al., 2020), *Cercospora zea-maydis* (Lyimo et al., 2013) ou *C. fulvum* (Ökmen and de Wit, 2012) – et avec *L. maculans* (dans sa première phase d'infection) (Rouxel and Balesdent, 2005).

3.1.4.2 HEMIBIOTROPHE DISCRET OU NECROTROPHE LATENT ?

Après une phase de colonisation de l'apoplasme plutôt lente, les hyphes de *Z. tritici* se ramifient intensément avant de se condenser dans les cavités sous-stomatiques, initiant ainsi la formation des pycnides, qui sont les structures de reproduction asexuée produisant, à termes, des macropycnidiospores multicellulaires (Kema, 1996; Duncan and Howard, 2000; Haueisen et al., 2019). L'initiation de la reproduction coïncide avec le début de la mort des cellules végétales caractéristique de la phase nécrotrophique de *Z. tritici*, et avec l'apparition des symptômes de la maladie, où les pycnides apparaissent macroscopiquement sous forme de points noirs sur des tissus nécrosés (Kema, 1996; Duncan and Howard, 2000; Steinberg, 2015; Haueisen et al., 2019). *Z. tritici* se développe donc selon deux phases distinctes : une phase asymptomatique, incluant les étapes de la germination à la colonisation initiale, et une phase symptomatique dite nécrotrophique (FIGURE 6.3) (Fones and Gurr, 2015; Steinberg, 2015; Brennan et al., 2019). *Z. tritici* a ainsi historiquement été décrit comme un hémibiotrophe. Toutefois, si la caractérisation de la phase symptomatique en phase nécrotrophe ne fait aucun doute, la caractérisation de la phase asymptomatique en phase biotrophique ne fait pas l'unanimité.

Un mode de vie biotrophe pour un agent pathogène est caractérisé par une utilisation de nutriments issus de cellules végétales vivantes, une sécrétion limitée de PCWDE et une évation ou une manipulation des défenses de la plante (Introduction – Section 1.3.1). Les résultats de

plusieurs études cytologiques et moléculaires vont en ce sens. Une étude cytologique a en effet révélé une absorption de sucres post-pénétration par *Z. tritici*, suggérant une nutrition basée sur des nutriments dérivés de cellules végétales vivantes (Rohel et al., 2001). Les études transcriptomiques et protéomiques s'accordent à décrire le répertoire de PCWDE de *Z. tritici* comme limité comparé à celui d'agents pathogènes nécrotrophes (Goodwin et al., 2011) et globalement peu exprimé, voire sous-exprimé, durant toute la durée de la phase asymptomatique (Brunner et al., 2013; Yang et al., 2013a, 2013b; Palma-Guerrero et al., 2016). La caractérisation de l'effecteur Mg3LysM, sécrété par *Z. tritici* durant la phase asymptomatique, a démontré qu'il empêchait l'induction des défenses médiées par CERK1 et CEBiP suite à la reconnaissance de la chitine (Marshall et al., 2011; Lee et al., 2014). Une étude métabolomique a également révélé que *Z. tritici* supprimait activement la production de métabolites de défenses à 4 et 8 jpi (Seybold et al., 2020a). Cependant, plusieurs autres études suggèrent, au contraire, que durant la phase asymptomatique, *Z. tritici* n'est pas capable, comme un vrai biotrophe, de reprogrammer de façon significative la physiologie de son hôte à des fins nutritionnelles. Des études biochimiques, transcriptomiques et protéomiques ont démontré que la composition de l'apoplasme en sucres et en acides aminés, la concentration en polysaccharides de la paroi des cellules végétales et le transcriptome de blé ne changeaient pas de façon notable durant cette phase (Keon et al., 2007; Yang et al., 2013a, 2013b). En outre, aucune structure spécialisée dans la nutrition (comme les haustoria) ni augmentation de biomasse fongique n'ont été observés durant la phase asymptomatique (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Fones et al., 2017; Haueisen et al., 2019). Enfin, des données transcriptomiques suggèrent que, jusqu'à 9 - 10 jpi, le champignon utilise toujours ses lipides internes en tant que source d'énergie (Keon et al., 2007; Rudd, 2015; Palma-Guerrero et al., 2016). Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que, durant toute la durée de la phase asymptomatique, *Z. tritici* survit avec ses propres réserves d'énergie et une nutrition minimale (si existante) sur les ressources de la plante. Le terme « nécrotrophe latent » a en conséquence été proposé en 2015 afin de mieux décrire le mode de vie de *Z. tritici* (Sánchez-Vallet et al., 2015).

3.1.5. UNE PHASE DE LATENCE ANORMALEMENT LONGUE

La **période de latence** est un trait épidémiologique d'intérêt lors de l'étude des agents pathogènes filamenteux et se définit par la période entre le début de l'infection (adhésion et germination des spores) et le début de la sporulation (Précigout et al., 2020). Cette période de latence est constituée d'une phase asymptomatique et d'une seconde phase durant laquelle des symptômes pré-sporulation (chloroses) apparaissent (Précigout et al., 2020). Avec une phase

de latence d'une durée variant de 14 jours en moyenne en conditions contrôlées, à plus de 28 jours (Fones and Gurr, 2015; Brennan et al., 2019), *Z. tritici* fait partie des agents pathogènes filamenteux avec l'une des plus longues périodes de latence (Précigout et al., 2020). Parmi les autres agents pathogènes filamenteux avec les périodes de latence les plus longues, trois appartiennent aussi à la famille des *Mycosphaerelleaceae* (*Cercospora coffeicola*, *Nothopassalora personata* et *C. fulvum*) (Thomma et al., 2005; Précigout et al., 2020). Cette phase de latence particulièrement longue servirait de plateforme pour préparer et stimuler l'efficacité de la reproduction (Brennan et al., 2019).

3.2. LA RESISTANCE DU BLE CONTRE *Z. TRITICI*, UNE BOITE NOIRE

Tout comme *Z. tritici* se distingue de la plupart des agents pathogènes filamenteux par sa pathogénèse particulière, les mécanismes de défenses du blé conduisant à sa résistance contre *Z. tritici*, bien que largement méconnus, comportent eux aussi certaines particularités.

3.2.1. DES RESISTANCES GENETIQUES ATYPIQUES

Avant les années 1980, la résistance contre *Z. tritici* était associée uniquement à des résistances phénotypiquement et génétiquement quantitatives (Brown et al., 2015). Cette conception change en 1985 avec l'identification chez le blé tendre des premiers gènes majeurs de résistance contre la septoriose (Brown et al., 2015). Depuis, plus de 89 méta-QTLs de résistance et 22 gènes majeurs de résistance (gènes *Stb*) ont été identifiés et cartographiés dans tout le génome du blé tendre (Brown et al., 2015; Vagndorf et al., 2017; Yang et al., 2018; Riaz et al., 2020; Langlands-Perry et al., 2022). Les résistances génétiques d'autres espèces de blé sont globalement peu caractérisées, avec un seul gène majeur de résistance identifié et cartographié chez une accession de blé diploïde (*Triticum monococcum*) (Jing et al., 2008) et seulement plusieurs QTLs identifiés chez le blé dur (Aouini, 2018). Elles ne seront pas davantage détaillées par la suite.

Les gènes *Stb* confèrent une résistance isolat-spécifique généralement phénotypiquement qualitative et, pour la plupart, indépendante du stade de développement de la plante (Brown et al., 2015). Jusqu'à présent, seule la nature de deux de ces gènes est connue. *Stb6* – le premier gène majeur de résistance à la septoriose à avoir été identifié et probablement l'un des plus représentés dans les blés cultivés européens – code pour une WAK (« wall-associated receptor-like kinase ») et confère une résistance qualitative contre les isolats de *Z. tritici*, comme IPO323, qui exprime le facteur d'avirulence codé par le gène *AvrStb6* (Saintenac et al., 2018). *Stb16q* code quant à lui pour une CRK (« cysteine-rich receptor-like kinase ») et, dans la mesure où

aucune virulence des isolats de *Z. tritici* testés n'avait été identifiée vis-à-vis de *Stb16q* avant son déploiement sur une large partie de surfaces agricoles de blé français en 2013/2014 (notamment avec le cultivar Cellule), confère une résistance large spectre contre la septoriose (Tabib Ghaffary et al., 2012; Saintenac et al., 2021). Depuis 2016 et l'isolement des premiers isolats virulents sur le cultivar Cellule, ce gène a toutefois été largement contourné (Kildea et al., 2020). Un seul locus majeur de virulence a été révélé à l'issue de l'évaluation, sur le cultivar Cellule, de la descendance d'un croisement entre un des isolats virulents isolés et un isolat avirulent, suggérant l'existence d'une relation gène-à-gène entre *Stb16q* et un possible gène d'avirulence *AvrStb16q* (Communication personnelle – Anne Genissel et Marc-Henri Lebrun, BIOGER).

Avec deux gènes de résistance identifiés codant pour une WAK et une CRK, les sources génétiques majeures de résistance contre *Z. tritici* chez le blé peuvent être jusqu'à présent considérées comme originales. En effet, sur 314 gènes de résistance identifiés et clonés chez les plantes en 2018, 61 % codent pour des NBS-LRRs et seulement 19 % pour des CSIRs (Kourelis and van der Hoorn, 2018). La nature des gènes de résistance contre *Z. tritici* serait ainsi le reflet d'une intense bataille moléculaire extracellulaire pour le devenir de l'interaction (Introduction – Section 2.1.1) (Stotz et al., 2014). Parmi les 59 CSIRs clonés (hors gènes *Stb*), 68 % codent pour des CSIRs avec des domaines extracellulaires LRR, 19 % pour des LysM-RLK contre seulement 7 % pour des WAK-RLKs et aucune pour des CRK (Kourelis and van der Hoorn, 2018). Parmi ces CSIRs, plusieurs ont été identifiés chez la tomate et le colza et confèrent une résistance respectivement contre les champignons phytopathogènes *C. fulvum* et *L. maculans*, qui possèdent une stratégie d'infection très similaire à celle de *Z. tritici*. Dans ces pathosystèmes, la majorité de ces CSIRs codent pour des LRR-RLPs (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-4E*, *Cf-9* et *Cf-9DC* chez la tomate et *LepR3*, *Rlm2* chez le colza), trois pour des versions alléliques d'une même WAK-RLK (*Rlm4*, *Rlm7* et *Rlm9* chez le colza) et aucun pour des CRKs (Ökmen and de Wit, 2012; Borhan et al., 2022). La nature peu fréquente, voire singulière, des gènes de résistance impliqués dans la résistance du blé contre *Z. tritici* jusqu'ici pourrait ainsi laisser imaginer des mécanismes de résistance - du moins de reconnaissance – originaux par rapport à l'ensemble des mécanismes de résistance caractérisés jusqu'à présent.

3.2.2. DES MECANISMES DE RESISTANCE INCONNUS

Si l'architecture et la caractérisation génétique des résistances du blé tendre ont fait l'objet d'avancées importantes ces vingt dernières années, les mécanismes de résistance contre la septoriose médiés par les gènes *Stb* sont, quant à eux, encore largement, voire totalement,

inconnus. Contrairement aux gènes de résistance de la tomate et du colza qui induisent une réponse de type HR contre *C. fulvum* et *L. maculans* respectivement (Ökmen and de Wit, 2012; Borhan et al., 2022), les mécanismes de résistance médiés par les gènes *Stb* ne reposent pas sur la mise en place d'une HR (Stotz et al., 2014; Orton et al., 2017). L'exploration des réponses de défenses mises en jeu lors d'interactions incompatibles entre le blé et *Z. tritici* a fait l'objet de plusieurs études tant au niveau cellulaire (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Shetty et al., 2003) que -omics (Ray et al., 2003; Shetty et al., 2003, 2007, 2009; Adhikari et al., 2007; Yang et al., 2013b, 2015; Orton et al., 2017; Benbow et al., 2020; Seybold et al., 2020a), sans toutefois conduire à une caractérisation précise et bien définie des événements cellulaires, physiologiques et moléculaires sous-tendant les résistances à la septoriose.

Cytologiquement, une accumulation de callose plus précoce et plus intense que lors d'interactions compatibles ainsi qu'une autofluorescence cellulaire ont été observées dans et autour des stomates et dans le mésophylle sous-jacent, en réponse aux tentatives de pénétration et aux pénétrations des isolats ISR398 et IPO323 de *Z. tritici* en interactions incompatibles avec respectivement les blés KVZ-K4500 L.6.A.4 (qui possède *Stb6* et probablement *Stb7*, *Stb10* et *Stb12* (Chartrain et al., 2005a) et Stakado (dont les gènes *Stb* ne sont pas déterminés) (Cohen and Eyal, 1993; Shetty et al., 2003, 2009). Moléculairement, une accumulation plus précoce et plus intense de plusieurs PR protéines que lors d'interactions compatibles a été reportée tant au niveau transcriptomique (Ray et al., 2003; Adhikari et al., 2007; Shetty et al., 2009) que protéomique (Yang et al., 2013b, 2015) pour plusieurs interactions incompatibles avec des blés possédant *Stb1*, *Stb4*, *Stb8* ou des blés dont les gènes *Stb* sont non-déterminés. Cependant, deux autres études transcriptomiques ne rapportent aucune différence significative dans l'expression des PR protéines entre plusieurs interactions incompatibles avec des blés possédant *Stb6* et *Stb15* et des interactions compatibles (Orton et al., 2017; Benbow et al., 2020). Dans une étude métabolomique, Seybold et al. montrent que des métabolites secondaires de la voie des phénylpropanoïdes et de la voie des benzoxazinoïdes sont accumulés localement à 4 et 8 jpi plus intensément lors de l'interaction incompatible entre l'isolat IPO323 et le blé Chinese Spring (qui possède *Stb6*) que lors de l'interaction compatible entre ce même isolat et le blé Obelisk (Seybold et al., 2020a). Enfin, une augmentation d'abondance de peroxydases apoplasmiques et une accumulation de ROS corrélée à la présence de *Z. tritici* dans les tissus ont été observées lors de l'interaction incompatible entre l'isolat IPO323 et le blé Stakado (Shetty et al., 2003; Yang et al., 2015).

Parmi toutes ces réponses de défense, seul le rôle de l'accumulation de ROS dans la résistance a été évalué. Shetty et al ont ainsi démontré que l' H_2O_2 inhibait la croissance de *Z. tritici in vitro* (Shetty et al., 2007). Toutefois, bien que l'infiltration – précoce (0, 3, 5 jpi) ou tardive (9, 11, 13 jpi) – de catalase dans les feuilles du blé résistant Stakado conduise à un taux de pénétration de *Z. tritici* IPO323 sensiblement augmenté et à une colonisation sensiblement plus poussée, l'élimination de ROS par cette méthode n'est pas suffisante pour contourner la résistance (Shetty et al., 2007). Ces résultats suggèrent que, pour cette interaction incompatible au moins, l'accumulation de ROS n'explique pas, du moins pas à elle seule, la résistance du blé Stakado. La fonction et le rôle exact dans la résistance des autres réponses de défense observées, ainsi que la nature génétique des résistances gouvernant ces réponses, sont donc encore indéterminés.

En conclusion, si l'effort scientifique continu porté sur la compréhension des interactions blé / *Z. tritici* a jusqu'ici révélé un pathosystème original tant dans la stratégie d'infection mise en place par *Z. tritici* que dans la stratégie de défense mise en place par le blé, de nombreuses incertitudes – voire véritables boîtes noires – demeurent quant aux mécanismes sous-tendant ces interactions, particulièrement dans le cadre de la résistance à la septoriose.

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE

La septoriose, causée par le champignon *Z. tritici*, est un problème persistant pour la production de blé en Europe (Avant-propos). La lutte contre la septoriose repose aujourd'hui principalement sur deux stratégies : l'utilisation de fongicides, avec 70 % des fongicides totaux utilisés en Europe dédiés à la lutte contre cette maladie (Torriani et al., 2015), et l'utilisation de variétés génétiquement résistantes. L'efficacité et la durabilité de la première approche se trouve toutefois de plus en plus limitée par l'émergence rapide d'isolats de *Z. tritici* résistants aux fongicides et par des restrictions législatives européennes relatives à leurs utilisations (O'Driscoll et al., 2014). Le contournement rapide des gènes majeurs de résistance déployés dans les variétés de blé cultivées limite également considérablement la durabilité de la seconde approche (Brown et al., 2015). Dans ce contexte, il devient donc nécessaire d'élaborer des stratégies de lutte à la fois efficaces et plus durables. L'absence d'informations relatives aux mécanismes de résistance à la septoriose représente cependant un frein important à la conception de telles stratégies.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les travaux de Thèse présentés dans ce manuscrit. Ces travaux ont été réalisés au sein de l'Unité Mixte de Recherche Génétique Diversité Écophysiologie des Céréales (UMR 1095 GDEC, INRAE/UCA), dans l'équipe « Maladie Des Céréales » (MDC). L'équipe MDC développe des projets centrés sur l'étude du déterminisme et du fonctionnement des résistances et de la sensibilité du blé à deux de ses principales maladies : la septoriose (STB) et la fusariose de l'épi (FHB). Ces projets, à l'interface entre recherche fondamentale et recherche finalisée, ont pour double objectif (i) l'apport d'éléments d'information originaux sur les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans le contrôle et le développement de ces deux maladies et (ii) la mise à disposition, pour la sélection, de nouveaux gènes, de nouvelles combinaisons génétiques et de mécanismes originaux de façon à élargir les spectres (STB) et les niveaux de résistance (STB, FHB) et à améliorer la durabilité des résistances. Ces projets sont structurés autour de trois axes de recherche complémentaires. L'axe 1, animé par Cyrille Saintenac – dans lequel s'inscrit ce projet – porte sur le déterminisme génétique et le fonctionnement des résistances à la septoriose. L'axe 2, animé par Ludovic Bonhomme, porte sur l'identification de facteurs de sensibilité en tant qu'alternative à l'utilisation des résistances classiques à la fusariose. L'axe 3, animé par Thierry Langin, porte sur l'impact des facteurs environnementaux sur la plasticité et la stabilité des résistances.

L'axe 1 ambitionne plus particulièrement de caractériser finement les mécanismes de résistances à la septoriose, en en identifiant les bases génétiques, moléculaires et physiologiques. Jusqu'ici, les travaux précédemment réalisés au sein de cet axe ont majoritairement permis, par des approches de génétique, de génomique comparative, de mutagenèse et de complémentation, l'identification et la caractérisation génétique et fonctionnelle de deux gènes *Stb* : *Stb6* (Saintenac et al., 2018) et *Stb16q* (Saintenac et al., 2021). *Stb6*, le premier gène *Stb* cloné, code pour une wall-associated kinase (WAK) qui, en détectant, par une relation gène-à-gène, la présence de l'effecteur codé par le gène *AvrStb6*, confère une résistance qualitative contre *Z. tritici* sans réponse hypersensible (HR). *Stb16q* code pour une cysteine-rich receptor-like kinase (CRK) et confère une résistance qualitative, sans HR et large-spectre contre *Z. tritici*, c'est-à-dire efficace contre un grand nombre d'isolats. Si ces travaux ont permis d'identifier la nature de deux gènes majeurs de résistance à la septoriose, fournissant ainsi des ressources précieuses pour l'étude de ces gènes, les mécanismes moléculaires et physiologiques liés aux résistances médiées par les gènes *Stb* constituent encore une véritable boîte noire.

Un mécanisme de résistance se définit selon trois composantes : son lieu d'action, le stade de la pathogénèse durant lequel il agit et les réponses de défense qu'il met en œuvre pour arrêter l'agent pathogène. Les travaux réalisés au cours de ma Thèse, intitulée « **Analyse fonctionnelle du mécanisme de résistance à la septoriose médié par le gène *Stb16q* chez le blé tendre** », avaient donc pour objectif général d'apporter des éléments de réponses à ces trois grandes questions : « où », « quand » et « comment » se met en place la résistance médiée par le gène *Stb16q*. Formulées autrement, les questions étaient : (i) Durant quelle(s) étape(s) de sa pathogénèse un isolat avirulent de *Z. tritici* est-il arrêté durant une interaction incompatible avec le gène *Stb16q* ? (ii) Comment un isolat avirulent de *Z. tritici* est-il reconnu par un blé portant *Stb16q* ? (iii) Quel(s) est(sont) le(s) évènement(s) moléculaire(s) et physiologique(s) responsable(s) de l'arrêt d'un isolat avirulent de *Z. tritici* ? Découlant de la diversité dans la nature des deux gènes *Stb* clonés jusqu'à présent vient également s'ajouter la question (iv) Les mécanismes de résistances médiés par différents gènes *Stb* sont-ils les mêmes en termes de lieu, stade et mécanismes d'arrêt ou différent-ils dans l'une ou plusieurs de ces composantes ? Ces différentes questions et les éléments de réponses obtenus au cours de cette Thèse sont regroupés et présentés en trois chapitres :

Chapitre 1 : « Où » et « quand » la résistance médiée par STB16 se met-elle en place ?

L'objectif de ce premier chapitre était d'identifier le lieu et le stade d'arrêt précis d'un isolat de *Z. tritici* avirulent vis-à-vis du gène *Stb16q* lors d'une interaction incompatible avec un génotype de blé portant le gène *Stb16q*. Les résultats obtenus font l'objet d'un article intitulé « **Blocked at the stomatal gate, a key step of wheat *Stb16q*-mediated resistance to *Zymoseptoria tritici*** », publié dans la revue *Frontiers in Plant Science*.

Chapitre 2 : « Où » et « quand » *Z. tritici* est-il arrêté au cours d'autres interactions incompatibles ?

L'objectif de ce deuxième chapitre était d'identifier le lieu et le stade d'arrêt précis de *Z. tritici* lors d'interactions incompatibles entre un génotype de blé portant le gène *Stb16q* et d'autres isolats avirulents d'une part, et lors d'interactions incompatibles impliquant quatre autres gènes majeurs de résistance *Stb* (*Stb5*, *Stb6*, *Stb7* et *Stb9*) d'autre part.

Chapitre 3 : « Comment » la résistance médiée par STB16 se met-elle en place ?

L'objectif de ce troisième chapitre était d'identifier les mécanismes moléculaires et physiologiques gouvernés par la protéine STB16. Ce chapitre se décompose en trois axes :

→ Axe 1 – La reconnaissance de *Z. tritici*

Cet axe visait à comprendre ce qui déclenche la résistance médiée par le gène *Stb16q* en identifiant le ou les ligands extracellulaires de la protéine STB16.

→ Axe 2 – La transduction du signal

Cet axe ambitionnait de mieux comprendre l'activation du domaine kinase de la protéine STB16.

→ Axe 3 – Les réponses de défenses

Cet axe visait à identifier les réponses de défenses contrôlées par la protéine STB16 et responsables de l'arrêt de *Z. tritici* lors de sa pathogénèse.

CHAPITRE 1 : « OU » ET « QUAND » LA RESISTANCE MEDIEE PAR STB16 SE MET-ELLE EN PLACE ?

INTRODUCTION

La résistance d'une plante repose sur sa capacité à bloquer l'agent pathogène lors de l'étape de pénétration dans les tissus végétaux (résistance à la pénétration) et/ou à restreindre son développement dans les tissus végétaux (résistance à la colonisation) (Introduction – Section 2.2). Une étude cytologique de 213 interactions incompatibles impliquant 24 variétés résistantes de *T. monococcum* et 9 isolats de *Z. tritici* a permis de définir trois stades d'arrêt principaux de l'agent pathogène : (i) le stade B, avec un arrêt des hyphes relativement tardif dans l'apoplasme, avec parfois la formation de pycnides immatures, (ii) le stade C, avec un arrêt des hyphes dans l'apoplasme à proximité du site de pénétration et (iii), le stade D, avec un arrêt des hyphes au niveau du stomate (Jing et al., 2008). Les analyses cytologiques d'interactions incompatibles entre *T. aestivum* et *Z. tritici* ont mis en évidence une résistance se manifestant lors de l'étape de colonisation des tissus végétaux par le champignon, c'est-à-dire associée aux stades d'arrêt B (Cohen and Eyal, 1993) et C (Kema, 1996; Shetty et al., 2003; Siah et al., 2010).

Trois limites à ces études sont toutefois à prendre en compte. Fones et al. ont démontré que des techniques invasives de préparation des feuilles de blé pour les observations cytologiques pouvaient déloger facilement des hyphes épiphytes non pénétrants (Fones et al., 2017). L'utilisation de telles techniques dans ces études constitue donc une première limite puisqu'elle pourrait empêcher la détection d'un mécanisme de résistance antérieur à la colonisation (avant ou pendant la pénétration). L'absence de données quantitatives précises relatives à l'ensemble des étapes de la pathogénèse est une deuxième limite à ces études. Plusieurs stades d'arrêt simultanés pourraient en effet coexister pour une même interaction incompatible, et leurs importances relatives ne seraient mesurables qu'à l'aide de données quantitatives. Enfin, une dernière limite réside dans l'utilisation de fonds génétiques pour lesquels les sources de résistance ne sont pas toutes déterminées. S'il est avéré que le blé KVZ-K4500 L.6.4.A. (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996) porte les gènes *Stb10*, *Stb12*, *Stb7* et *Stb6* (Chartrain et al., 2005b; Brown et al., 2015; Ghaffary et al., 2018), d'autres gènes *Stb* ou des QTLs non identifiés sont probablement présents dans ce fond génétique (Chartrain et al., 2005a). Les sources de résistance dans les autres fonds génétiques de blé étudiés jusqu'à présent sont, quant à elles,

totale­ment inconnues. Il est donc difficile, voire impossible, d'attribuer le lieu et le stade d'arrêt reportés dans ces études à un gène ou à un QTL de résistance en particulier.

Les travaux préliminaires réalisés dans l'équipe MDC sur une interaction incompatible impliquant le gène *Stb16q* ont permis de démontrer que le mécanisme de résistance médié par ce gène se mettait en place de façon précoce durant la pathogénèse (avant 7 jpi) (Saintenac et al., 2021). L'objectif de ce premier chapitre était de caractériser plus précisément le lieu et le stade d'arrêt de *Z. tritici*. Pour répondre à cet objectif, et plus globalement dans l'ensemble des expérimentations conduites au cours de cette Thèse, nous avons utilisé des lignées de blé quasi-isogéniques (NILs), c'est-à-dire des génotypes de blés ne différant presque exclusivement que par la présence ou l'absence d'un seul gène *Stb*. L'utilisation de ce matériel végétal original permet ainsi d'associer le ou les mécanismes mis en évidence à l'action d'un unique gène *Stb*. Nous avons également mis au point deux approches complémentaires pour identifier le lieu et le stade d'arrêt de *Z. tritici* au cours de l'interaction incompatible :

- La première approche consistait à contourner les premières étapes de la pathogénèse (dont la pénétration par les stomates), afin d'en observer l'impact sur la résistance. Pour cela, nous avons développé une technique d'infiltration des spores de *Z. tritici* directement dans l'apoplasme de feuilles de blé. Nous avons également utilisé une technique de blessures de feuilles pour créer des ouvertures artificielles à leur surface de façon à confirmer les résultats obtenus avec la technique d'infiltration. Afin de limiter au maximum les effets des micro-variations environnementales et de faciliter le suivi régulier des symptômes, ces techniques ont été employées en conditions contrôlées et en combinaison avec un système de feuilles attachées sur un support rigide, développé au cours de la Thèse.
- La deuxième approche consistait à suivre le développement de l'agent pathogène *in planta* durant des interactions compatibles ou incompatibles. Pour cela, en collaboration avec l'équipe EGIP (Evolution and Genomics of Plant-Pathogen Interaction) et le plateau technique de Cytologie et Microscopie de l'UMR BIOGER, nous avons mis au point une technique d'observation peu invasive par double marquage simultané permettant de détecter différemment les hyphes épiphytes et les hyphes internes. La détection de l'ensemble des hyphes de *Z. tritici* (présents à la surface des feuilles ou dans les tissus végétaux) a été permise par l'utilisation d'isolats exprimant constitutivement la GFP tandis que la détection des hyphes présents uniquement en surface a été possible grâce à l'utilisation du colorant Calcofluor. A partir des images obtenues par l'utilisation de cette technique, nous avons ensuite réalisé une analyse quantitative des différentes étapes de la pathogénèse.

ARTICLE – BLOCKED AT THE STOMATAL GATE, A KEY STEP OF WHEAT *STB16Q*-MEDIATED RESISTANCE TO *ZYMOSEPTORIA TRITICI*



Blocked at the Stomatal Gate, a Key Step of Wheat *Stb16q*-Mediated Resistance to *Zymoseptoria tritici*

Mélissa Battache¹, Marc-Henri Lebrun², Kaori Sakai², Olivier Soudière¹, Florence Cambon¹, Thierry Langin¹ and Cyrille Saintenac^{1*}

¹ Université Clermont Auvergne, INRAE, GDEC, Clermont-Ferrand, France, ² Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, Thiverval-Grignon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Tika Adhikari,
North Carolina State University,
United States

Reviewed by:

Jason Rudd,
Rothamsted Research,
United Kingdom
Steven Kildea,
Teagasc Crops Research Centre,
Ireland

*Correspondence:

Cyrille Saintenac
cyrille.saintenac@inrae.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Pathogen Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 15 April 2022

Accepted: 03 June 2022

Published: 27 June 2022

Citation:

Battache M, Lebrun M-H,
Sakai K, Soudière O, Cambon F,
Langin T and Saintenac C (2022)
Blocked at the Stomatal Gate, a Key
Step of Wheat *Stb16q*-Mediated
Resistance to *Zymoseptoria tritici*.
Front. Plant Sci. 13:921074.
doi: 10.3389/fpls.2022.921074

Septoria tritici blotch (STB), caused by the fungus *Zymoseptoria tritici*, is among the most threatening wheat diseases in Europe. Genetic resistance remains one of the main environmentally sustainable strategies to efficiently control STB. However, the molecular and physiological mechanisms underlying resistance are still unknown, limiting the implementation of knowledge-driven management strategies. Among the 22 known major resistance genes (*Stb*), the recently cloned *Stb16q* gene encodes a cysteine-rich receptor-like kinase conferring a full broad-spectrum resistance against *Z. tritici*. Here, we showed that an avirulent *Z. tritici* inoculated on *Stb16q* quasi near isogenic lines (NILs) either by infiltration into leaf tissues or by brush inoculation of wounded tissues partially bypasses *Stb16q*-mediated resistance. To understand this bypass, we monitored the infection of GFP-labeled avirulent and virulent isolates on *Stb16q* NILs, from germination to pycnidia formation. This quantitative cytological analysis revealed that 95% of the penetration attempts were unsuccessful in the *Stb16q* incompatible interaction, while almost all succeeded in compatible interactions. Infectious hyphae resulting from the few successful penetration events in the *Stb16q* incompatible interaction were arrested in the sub-stomatal cavity of the primary-infected stomata. These results indicate that *Stb16q*-mediated resistance mainly blocks the avirulent isolate during its stomatal penetration into wheat tissue. Analyses of stomatal aperture of the *Stb16q* NILs during infection revealed that *Stb16q* triggers a temporary stomatal closure in response to an avirulent isolate. Finally, we showed that infiltrating avirulent isolates into leaves of the *Stb6* and *Stb9* NILs also partially bypasses resistances, suggesting that arrest during stomatal penetration might be a common major mechanism for *Stb*-mediated resistances.

Keywords: *Septoria tritici* blotch, *Stb16q*, resistance, avirulence, leaf penetration, stomata

INTRODUCTION

Zymoseptoria tritici (telemorph *Mycosphaerella graminicola*) is the causal agent of *Septoria tritici* blotch (STB), one of the most devastating diseases of wheat in Europe. This fungal pathogen causes, on average, 10% of annual yield losses, representing a value of more than \$800 (€720) million despite the use of fungicides and resistant wheat varieties (Fones and Gurr, 2015;

Torriani et al., 2015). Because of its economic importance, the infection biology of this fungus has been extensively studied (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Duncan and Howard, 2000; Rohel et al., 2001; Shetty et al., 2003; Keon et al., 2007; Jing et al., 2008; Siah et al., 2010; Fones et al., 2017; Hauelsen et al., 2019; Fantozzi et al., 2021). Under high-humidity conditions, *Z. tritici* spores present on the leaf surface germinate. The resulting hyphae initiate pathogenesis by developing epiphytically before penetrating wheat leaf mainly through stomata. After penetration, inner infectious hyphae colonize the leaf apoplast. This extended invasive phase is defined as the asymptomatic phase. Usually, after 7–14 days post infection (dpi) in a growth chamber, chlorotic and necrotic lesions appear and announce the beginning of the symptomatic or necrotrophic phase. This phase is associated with the formation of pycnidia in sub-stomatal cavities that finally release pycnidiospores through the ostiole to initiate another infection cycle.

Genetic resistance is the main environmentally sustainable and efficient strategy to control STB. Important advances in the genetic architecture of wheat resistances against *Z. tritici* have been made these past few years, with the mapping of 22 major *Stb* genes and more than 167 quantitative trait loci (QTLs) spread throughout all chromosomes (Brown et al., 2015; Yang et al., 2018). The *Stb* genes have been very attractive for wheat breeding as they confer strong resistances inherited from a single locus. However, the rapid emergence of virulent isolates considerably limits their durability, as illustrated by the rapid breakdown of most *Stb*-mediated resistances largely deployed in the fields (McDonald and Linde, 2002; Brown et al., 2015). Functional characterization of the resistance mechanisms controlled by the *Stb* genes is now needed for breeding efficient and durable wheat resistances to STB.

During interactions between *Z. tritici* and resistant wheats, little is known about when, where, and how non-pathogenic isolates are stopped. In previous comparative cytological studies between compatible and incompatible interactions, fungal growth was reported to be stopped after penetration through stomata, at different steps during resistant wheat apoplast colonization (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Shetty et al., 2003; Jing et al., 2008; Siah et al., 2010). No hypersensitive responses (HR) and no lignin or polyphenolic depositions were observed (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996). Cellular autofluorescence (Cohen and Eyal, 1993; Duncan and Howard, 2000; Shetty et al., 2003), ROS, and callose accumulation (Cohen and Eyal, 1993; Shetty et al., 2003) have been reported, but their roles in resistance are unknown. Comparative proteomic (Yang et al., 2015) and metabolomic (Seybold et al., 2020) analyses revealed an early upregulation of carbohydrate metabolism, cell wall reinforcement, and the production of defense proteins and possible antifungal metabolites generating an apoplastic environment stressful for the fungus. In all these studies, exploration of wheat features linked to resistance relied on the comparison between distinct genetic backgrounds for which the underlying genetic determinism of resistance is unknown. Thus, assignment of molecular or physiological events to *Stb* genes or QTLs is not possible, which strongly limits our

understanding of the nature, diversity, and interaction of resistance mechanisms against STB.

The recent cloning of the *Stb6* and *Stb16q* genes (Saintenac et al., 2018, 2021) is a valuable resource to fast forward search for *Stb*-mediated resistance mechanisms. Both *Stb* genes encode receptor-like kinases (RLKs), which, in plant immunity, are thought to recognize invasion patterns in the apoplast and transduce a defense signal (van der Burgh and Joosten, 2019). *Stb6* controls a qualitative gene-for-gene resistance against *Z. tritici* isolates carrying the matching *AvrStb6* and encodes for a wall-associated kinase (WAK) (Kema et al., 2000; Brading et al., 2002; Saintenac et al., 2018). Many WAKs monitor plant cell wall integrity and induce a broad range of host defense responses, including the activation of MAPK cascades, the modulation of hormones signaling, and the modification of cell wall composition to prevent pathogen penetration (Stephens et al., 2022). *Stb16q*, of particular interest as it confers qualitative broad-spectrum resistance against a large panel of *Z. tritici* isolates, encodes a cysteine-rich-receptor-like kinase (CRK) (Saintenac et al., 2021). Most of the functional analyses of this RLK family arise from studies on *Arabidopsis thaliana*, wherein CRKs were shown to be involved in ROS signaling, modification of phytohormonal pathways, cell death, and/or stomatal immunity (Acharya et al., 2007; Bourdais et al., 2015; Yeh et al., 2015; Lee et al., 2017; Yadeta et al., 2017; Kimura et al., 2020).

This study aimed at deciphering the mechanisms involved in *Stb16q*-mediated resistance. We performed a quantitative phenotyping analysis between compatible and incompatible interactions by brush-inoculating leaves. We also evaluated the impact of inoculating spores either by infiltration into leaf or by brush-inoculation on wounded tissues on *Stb16q*-mediated resistance. We also questioned the effect of these inoculation methods on *Stb6*- and *Stb9*-mediated resistances. Using a comparative quantitative cytological approach, we investigated when and where an avirulent isolate was stopped during *Stb16q*-mediated resistance. Finally, we tested whether stomatal immunity is involved in *Stb16q*-mediated resistance using cytological and biochemical approaches.

MATERIALS AND METHODS

Plant and Fungal Materials

All experiments were performed using wheat Chinese Spring (CS) near isogenic lines (NILs), carrying either no *Stb* gene (named NIL^{stb}), or one of the following *Stb* genes *Stb6*, *Stb9*, and *Stb16q* and named NIL^{stb}, NIL^{Stb6}, NIL^{Stb9}, NIL^{Stb16q}, respectively. NIL^{stb} and NIL^{Stb6} were obtained following five backcrosses with the recurrent parent CS starting with F₁ CS × Courtot. At each generation, plants were phenotyped with *Z. tritici* isolate IPO323 and genotyped with SSR marker gwm369 and *Stb6* diagnostic SNP markers to maintain *Stb6* heterozygosity in the progenies. A BC₅F₁ plant heterozygous for *Stb6* was self-fertilized. A BC₅F₂ carrying the resistance *Stb6* haplotype 1 and a BC₅F₂ carrying the susceptible *Stb6* haplotype 3 at the homozygous state were selected and named NIL^{Stb6} and NIL^{stb}, respectively. NIL^{Stb9} was developed by performing

five backcrosses, with the recurrent parent CS starting with F₁ CS × Courtot. At each generation, the plants were phenotyped with *Z. tritici* isolates IPO89011 and genotyped with SSR markers *barc129* and *wmc317* to maintain *Stb9* heterozygosity in the progenies. A BC₅F₁ plant heterozygous for *Stb9* was crossed with NIL^{Stb}, and a progeny heterozygous for *Stb6* and *Stb9* was self-fertilized. A progeny carrying the resistance allele of *Stb9* and the susceptible allele of *Stb6* both at the homozygous state was selected and named NIL^{Stb9}. The NIL^{Stb16q} was developed similarly to NIL^{Stb9} by starting with F₁ CS × TA4152-19 and by using IPO9415 and *Stb16q* diagnostic markers *cfm80044* and *cfm80045* (Saintenac et al., 2021).

Z. tritici isolates IPO9415 (avirulent on *Stb16q* and virulent on *Stb6* and *Stb9*) and CFZ008 (virulent on *Stb6*, *Stb9*, and *Stb16q*) were collected in French wheat fields on cultivar Premio in 2009 and cultivar Cellule in 2016, respectively. The *Stb9*-avirulent IPO89011 isolate (avirulent on *Stb16q*) was collected from a Netherlands wheat field (Brown et al., 2001). The *Stb6*-avirulent IPO323 isolate (avirulent on *Stb16q*), collected on cultivar “Arminda” in the Netherlands in 1981, is the genome reference isolate (Goodwin et al., 2011). For cytological analyses, plasmid pYSKH-4 was introduced into *Z. tritici* isolates IPO9415 and CFZ008 using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) according to published protocols (Marchegiani et al., 2015). Plasmid pYSKH-4 contains eGFP expressed under the control of a strong constitutive promoter TEF1 and the ILV1-R gene, conferring resistance to sulfonylurea (Sidhu et al., 2015). Transformants resistant to sulfonylurea were purified by monospore isolation, and their GFP fluorescence was assessed as previously described (Marchegiani et al., 2015).

Plant and *Zymoseptoria tritici* Growing Conditions

Except for cytological analyses, all experiments were performed using the attached leaf assay (Lee et al., 2015b). The plants were grown in 60 cm × 40 cm trays filled with 1/2 blond and 1/2 brown peat mosses (Humustar soil, NPK 14-16-18, SARL Activert, Riom, France) in the MTR30 growth chamber (Convion®) equipped with fluorescent tubes (Master TL-D Super 80 70 W/840; 480 mol. m⁻².s⁻¹; Philips, Amsterdam, the Netherlands) under a 16-h photoperiod at 21/18°C (day/night) and 80% relative humidity (RH). For cytological analyses, the plants were grown in a 10 cm × 10 cm pot filled with the Floradur® B soil (NPK 14-16-18; Floragard Vertriebs-GmbH, Oldenburg, Germany) in a controlled growth chamber with fluorescent tubes (Osram Lumilux L58W/830; 300 mol. m⁻². s⁻¹; OSRAM GmbH, Munich, Germany), under a 16-h photoperiod at 22/18°C (day/night) and 80% RH.

Z. tritici isolates were grown in liquid YG with 100 mg/L streptomycin and 100 mg/L ampicillin at 20°C, 180 rpm, for 3 days and spread on YPD plates supplemented with the same antibiotics at 20°C for 4 days. A suspension of 1 × 10⁶ spores/ml supplemented with 0.05% (v/v) Tween-20 was prepared to inoculate attached leaves. For cytological analyses, *Z. tritici* isolates IPO9415-GFP and CFZ008-GFP were grown on YPD

plates supplemented with 100 mg/L ampicillin at 18°C, 70–80% RH for 3 days, and spread again on new YPD plates for 4 more days. A suspension of 3 × 10⁶ spores/ml supplemented with 10% (v/v) gelatine was prepared to inoculate unattached leaves.

Inoculation Procedures

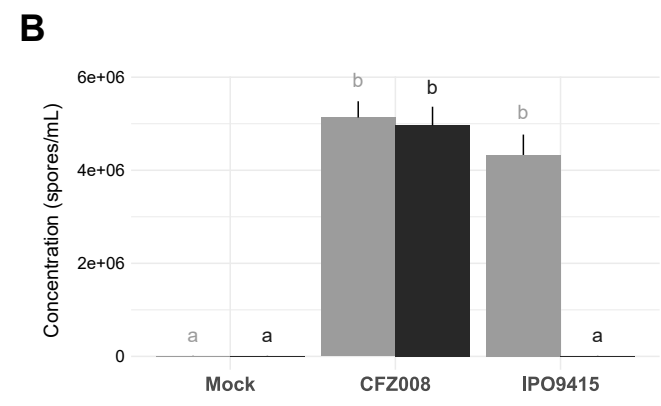
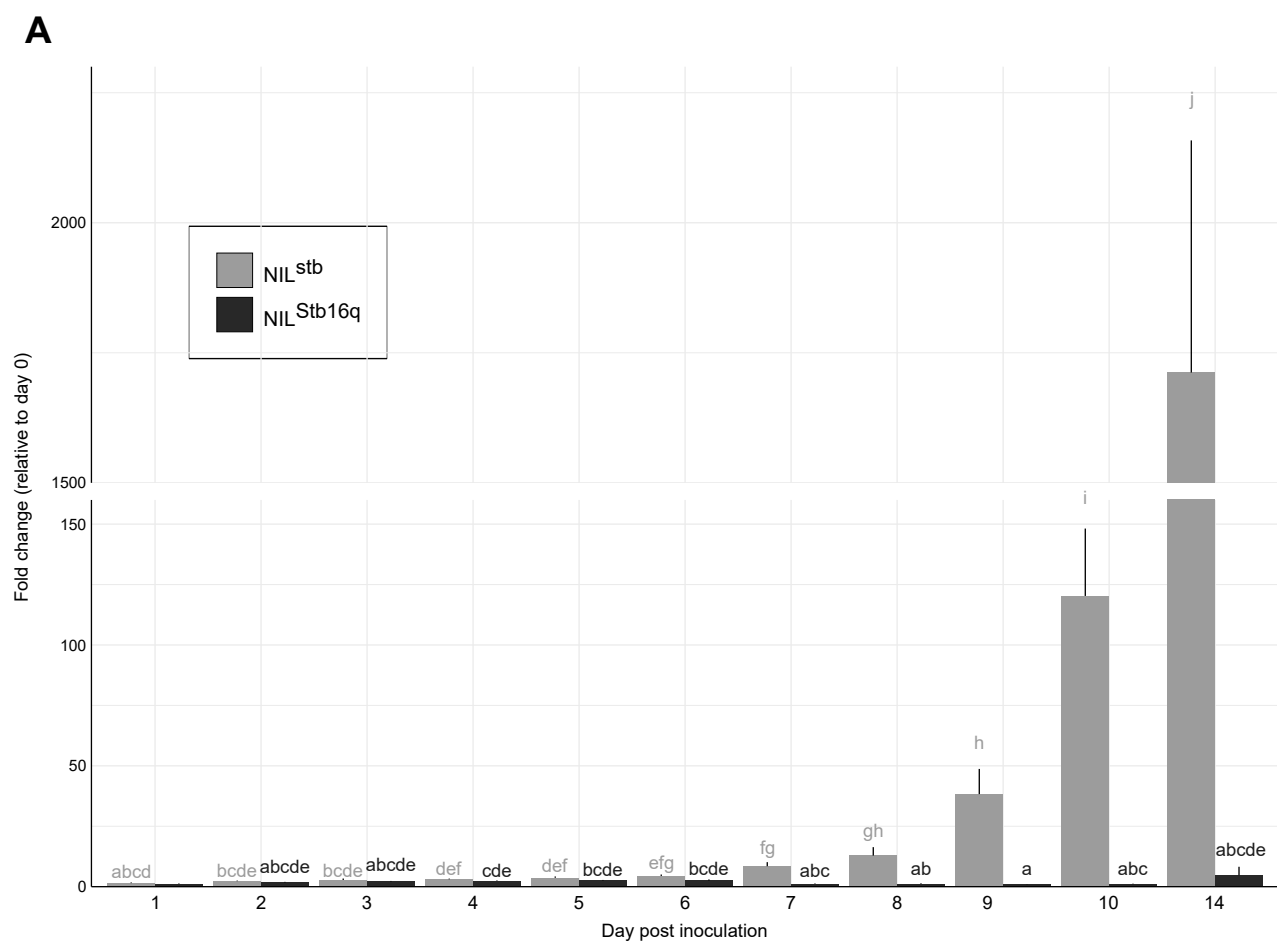
Six- to eight-centimeter sections of the second leaf of 14-day-old NILs were inoculated with a paintbrush six times repeated twice (or 3 times twice for cytological analyses) with spore suspensions or water supplemented with 0.05% (v/v) Tween-20 as control solution. Infiltration assays were performed by infiltrating between 0.1 and 0.5 ml of spores suspensions or control solution at three different locations in second leaves using a needle-less syringe. The wounding assay was conducted by gently scrapping 3 times the leaf surface using waterproof abrasive paper (240 grit) before brush-inoculation. Following inoculation, the plants were covered with transparent bags for 3 days before returning to normal conditions, except for the 100% RH experiment where the bags were maintained for 7 days. Disease severity of inoculated leaves was visually evaluated every 2 days from 8 to 21 dpi by estimating the percentage of the leaf surface covered with symptoms (chlorosis and necrosis) and pycnidia. Results were obtained from three to eight individual leaves per condition from one to two independent experiments. The area under disease progression curve (AUDPC) for symptoms and pycnidia was calculated using the “audpc” function of the “agricolae” package in R software (version 4.1.0).

Quantification of Fungal Biomass

The inoculated leaves were harvested 10 h after the light turned on every day from 0 to 10 days post inoculation (dpi) and at 14 dpi. The collected leaves were snapfrozen and stored at -80°C. Total DNA was isolated using the CTAB method (Fabre et al., 2019), treated with 10 mg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) at 37°C for 1 h and quantified using the Hoechst 33258 method (Thermo Fisher Scientific), with the Tecan's Infinite M1000 microplate reader. Real-time quantitative PCR was performed with the LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) on 25 ng total DNA in a final volume of 15 µL, using the *Z. tritici* IGS primers (Forward: 5'-CGACGCGTATCGTAATTT-3'/Reverse: 5'-CAACAAATCGAGCCGACGT-3') to monitor fungal biomass and the wheat 18S primers (Forward: 5'-CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT-3'/Reverse: 5'-CCTGTCCGCCAAGGCTATATAC-3') to monitor plant biomass. Reactions were run in triplicate with the following thermal cycling profile: 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 15 s at 60°C, and 15 s at 72°C and completed with a melting curve analysis program. The relative expression was calculated with the 2^{-ΔΔC_t} method (Livak and Schmittgen, 2001). Results were obtained from ten individual leaves per condition from two independent experiments.

Sporulation Assay

The sporulation assay was performed as described previously (Lee et al., 2015a) with few modifications. At 24 dpi, 6-cm sections of inoculated leaves were excised and placed individually in sterile 15-ml Falcon tubes containing compresses saturated



Supplementary Figure 1. *Z. tritici* biomass and sporulation on NIL^{stb} (grey) and NIL^{Stb16q} (black) after brush-inoculation. **(A)** The IPO9415 avirulent isolate and plant biomasses were measured by RT-qPCR with the IGS and 18S primers, respectively. The relative expression was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, using day 0 (just after brush-inoculation) as the reference. **(B)** Spores concentration of the virulent CFZ008 and the avirulent IPO9415 isolates 25 days post inoculation. Values are means \pm SEM [n = 10 for **(A)**; n = 9 for **(B)**]. Different letters indicate significantly different values (Linear mixed model for **(A)** and ART anova for **(B)**, $p < 0.05$).

with water. The tubes were incubated at 15°C for 48 h in the dark. Two milliliters of water supplemented with 0.05% Tween 20 were added in each tube, which were then vortexed for 30 s to wash pycnidiospores off the leaves. The spores were counted using the Malassez counting chamber. Results were obtained from nine individual leaves per condition from two independent experiments.

Cytological Analysis

Two-centimeter sections of infected leaves were harvested at 2, 4, 6, 9, and 13 dpi. These sections were stained 30 s with 0.1% Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich) in water, briefly rinsed in water, set on slides with double-side adhesive tape and mounted in Perfluorodecalin (Sigma-Aldrich). Stained samples were observed using a Leica DM5500 B fluorescent microscope with GFP (ex: 450–490 nm, em: 500–550 nm) and UV filters (ex: BP, 340–380 nm, em: LP, 425 nm) to visualize the GFP transgenic fungal line and Calcofluor White M2R, respectively. Five random Z-stack images of 621 $\mu\text{m} \times 466 \mu\text{m}$ for each 2-cm leaf sections were acquired under a 20 \times /0.5 dry objective using the LAS AF software (version 3.2.0.9652). Images were then analyzed for quantification of the spores germination rate (number of germinated spores relative to the total number of spores), the percentage of stomata reached by epiphytic hyphae (number of stomata in contact with at least one hypha relative to the total number of stomata), the percentage of penetration attempts (number of stomata with hyphae extremity, often with appressoria-like structures, diving into its ostiole relative to the total number of stomata), the percentage of successful penetrations events (number of stomata with a penetration attempt on their ostiole and with infectious hyphae in their sub-stomatal cavities relative to the total number of stomata), the percentage of secondary sub-stomatal cavities colonization (number of stomata with hyphae only in the sub-stomatal cavity, without hyphae above the ostiole relative to the total number of stomata), the percentage of early-stage pycnidia (number of stomata with branching and ring-forming hyphae in the sub-stomatal cavity relative to the total number of stomata), and the percentage of young and mature pycnidia (number of stomata with a densified hyphal structure, in the form of GFP halo, relative to the total number of stomata) (**Supplementary Figure 3**). The remainder of stained-infected leaves was mounted in Perfluorodecalin and was observed with a Leica SPE confocal under a 40X/1.15 APO OIL objective. Samples were illuminated sequentially with 488 nm (detection range, 500–554 nm) and 405 nm (detection range, 436–475 nm) lasers for GFP and CalcoFluor White M2R visualization, respectively. Images were acquired with the LAS AF software (version 3.1.3). Results were obtained from six individual leaves per condition from two independent experiments.

Stomatal Aperture Assays

Imprints of leaves were made using the Aquasil® Ultra + LV DENTSPLY SIRONA dental resin (Henry Schein). Transparent nail polish was applied on imprints, transferred on slides, and observed using an Axio Observer Z1 (Zeiss) microscope, with phase contrast under a $\times 16$ magnification. Tiles images of

0.5 cm^2 were acquired with Zeiss Zen 3.1 software (Blue edition) and then analyzed with the Fiji package of ImageJ (version 2.3.0). Stomatal aperture was then evaluated differently according to the different assays. To study stomatal behavior during 3 consecutive days, 3 tiles images per leaf were acquired, and the ratio ostioles areas over stomata areas of 50 stomata was measured for each tile images using the “freehand” tool of Fiji. Results were obtained from two individual leaves at each time point from one experiment. To observe the impact of *Stb16q* on stomatal opening, imprints were made at midday. One experiment was conducted in a controlled MTR30 Convicon® growth chamber as described above, and one in a growth chamber with a halogen lightening (Powerstar HQI-TS 250W/D Pro; 250 $\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; OSRAM GmbH, Munich, Germany). To artificially open stomata, 4 μM fusicoccin (Sigma-Aldrich) or 4 μM coronatine (Sigma-Aldrich) prepared in water supplemented with 4% (v/v) DMSO was sprayed at midday evenly on second leaves using a micro-diffuser sprayer (Ecospray). Imprints were made 30 min, 2 h or 4 h post application. To evaluate *Stb16q* and toxins impact on stomatal opening, one tile image per leaf was acquired, and all unblurred stomata on each image were classified into “closed” or “opened” categories using the “cell counter” plugin of Fiji. Results were obtained from three to five independent leaves per condition from one experiment.

Statistical Analyses

Statistical analyses were carried out using the R software version 4.1.0. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. The differences in fungal biomass were analyzed using a linear mixed model with a Tukey’s multiple range test. To evaluate the impact of *Stb16q* on stomatal aperture, proportions of closed stomata were analyzed for each day post inoculation independently using a linear mixed model. Analysis of cytological data was performed using the one-way non-parametric Van der Waerden test from “agricolae” package, combining wheat genotype, day post inoculation, and treatment in a single factor. Spores concentrations, AUDPC, and the proportions of closed stomata following 100% RH or toxin application were analyzed using the non-parametric multi-factorial method Aligned Rank Transformation (ART) ANOVA with the ART function of the ARTool package. All p -values < 0.05 were considered to be significant.

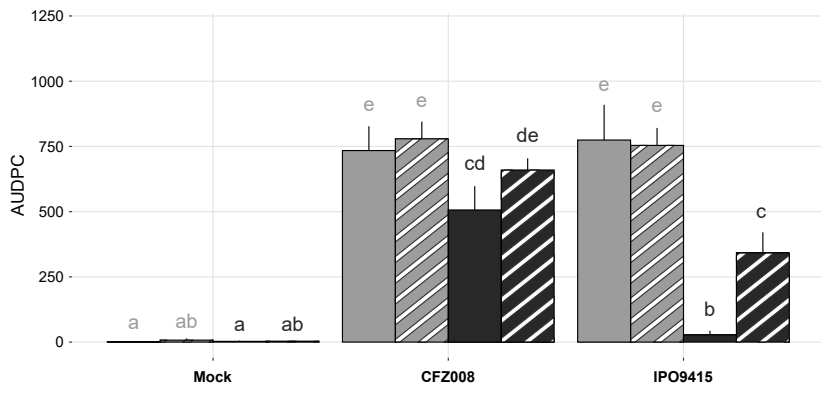
RESULTS

Stb16q-Mediated Resistance Establishes During the Asymptomatic Phase

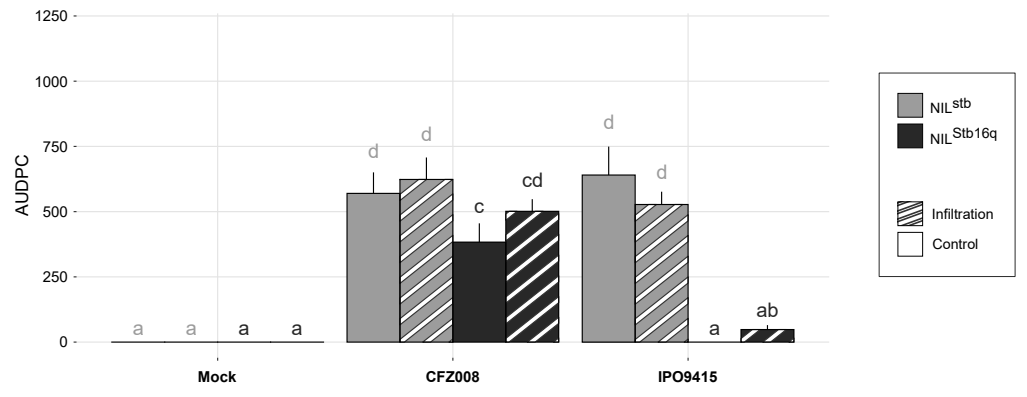
Stb16q wheat quasi near-isogenic lines (NIL^{*Stb16q*} and NIL^{*stb*}) were inoculated with the *Stb16q*-avirulent IPO9415 and the *Stb16q*-virulent CFZ008 isolates using the brush-inoculation method, which mimics natural infection. In the compatible IPO9415/NIL^{*stb*} interaction, symptoms and pycnidia appeared at 10 and 12 dpi, respectively. Two- and 4-day delays in symptoms emergence were observed for isolate CFZ008 on NIL^{*stb*} and NIL^{*Stb16q*}, respectively, compared to the IPO9415/NIL^{*stb*}

A

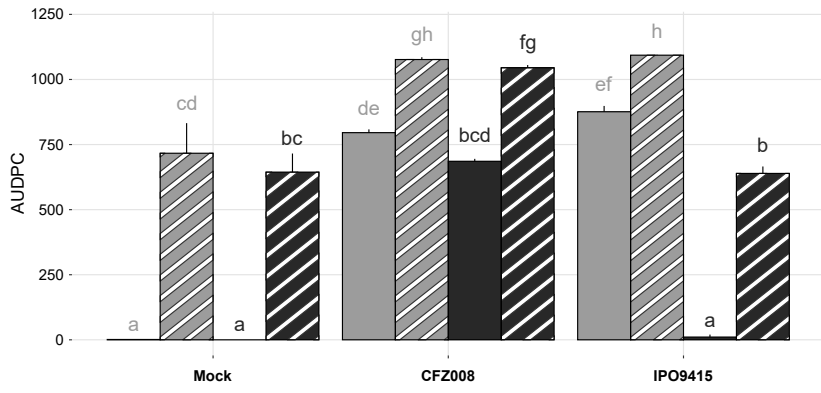
AUDPC on symptoms



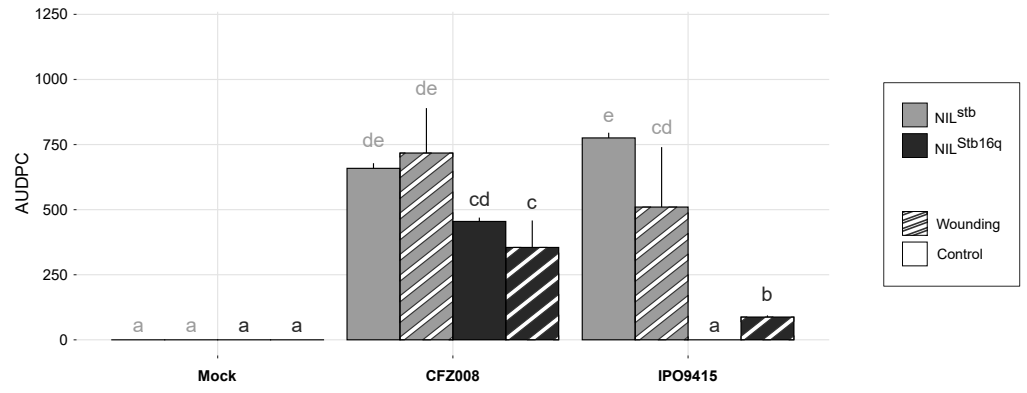
AUDPC on pycnidia

**B**

AUDPC on symptoms



AUDPC on pycnidia



Supplementary Figure 2. Symptoms (chlorosis + necrosis) and pycnidia, evaluated as the Area Under Disease Progression Curve (AUDPC), of NIL^{stb} (grey) and NIL^{Stb16q} (black) inoculated with control solution (water/Tween20 0.05% (v/v); = Mock), the IPO9415 avirulent or the CFZ008 virulent *Z. tritici* isolates and with different inoculation methods. **(A)** Comparison between brush-inoculation (empty bars) and infiltration (stripped bars) methods. **(B)** Comparison of the brush-inoculation method on unwounded (empty bars) or wounded (stripped bars) leaves. Values are means \pm SEM [n = 8 for **(A)**; n = 3 for **(B)**]. Different letters indicate significantly different values (ART anova, $p < 0.05$).

interaction. For all three compatible interactions, the leaf surface covered with symptoms and pycnidia gradually increased until almost full coverage at 21 dpi (Figures 1A,D). By contrast, no symptoms were observed in the incompatible IPO9415/NIL^{Stb16q}, except rare chlorosis (< 3% of the leaf surface). Moreover, pycnidia were not observed at any time during this interaction, and pycnidiospores could not be detected in our sporulation induction assay (Supplementary Figure 1B). In addition, the growth of the IPO9415 isolate on both *Stb16q* NILs was monitored using real-time qPCR. Until 6 dpi, no significant increase in fungal biomass was observed neither in compatible nor in incompatible interactions (Supplementary Figure 1A). Then, fungal biomass increased by a factor 2–3 every day from 7 to 14 dpi in the compatible interaction, while it remained unchanged in the incompatible interaction. These results showed that *Stb16q*-mediated resistance establishes before 7 dpi, during the asymptomatic phase.

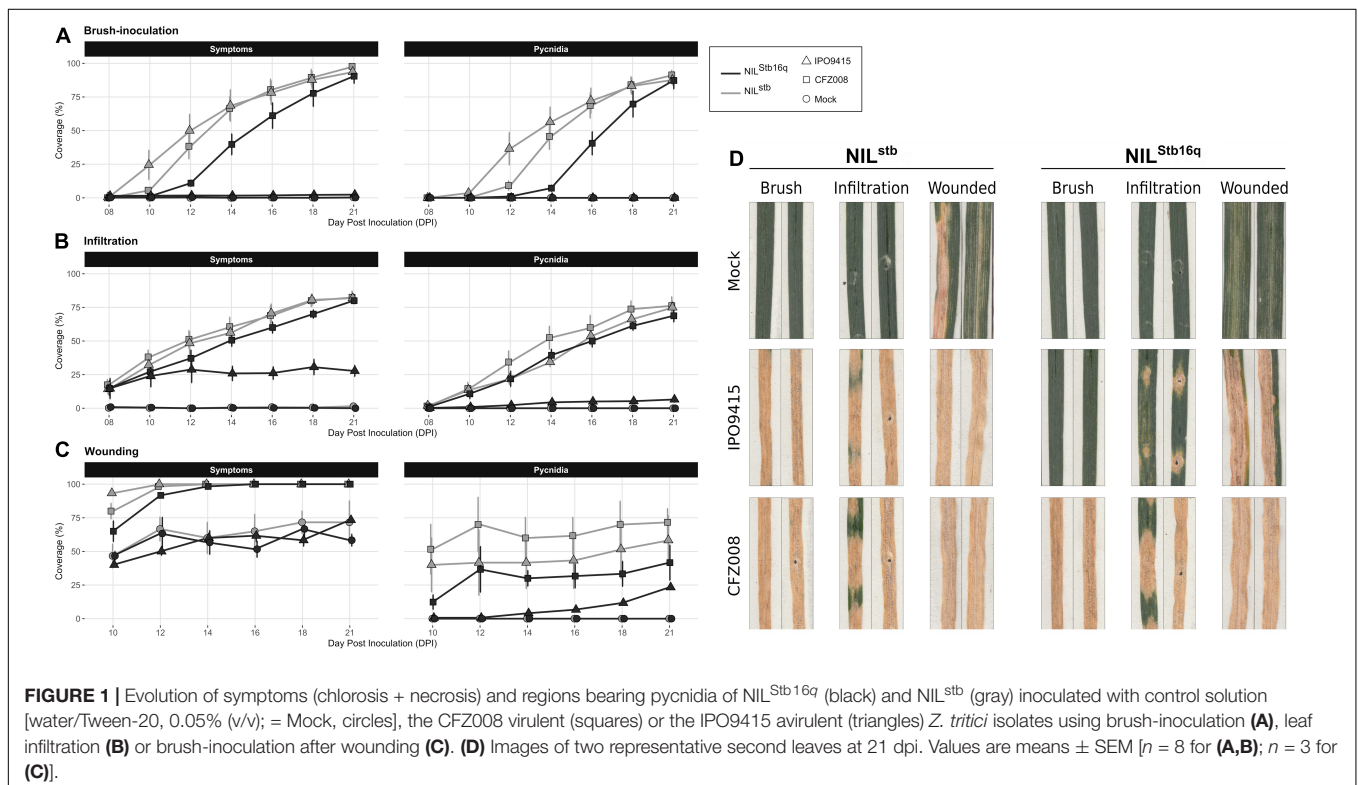
Infiltration and Wounding Allow Avirulent *Zymoseptoria tritici* to Partially Bypass *Stb16q*-Mediated Resistance

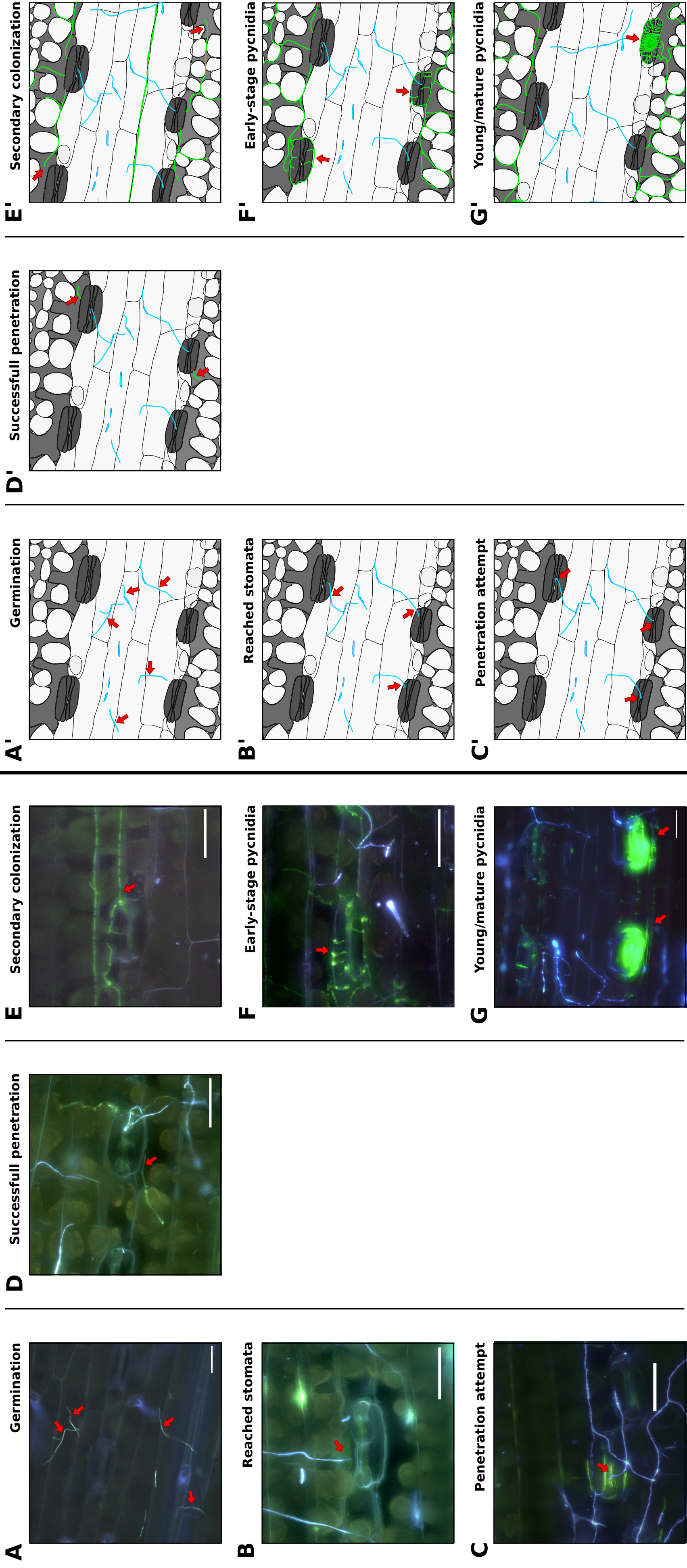
In parallel to brush-inoculation, artificial infiltration of spores of isolates IPO9415 and CFZ008 directly into the apoplast of *Stb16q* NILs was performed. Symptoms and pycnidia appeared as soon as 8 and 10 dpi, respectively, simultaneously in the three compatible interactions, and gradually extended until reaching 81% ± 1% and 73% ± 4%, respectively, of leaf coverage at 21 dpi (Figures 1B,D). Despite a delay in symptoms emergence between infiltration and brush-inoculation, no significant differences

in the area under disease progression curve (AUDPC) were observed (Supplementary Figure 2A). Interestingly, in the incompatible IPO9415/NIL^{Stb16q} interaction, symptoms and pycnidia were observed at 8 and 12 dpi, respectively (Figure 1B). However, in the incompatible interaction, the leaf surface covered with symptoms and pycnidia did not extend over 28 and 7%, respectively, at 21 dpi (Figure 1D and Supplementary Figure 2A). Isolates IPO9415 and CFZ008 were also inoculated on *Stb16q* NILs leaves gently wounded with abrasive paper. Wounding alone (mock) induced chlorosis and necrosis on leaves of both NILs (Figures 1C,D and Supplementary Figure 2B). In the three compatible interactions, pycnidia were observed at 10 dpi with 35% ± 20% of leaf coverage, and extended up to 57% ± 15% by 21 dpi (Figures 1C,D). In the incompatible interaction, pycnidia appeared at 14 dpi and covered 23% of the leaves at 21 dpi (Figures 1C,D and Supplementary Figure 2B). Together, these results showed that *Stb16q*-mediated resistance is partially bypassed when using inoculation methods (wounding and infiltration) that circumvent the penetration process, suggesting that this resistance essentially operates during *Z. tritici* penetration into a wheat leaf.

Stb16q-Mediated Resistance Arrests Avirulent *Zymoseptoria tritici* During Stomata Penetration

To investigate whether *Stb16q* stops *Z. tritici* during its penetration into leaves, the infection processes of GFP-labeled IPO9415 and CFZ008 isolates inoculated on *Stb16q* NILs were quantitatively monitored using epifluorescence and confocal





Supplementary Figure 3. Illustrations of the different stages of *Z. tritici* infection cycle on *Stb16q* NILs. Spores of virulent GFP-labelled *Z. tritici* isolates were brush-inoculated on wheat second leaves. Leaves were collected at different times post-inoculation and fungus was visualized with the chitin surface-dye calcofluor (blue) to detect external hyphae and with the GFP fluorescence. **(Left panel)** maximum projection of epifluorescence microscopy images of the different stages. Bar = 50 μ m. **(Right panel)** schematic representation of the different stages. Red arrows indicate events counted for the quantitative analysis (Figure 2). **(A, A')** Germination (= germinated spores). **(B, B')** Reached stomata (= stomata with hyphae in contact). **(C, C')** Penetration attempt (= stomata with hyphae diving into the ostiole). **(D, D')** Successful penetration (= stomata with hyphae going through the ostiole and in the sub-stomatal cavity). **(E, E')** Secondary sub-stomatal cavities colonisation (= stomata with hyphae only in the sub-stomatal cavity, without hyphae above the ostiole). **(F, F')** Early-stage pycnidia (= stomata with branching and ring-forming hyphae in the sub-stomatal cavity). **(G, G')** Young and mature pycnidia (= stomata with densified hyphae structure, in the form of GFP halo).

microscopies (**Supplementary Table 1**). Inoculated leaves were stained with the fungal chitin dye calcofluor to distinguish between epiphytic hyphae located on the leaf surface (both GFP-fluorescent and calcofluor-stained) and infectious hyphae located inside the leaf (only GFP fluorescent).

To assess the epiphytic phase, we calculated (i) the spore germination rate (**Supplementary Figure 3A**), (ii) the percentage of stomata reached by epiphytic hyphae (**Supplementary Figure 3B**), and (iii) the percentage of penetration attempts (**Supplementary Figure 3C**). In the three compatible interactions, approximately half ($44\% \pm 12\%$) of the spores germinated at 2 dpi, reaching $78\% \pm 1\%$ by 6 dpi (**Figure 2A**). It was not possible to assess the spore germination rate after 6 dpi, as too many epiphytic hyphae were present on the leaf surface. By 2 dpi, epiphytic hyphae have already reached $18\% \pm 8\%$ of stomata, and, by 4 dpi, they were in contact with $40\% \pm 11\%$ of stomata (**Figure 2B**). Among these reached stomata, half (which represented $19\% \pm 7\%$ of total stomata) underwent a penetration attempt by 4 dpi (**Figure 2C**), which was frequently associated with fungal appressoria-like structures located on stomata ostiole. The epiphytic hyphal growth did not visually increase from 6 to 9 dpi in the three compatible interactions. The percentages of reached stomata and penetration attempts also remained almost stable at 6 and 9 dpi. Epiphytic

development could not be assessed in the compatible interactions after 9 dpi due to massive infectious growth and degradation of the host tissues.

The percentage of successful penetration events was calculated by counting the number of stomata, with a penetration attempt on their ostiole and with infectious hyphae in their sub-stomatal cavities relative to the total number of stomata (**Figure 2E** and **Supplementary Figure 3D**). At 4 dpi, infectious hyphae were observed in the sub-stomatal cavities of $3\% \pm 1\%$ of stomata. At 6 dpi, hyphae successfully penetrated $12\% \pm 1\%$ of stomata. By 9 dpi, this percentage reached $22\% \pm 6\%$, which showed that almost all penetration attempts resulted in a successful penetration event (**Figure 2D**). These penetration events led to primary sub-stomatal cavities colonization, i.e., colonization from penetrating/primary infectious hyphae.

From the successful penetration events, secondary infectious hyphae colonized the mesophyll following two patterns. The first pattern relied on an extensive growth of branched hyphae around plant cells. The second pattern relied on the formation of straight hyphae, almost not branched, called runner hyphae (Rohel et al., 2001; Shetty et al., 2003; Hauelsen et al., 2019). These linear runner hyphae grew longitudinally between the epidermis and the mesophyll, up to 1 cm from the primarily colonized sub-stomatal cavity and branched at regular intervals. The secondary

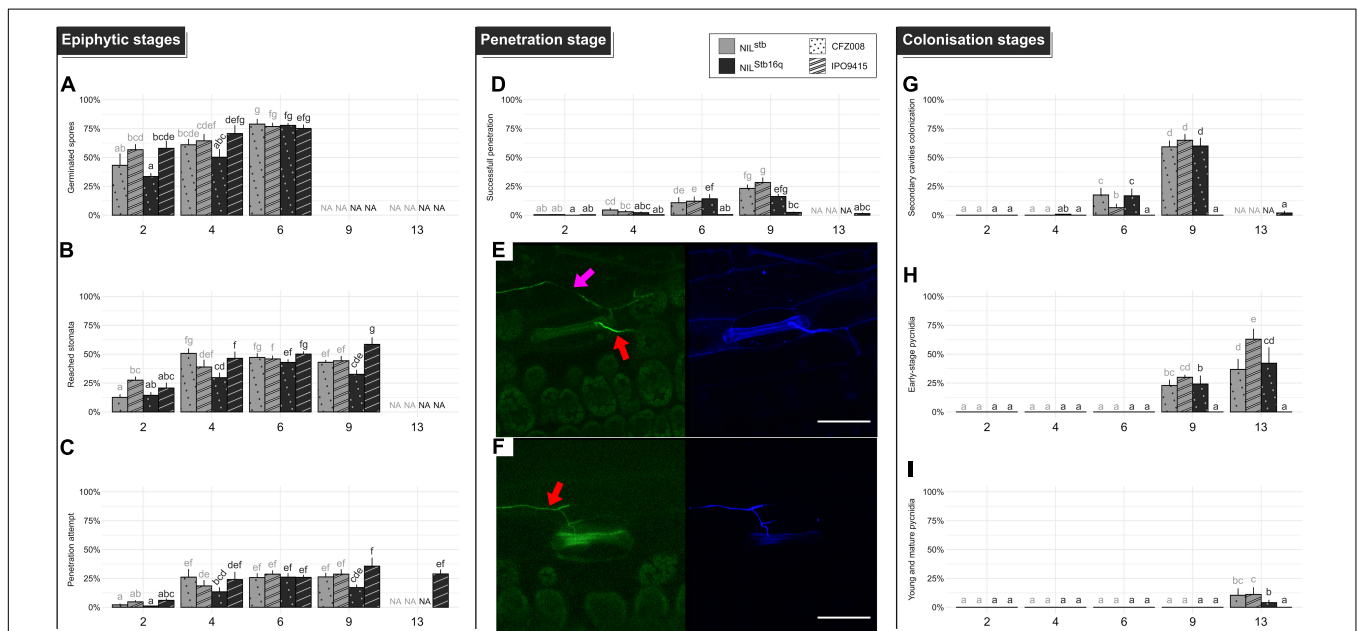
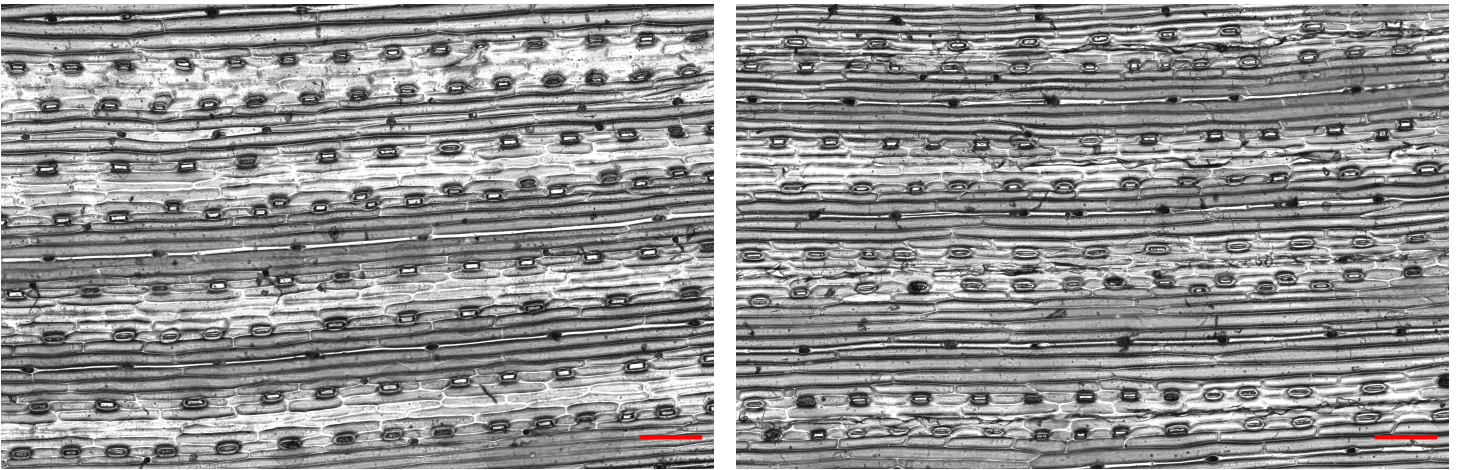
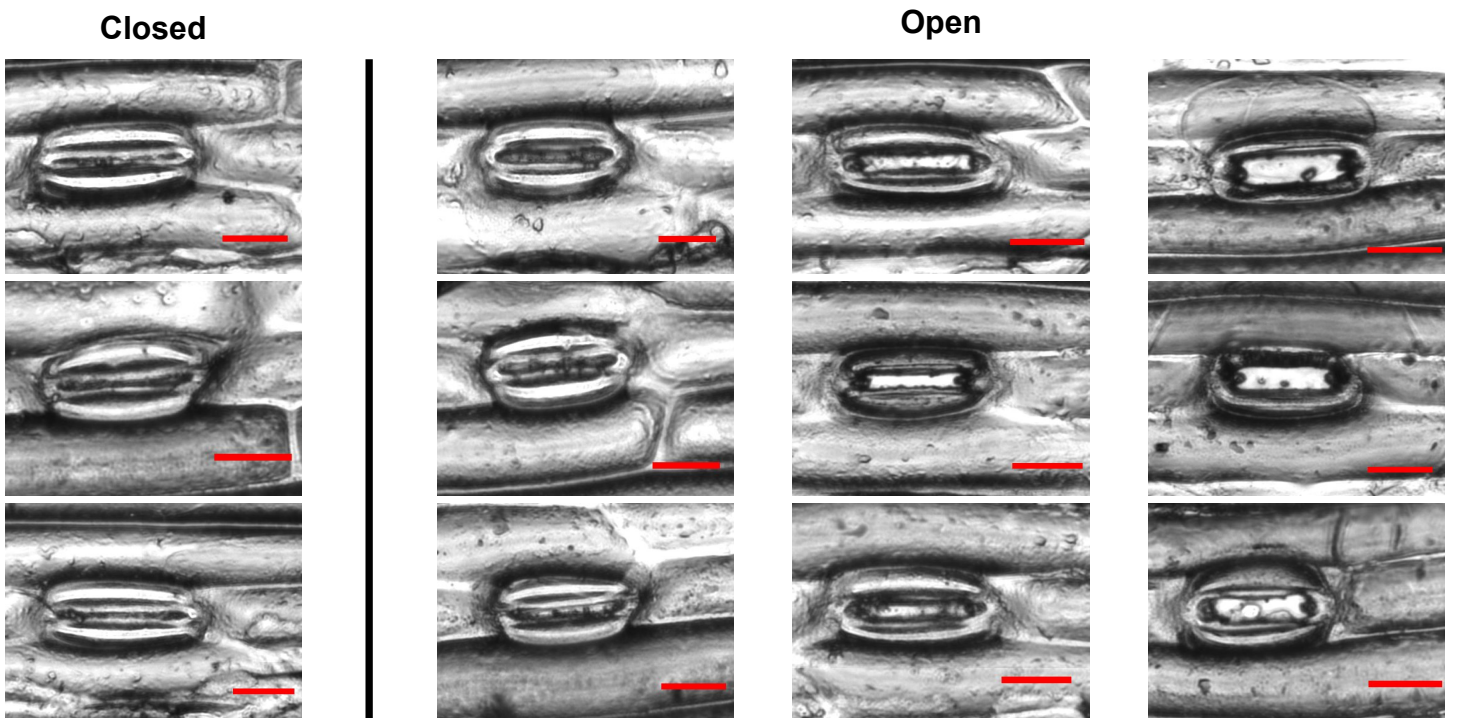


FIGURE 2 | Quantitative cytological assessment of the different stages of infection of the CFZ008 virulent (dotted bars) or the IPO9415 avirulent (stripped bars) *Z. tritici* GFP-labeled isolates inoculated on NIL^{Stb16q} (black bars) and NIL^{Stb} (gray bars). **(A)** Germination (= number of germinated spores relative to the total number of spores). **(B)** Reached stomata (= number of stomata with hyphae in contact relative to the total number of stomata). **(C)** A penetration attempt (= number of stomata with hyphae diving into the ostiole relative to the total number of stomata). **(D)** Successful penetration (= number of stomata with hyphae going through the ostiole and in the sub-stomatal cavity relative to the total number of stomata). **(G)** Secondary sub-stomatal cavities colonization (= number of stomata with hyphae only in the sub-stomatal cavity, without hyphae above the ostiole, relative to the total number of stomata). **(H)** Early-stage pycnidia (= number of stomata with branching and ring-forming hyphae in the sub-stomatal cavity relative to the total number of stomata). **(I)** Young and mature pycnidia (= number of stomata with densified hyphae structure, in the form of the GFP halo, relative to the total number of stomata). Values are means \pm SEM ($n = 6$). Different letters indicate significantly different values (Van der Waerden test, $p < 0.05$). Representative confocal images of penetration events at 6 dpi for NIL^{Stb} **(E)** and NIL^{Stb16q} **(F)**, inoculated with the GFP-labeled IPO9415 isolate (green) and stained with the fungal surface-dye calcofluor (blue). Red and pink arrows indicate hyphae on the leaf surface (green and blue) and internal hyphae (only green), respectively. Bar = 50 μ m.

A**B**

Supplementary Figure 4. Images of stomata from *Stb16q* NILs. Imprints of leaves were made using dental resin. Transparent nail polish was applied on imprints and observed under a light microscope, with phase contrast. **(A)** Representative part of 0.5 cm²-tiles images. Bar = 200 μm. **(B)** Representative stomata classified as “closed” or “open” to evaluate *Stb16q* and toxins impact on stomatal opening. Bar = 30 μm.

infectious hyphae invaded novel sub-stomatal cavities (i.e., secondary colonization) and colonized deeper in the mesophyll apoplast. To evaluate mesophyll colonization, the percentage of secondary sub-stomatal cavities colonization was quantified (Supplementary Figure 3E). By 9 dpi, $61\% \pm 3\%$ of sub-stomatal cavities were infected by secondary infectious hyphae (Figure 2G). Since 22% of sub-stomatal cavities were colonized by penetrating/primary infectious hyphae, a total of 83% of sub-stomatal cavities were colonized at 9 dpi, reflecting massive mesophyll colonization. These results, therefore, indicated that, at 9 dpi, a single penetration event leads to the colonization of 3.8 sub-stomatal cavities.

Asexual reproduction was initiated by penetration/primary or secondary infectious hyphae, forming internal rings inside sub-stomatal cavities and aggregating to further develop into young pycnidia. These young pycnidia filled up the sub-stomatal cavities and ultimately matured by growing in size and differentiating pycnidiospores expelled by the stomata ostiole. We quantified (i) the percentage of early-stage pycnidia, which is the number of sub-stomatal cavities, containing ring-forming and aggregating hyphae, relative to the total number of stomata (Supplementary Figure 3F) and (ii) the percentage of young/mature pycnidia (Supplementary Figure 3G). These young/mature pycnidia displayed an intense GFP fluorescence halo, reflecting a dense hyphal structure. At 9 dpi, $26\% \pm 4\%$ of sub-stomatal cavities were filled with early-stage pycnidia (Figure 2H). At 13 dpi, $47\% \pm 14\%$ of sub-stomatal cavities were filled with early-stage pycnidia (Figure 2H), and $8\% \pm 4\%$ of sub-stomatal cavities carried young or mature pycnidia (Figure 2I).

In the incompatible IPO9415/NIL^{Stb16q} interaction, the spore germination rate, the percentages of stomata reached by epiphytic hyphae and of penetration attempts were similar to those observed in the three compatible interactions. However, only few successful penetration events were observed up to 13 dpi (2 and 1% of total stomata at 9 and 13 dpi, respectively) (Figures 2D,F). Since 29 and 36% of stomata displayed penetration attempts in the incompatible interactions at 9 and 13 dpi, respectively, this means that only 3–5% of these attempts resulted in a successful penetration. Still, these few penetration events differed from those of compatible interactions since almost all penetrating infectious hyphae were stopped in the sub-stomatal cavity (Figures 2G–I). Overall, we only observed a single event, over 304 analyzed, in which a penetrating hypha grew in the apoplast and colonized a few neighboring sub-stomatal cavities, without initiating pycnidia formation. These results showed that *Stb16q*-mediated resistance arrests the avirulent isolate during stomata penetration but also most likely prevents hyphae mesophyll colonization from the few successful penetration events.

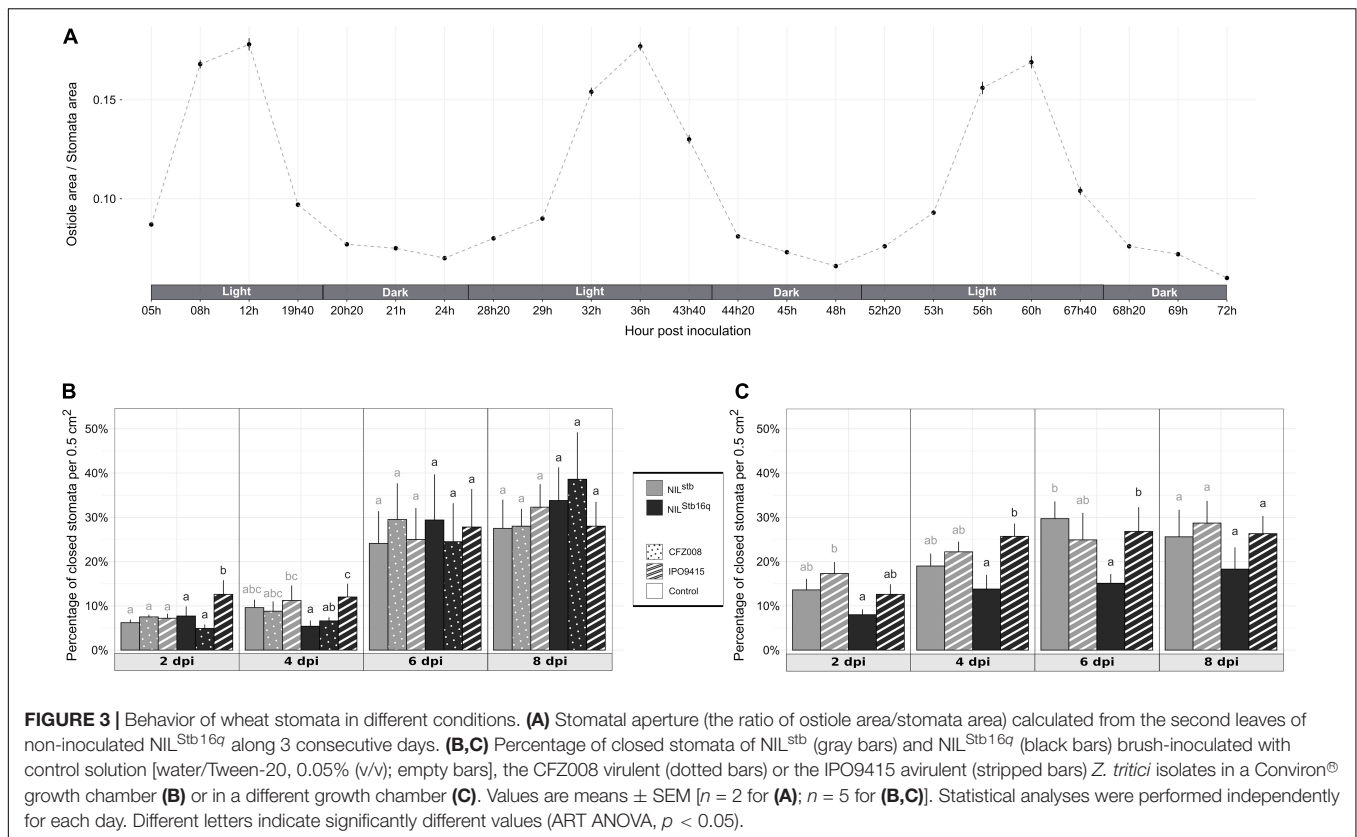
Stb16q* Induces an Early and Transient Stomatal Closure in Response to Avirulent *Zymoseptoria tritici

We investigated whether *Stb16q* induces stomatal closure, a well-known resistance mechanism limiting pathogens penetration into plant tissues (Grimmer et al., 2012). Stomatal aperture variations of NIL^{Stb16q} were assessed along three consecutive

days to identify the most relevant time to study *Stb16q* impact on stomatal closure. Stomatal opening follows a circadian cycle with a maximal opening at midday (Figure 3A). Based on this observation, the percentage of closed stomata (Supplementary Figure 4) for both *Stb16q* NILs inoculated with isolates IPO9415 and CFZ008 was then calculated at 2, 4, 6, and 8 dpi at the maximum stomatal opening time. There were no significant differences in the percentages of closed stomata between mock-inoculated NILs, between the *Z. tritici*- and mock-inoculated NIL^{Stb16q} or between the CFZ008- and mock-inoculated NIL^{Stb16q} at any time points (Figure 3B). By contrast, at 2 and 4 dpi, the percentages of closed stomata were significantly 1.6 to 2.6-fold higher in the IPO9415/NIL^{Stb16q} in compatible interaction compared to CFZ008/NIL^{Stb16q} and mock/NIL^{Stb16q} interactions. As stomatal opening is highly dependent on environmental signals (Fan et al., 2004), the percentage of closed stomata on *Stb16q* NILs inoculated with the avirulent IPO9415 isolate was assessed again in a growth chamber equipped with different lights and a different humidity control system. The variations in the percentages of closed stomata were almost similar to the previous experiment, i.e., an early stomatal closure in the incompatible interaction (1.8-fold higher) compared to the mock/NIL^{Stb16q} interaction, but with a 2-day delay (at 4 and 6 dpi) (Figure 3C). In conclusion, these data demonstrated that *Stb16q* triggers a temporary stomatal closure only when challenged by an avirulent isolate.

Fusicoccin Does Not Elicit Stomatal Opening on NIL^{Stb16q} Upon Infection With Avirulent *Zymoseptoria tritici*

To study the role of stomatal closure in *Stb16q*-mediated resistance, we investigated whether artificial stomatal opening could promote a bypass of *Stb16q*-mediated resistance by an avirulent isolate. To this end, two strategies were tested. First, 14-day-old NIL^{Stb16q} was grown at 100% relative humidity (RH), a condition known to attenuate stomatal closing in many species (Fanourakis et al., 2020). Second, NIL^{Stb16q} was sprayed with coronatine or fusicoccin that are bacterial and fungal toxins known to force stomatal opening, respectively, in *A. thaliana* and in several species, including durum wheat (Turner and Graniti, 1969; Ricciardi et al., 2003; Melotto et al., 2006). Seven days after 100% RH atmosphere, stomatal behavior of NIL^{Stb16q} was similar to our standard conditions (3 days at 100% RH, followed by 4 days at 80% RH) (Figure 4A), most likely because RH in our standard condition was already quite high. Among toxins, only fusicoccin promoted significantly stomatal opening, since 15% more stomata were opened compared to the control (Figure 4B). This effect was transient and only observed at 2 h post application. To evaluate the impact of this artificial opening on *Stb16q*-mediated resistance, fusicoccin was sprayed on NIL^{Stb16q} inoculated with CFZ008 or IPO9415 isolates. The spray was made twice with 4-h interval at 4 dpi, which corresponded to the beginning of the penetration stage in *Stb16q*-compatible interactions (Figure 2D). Treatment with fusicoccin alone on non-inoculated leaves did not induce foliar symptoms. Treatments of *Z. tritici*-inoculated leaves with fusicoccin did not



modify the outcome of the infection as symptoms were similar between control and fusicoccin-treated leaves (**Figure 4C**). Similar results were obtained when spraying fusicoccin at other kinetic points of the infection (once at 2 or 4 or 6 dpi and once per day every 2 days between 2 and 6 dpi—data not shown). These experiments showed that fusicoccin did not allow avirulent *Z. tritici* to bypass the *Stb16q*-mediated resistance mechanism. In parallel, the effect of fusicoccin on stomatal opening of IPO9415-inoculated NIL^{Stb16q} was evaluated at 4 dpi, 2 h after the second spraying. The proportion of opened stomata was similar between control and fusicoccin-treated leaves (**Figure 4D**). Overall, our results indicated that, while promoting transient stomatal opening on non-inoculated NIL^{Stb16q}, fusicoccin was not able to open stomata of NIL^{Stb16q} infected with avirulent isolate.

Infiltrated Avirulent *Zymoseptoria tritici* Partially Bypasses *Stb6* and *Stb9*-Mediated Resistances

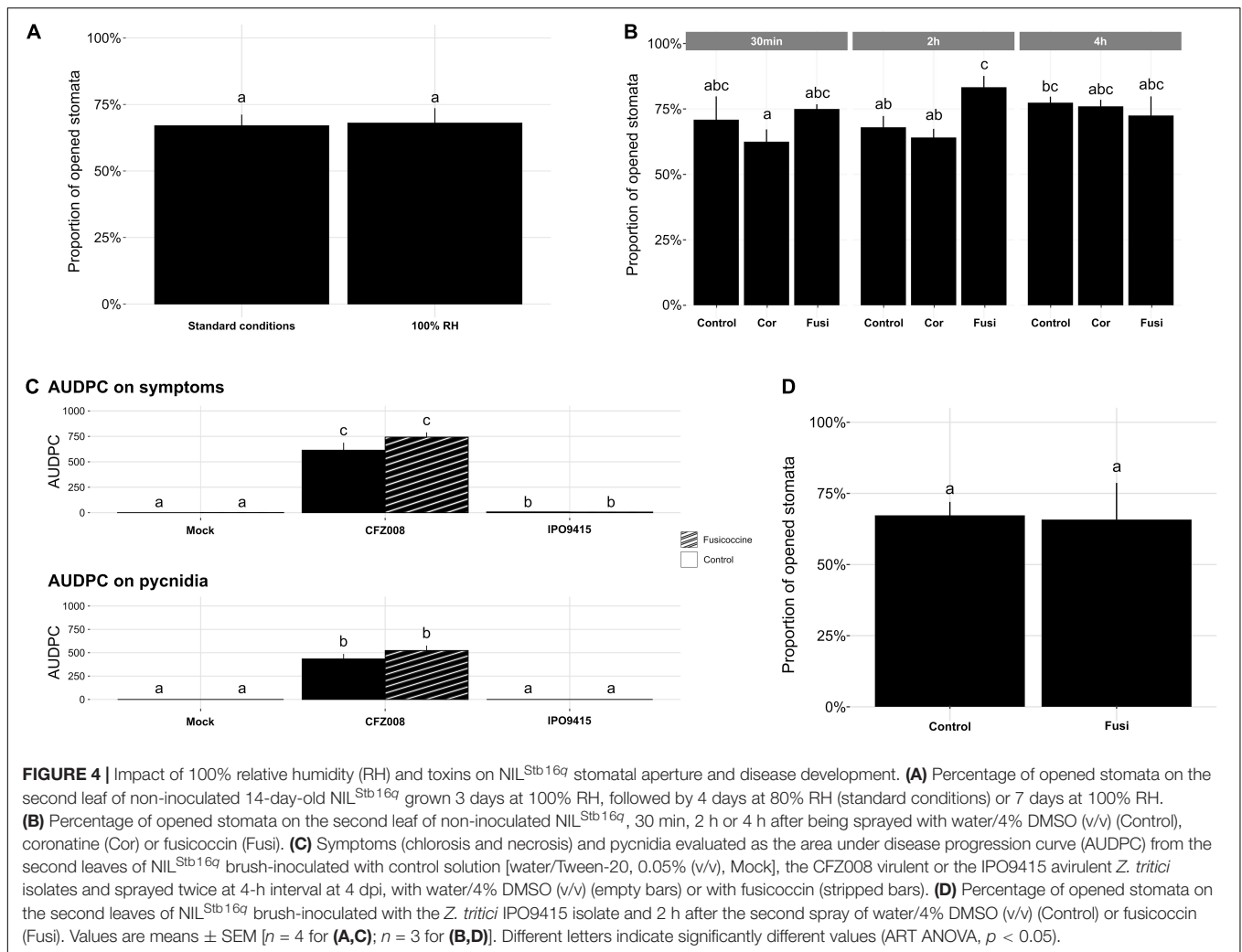
Brush-inoculations and infiltrations of avirulent (IPO323 and IPO89011) and virulent (IPO9415) isolates were performed on *Stb6* and *Stb9* NILs. Following brush-inoculation, symptoms and pycnidia appeared at 10 and 12 dpi, respectively, in all the compatible interactions, and gradually extended up to full coverage of the inoculated leaf area at 21 dpi (**Figures 5A,B**). With the infiltration method, symptoms and pycnidia appeared at 8 and 10 dpi, respectively, and extended gradually over the infiltrated area, covering 50–75% of the leaf

at 21 dpi in all the compatible interactions (**Figures 5C,D**). In the incompatible IPO323/NIL^{Stb6} and IPO89011/NIL^{Stb9} interactions, no symptoms nor pycnidia were observed at any time point when spores were applied by brush-inoculation (**Figures 5A,B**). By contrast, when using the infiltration method, symptoms and pycnidia were observed at 8 and 16 dpi, respectively, in the incompatible IPO323/NIL^{Stb6} interaction (**Figure 5C**). In the infiltrated incompatible IPO89011/NIL^{Stb9} interaction, symptoms and pycnidia were observed at 8 and 12 dpi, respectively (**Figure 5D**). In both incompatible interactions, symptoms and pycnidia did not exceed 40 and 13% of leaves coverage, respectively, which roughly corresponds to the infiltration spots (**Figures 5E,F**). In conclusion, these results indicated that, similar to *Stb16q*, avirulent isolates partially bypass *Stb6* and *Stb9*-mediated resistances when infiltrated.

DISCUSSION

Quantitative Cytological Analysis of the *Zymoseptoria tritici* Infection Process

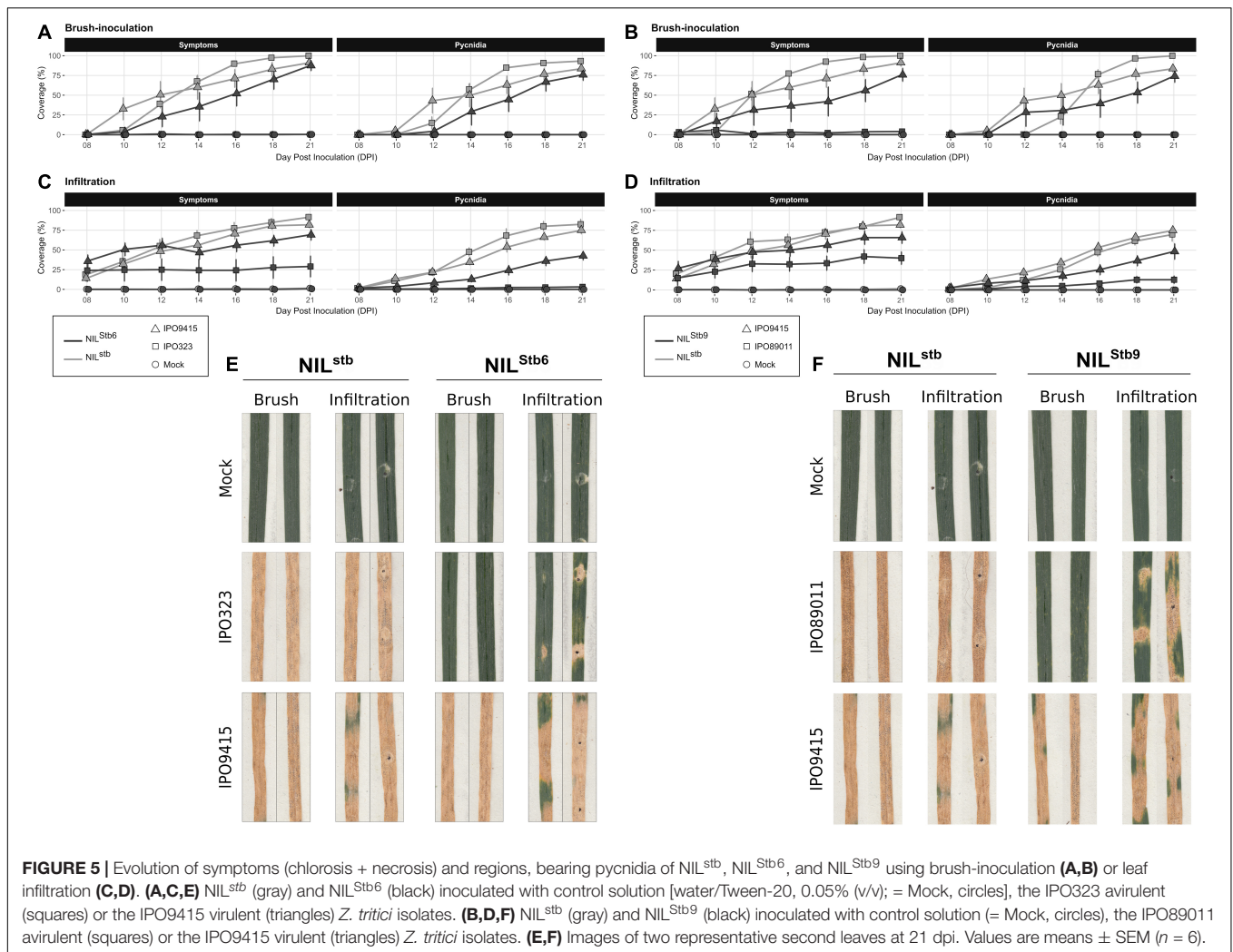
The *Z. tritici* infection cycle has been mostly studied using qualitative or semi-quantitative cytological analyses (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Duncan and Howard, 2000; Rohel et al., 2001; Shetty et al., 2003; Jing et al., 2008; Siah et al., 2010; Steinberg, 2015; Fones et al., 2017; Hauelsen et al., 2019; Fantozzi et al., 2021). Here, we presented a quantitative cytological analysis over the entire infection process. In agreement with previous



observations, we showed that penetration is a continuous and slow process as it occurs between 4 and 9 dpi, increasing in intensity with 25% of successful penetrations (relative to the number of stomata observed) reached at 9 dpi. To compare our results with previous studies, we calculated the penetration efficiency as the number of stomata with successful penetration events relative to the number of germinated spores. The penetration efficiencies in this study varied from $1\% \pm 1\%$ at 4 dpi to $7\% \pm 2\%$ at 6 dpi. Due to a dense hyphal network on the leaf surface, the number of germinated spores could not be assessed at 9 dpi. Assuming that this number has reached a maximum by 6 dpi, as reported before (Shetty et al., 2003; Siah et al., 2010; Fones et al., 2017), we estimated an efficiency of penetration of 14% at 9 dpi. Previously, Siah et al. (2010) have shown that *Z. tritici* penetrates into leaf through stomata from 2 dpi, with an efficiency of 7%, to 10 dpi, with a maximum penetration efficiency of 25%. In the study of Shetty et al. (2003) penetration of *Z. tritici* into leaves only started at 5 dpi with a 3.5% efficiency, reaching 6% by 7 dpi. In the study of Fones et al. (2017) few successful penetration events were observed at 2 dpi, but penetration mainly started after a 10-day epiphytic growth, with

an efficiency increasing from 4% at 10 dpi up to 40% by 12 dpi. While kinetics and penetration efficiencies are quite similar between the two first studies and our experiment, the study of Fones et al. (2017) differs noticeably, likely reflecting differences in experimental conditions, as proposed by the authors. In other plant pathogenic fungi entering into leaves through stomata, the penetration occurs between 1 and 6 dpi, with efficiencies ranging from 27 to 85% (Yirgou and Caldwell, 1963; Stubbs and Plotnikova, 1972; Kochman and Brown, 1976; Lazarovits and Higgins, 1976; De Wit, 1977; Liu and Harder, 1996). While most of these fungal pathogens develop specialized penetrating structures, known as appressoria, which probably speed up and enhance penetration efficiency, *Cladosporium fulvum*, which lacks appressoria, penetrates into tomato leaves from 4 dpi, with a 30% efficiency, to 6 dpi, reaching 50–70% in efficiency (Lazarovits and Higgins, 1976; De Wit, 1977). In this regard, with a maximum penetration efficiency of 14% by 9 dpi, *Z. tritici* penetration strategy appears slow and relatively underperforming.

Duncan and Howard (2000) observed that, after penetration, some infectious hyphae originating from a single penetration event colonized multiple sub-stomatal cavities



(Duncan and Howard, 2000). Here, we provided quantitative evidence of this observation, as we showed that 3.8 substomatal cavities, on average, are colonized by infectious hyphae originating from one penetration site. This massive mesophyll colonization observed from 6 to 9 dpi is consistent with the exponential increase in fungal biomass starting at 6 dpi (Supplementary Figure 1A). These results suggest that the low penetration efficiency of *Z. tritici* might be counterbalanced by a very high efficiency of apoplastic and sub-stomatal cavities colonization. The long *Z. tritici* runner hyphae (up to 1 cm, which were already described (Rohel et al., 2001; Shetty et al., 2003; Hauelsen et al., 2019), may play a substantial role in this efficient colonization.

Penetration Through Stomata: A Critical Stage for *Stb*-Mediated Resistances

We have previously reported that *Stb16q*-mediated resistance stops the avirulent *Z. tritici* isolate 3D7 early in the infection process (Saintenac et al., 2021). Here, we provided quantitative evidences that epiphytic development of the avirulent isolate

IPO9415, from germination to penetration attempt, is not affected by *Stb16q* up to 9 dpi. By contrast, we showed that the avirulent isolate is specifically blocked during the penetration stage through stomata when inoculated on NIL^{Stb16q}. While almost 100% of the penetration attempts were successful by 9 dpi in all the compatible interactions, in the incompatible IPO9415/NIL^{Stb16q} interaction, only few penetration attempts (3–5%) were successful up to 13 dpi. These infectious hyphae did not further colonize the leaf. In addition, we demonstrated that leaf infiltration of avirulent isolate IPO9415 partially bypasses *Stb16q*-mediated resistance. Our results revealed that *Stb16q*-mediated resistance is mainly acting on avirulent isolates during stomata-mediated penetration. Furthermore, we demonstrated that leaf infiltration of avirulent isolates also partially bypasses *Stb6*- and *Stb9*-mediated resistances. This suggests that blocking the fungus during its penetration into leaf may be a common mechanism in *Stb*-mediated resistances.

Previous cytological studies have compared the *Z. tritici* infection process on resistant and susceptible wheat cultivars (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Shetty et al., 2003; Jing et al., 2008; Siah et al., 2010). In line with our observations,

similar germination rates and epiphytic development were reported between compatible and incompatible interactions (Cohen and Eyal, 1993; Kema, 1996; Shetty et al., 2003; Jing et al., 2008; Siah et al., 2010), which suggest that these stages are not affected by wheat resistance mechanisms. In the most comprehensive study, Jing et al. (2008) reported three arrest patterns in the incompatible interactions between 24 *Triticum monococcum* accessions and 9 *Z. tritici* isolates. The first pattern (B) corresponded to infectious hyphae stopped in-between collapsed mesophyll cells. The second pattern (C) corresponded to an arrest of hyphal growth in the intercellular space adjacent to the mesophyll cells surrounding the penetration site. In the third pattern (D), hyphae were stopped immediately after stomata penetration and did not develop in the corresponding sub-stomatal cavity. According to our results, the arrest of the avirulent isolate on NIL^{Stb16q} is very similar to Pattern D described by Jing et al. (2008).

The genetic and molecular nature of the wheat resistances analyzed in these previous cytological studies is unknown. Therefore, it is not possible to link cytological observations and arrest stages of avirulent isolates with *Stb*- or QTL-mediated resistances as we did for *Stb16q*. A parallel between cytological observations of *Z. tritici* infection and macroscopic symptoms can still be drawn. Kema (1996) reported that the intermediate resistance (40% necrosis and 5% pycnidia) of cv. “Shafir” to the IPO235 isolate involved more mesophyll colonization, i.e., Pattern B, than the more-resistant response (5% necrosis and 1% pycnidia) of cv. “Kavkaz/K4500 L6.A.4” to the IPO87016 isolate, which was characterized by hyphae occasionally seen in the vicinity of sub-stomatal cavities, i.e., Pattern C. Studies of Shetty et al. (2003) and Siah et al. (2010) showed that avirulent isolates IPO323 and T0372 were stopped at the penetration site or in its vicinity, i.e., Pattern C, during infection of the resistant cv. “Stakado” and cv. “Scorpion,” respectively. These two cultivars showed strong resistances as infected leaves did not display any visible pycnidia, but only few chloroses. Altogether, these data emphasize the importance of quantitative cytological studies for categorizing wheat resistance mechanisms to STB. Furthermore, these studies suggest that major resistances result primarily in the arrest of the pathogen during penetration (*Stb16q*, Pattern D, and, possibly, *Stb6* and *Stb9*) or during early mesophyll colonization (Kavkaz, Stakado and Scorpion, Pattern C), while more quantitative resistances seem to block the pathogen later on during mesophyll colonization (Shafir, Pattern B).

Mechanisms Involved in *Stb16q*-Mediated Resistance

As natural openings, stomata are essential for the penetration of many pathogens (bacteria, fungi, and oomycetes) in plant tissues. To prevent pathogens invasion and sporulation, plants have deployed stomatal immunity, a defense mechanism that includes guard cell death and stomatal closure (Chen and Howlett, 1996; Grimmer et al., 2012; Pujol et al., 2016; David et al., 2019; Nogueira Júnior et al., 2020; Ye et al., 2020; Yang et al., 2021). For instance, the dicotyledonous species *Arabidopsis thaliana* and *Vitis vinifera* induce stomatal closure in response

to infection by the bacteria *Pseudomonas syringae* and by the oomycete *Plasmopara viticola*, respectively (Melotto et al., 2017; Nogueira Júnior et al., 2020). At CRKs, the best characterized CRKs, so far, have been associated with stomatal immunity as some of them modulate stomatal aperture in response to bacterial invasion (Bourdais et al., 2015; Yeh et al., 2015; Lee et al., 2017; Kimura et al., 2020). In this context, we investigated the role of stomatal closure in *Stb16q*-mediated resistance and observed a transient stomatal closure specific to the incompatible interaction. However, the similar degree of stomatal closure of this incompatible interaction compared to the compatible interactions on NIL^{stb} at 4 dpi and our failure to artificially open stomata during the incompatible interaction preclude any conclusions on the role of the *Stb16q*-triggered stomatal closure in the arrest of *Z. tritici* at the stomata.

Although the dental resin is a powerful tool to assess stomatal aperture, we were unable to detect fungal hyphae on captured images. Data presented herein are, therefore, a global assessment of all stomata, including those without a penetration attempt. Our cytological assay revealed that 25% of stomata were subjected to a penetration attempt in the incompatible interaction. However, this experiment was performed with a three-time more concentrated inoculum than in the stomatal assay. Assuming a possible linear relationship between penetration attempts and inoculum concentration, we hypothesize that only 8% of stomata were subjected to penetration attempts in our stomatal assay. This percentage is consistent with the percentage of increase in stomatal closure in the incompatible interaction, which suggests an *Stb16q*-dependent localized stomatal closure in response to penetrating hyphae. This hypothesis deserves more investigation but requires optimized techniques to visualize both stomatal aperture and fungal hyphae simultaneously.

Guard cells are highly specialized cells integrating complex environmental signals to modulate stomatal aperture (David et al., 2019). Guard cell perception of the external signals occurs mainly *via* plasma membrane-localized receptor-like protein kinases. For instance, the RLK FLS2 recognizes a conserved domain of the bacterial flagellin. This recognition triggers stomatal closure within 1–2 h, which is dependent of the BAK1 and BIK1 kinases (David et al., 2019). The *Arabidopsis* SIF2 malectin-like receptor-like kinase promotes stomatal closure in response to bacterial infection (Chan et al., 2020). By contrast, the *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-V.5 negatively regulates stomatal closure upon *Pst DC3000* infection. Interestingly, these three RLKs are overexpressed in the guard cells, following pathogens infection (Desclos-Theveniau et al., 2012; Beck et al., 2014; Chan et al., 2020). The expression and tissue localization of the plasma membrane-associated STB16 protein is still unknown, but these data question whether it follows the same pattern as these RLKs from *Arabidopsis*, which will reinforce the hypothetical role of *Stb16q* in stomatal immunity.

As proposed by Ye et al. (2020) guard cell death, ultimately leading to stomatal closure, is among the mechanisms underlying stomatal immunity to limit pathogen invasion. During the non-host resistance response of *Brassica juncea* to *Leptosphaeria maculans*, an autofluorescence and a rapid collapse of guard cells were associated with the arrest of avirulent isolates at the

stomata (Chen and Howlett, 1996). Similarly, the infection of resistant wheat carrying the 7AL locus by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* resulted in guard cell-localized autofluorescence and Trypan blue coloration, suggesting that the resistance conferred by the 7AL locus involves guard cell death (Pujol et al., 2016). In the *Z. tritici*/wheat pathosystem, stomata cell death and autofluorescence have been reported during the infection of the resistant wheat cv. “Kavkaz/K4500 L.6.A.4,” but not during the infection of the susceptible wheat cv. “Shafir” (Cohen and Eyal, 1993). However, whether these responses were localized at the penetration sites and whether they were involved in resistance were unassessed. Another study reported a localized autofluorescence at 7 dpi for 65% of the stomata subjected to penetration and penetration attempts during the infection of the resistant wheat cv. Stakado (against 2% during the infection of the susceptible wheat cv. Sevin), but without induced cell death (Shetty et al., 2003). Overall, these data and our results emphasize a potential cellular response of stomata during wheat defense against avirulent *Z. tritici* isolates.

Despite a strong arrest at penetration, avirulent *Z. tritici* managed to penetrate 2% of NIL^{*Stb16q*} stomata. With an average stomatal density of 3,200/cm² on the *Stb16q*NILs, this means that 64 successful penetrations per cm² occurred on NIL^{*Stb16q*}. The infectious hyphae resulting from these successful penetration events were arrested inside or near the infected sub-stomatal cavities. In addition, we observed that the bypass of *Stb16q*-mediated resistance following infiltration of an avirulent isolate is only partial, as symptoms and pycnidia did not extend beyond the infiltrated spots. Together, these results suggest that *Stb16q*-mediated resistance also takes place in the apoplast. Mechanisms involved in restricting *Z. tritici* during incompatible interactions have been suggested, including (i) cell wall reinforcement and remodeling (Cohen and Eyal, 1993; Shetty et al., 2009; Yang et al., 2015; Seybold et al., 2020), (ii) production of PR antifungal proteins (Shetty et al., 2009; Yang et al., 2015), and (iii) generation of a stressful apoplastic environment (Shetty et al., 2003; Yang et al., 2015). In addition, wheat CRK TaCRK3 has been shown to display *in vitro* antifungal activity (Guo et al., 2021; Wu et al., 2021), like other DUF26 containing proteins (Miyakawa et al., 2014; Ma et al., 2018; Guo et al., 2020), suggesting that a direct antifungal effect of *Stb16q* on *Z. tritici* should not be excluded.

CONCLUSION

Since little is known about the mechanisms involved in *Stb*-mediated resistance, we intended to identify when and where avirulent isolates were stopped by the *Stb16q* gene. Using wheat unique genetic resources and relevant phenotyping methodologies, we showed that *Stb16q*-mediated resistance mechanism initiates before 7 dpi during the asymptomatic phase. Then, we showed that the avirulent isolate is mainly stopped during the penetration through the stomata as only 5% of penetration attempts were successful compared to almost 100% in the compatible interactions. These penetrating infectious hyphae are not able to colonize the apoplast, suggesting the presence of an *Stb16q*-dependant apoplastic resistant response.

In response to infection by the avirulent isolate, a transient stomatal closure was observed only in the wheat NIL carrying *Stb16q*. However, more investigation is needed to determine if a local stomatal closure at the site of fungal penetration could explain the arrest of the avirulent isolate. We further confirmed that penetration is the main arrest stage of the avirulent isolate by *Stb16q* as infiltration of the avirulent isolate directly into wheat leaf apoplast partially bypasses *Stb16q*-mediated resistance. As observed for *Stb16q*, avirulent isolates infiltrated on wheat NILs carrying either the *Stb6* or the *Stb9* genes are able to partially bypass *Stb6* and *Stb9* resistance mechanisms. These results suggest that arrest of the avirulent isolates during stomata penetration might be a shared resistance mechanism mediated by *Stb* genes.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in this study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TL and CS designed the research. FC and OS developed wheat near-isogenic lines. MB and FC prepared the samples and performed the experimentations. M-HL and KS were involved in the cytological assay, from samples preparation to data analysis. MB and CS analyzed the data, prepared the figures, and wrote the manuscript. M-HL and TL proofread the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research and MB Ph.D. grant were supported by the Region Auvergne-Rhône-Alpes, the Biologie et Amélioration des Plantes INRAE department, and the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER). We also acknowledge the support received from the Agence Nationale de la Recherche of the French government through the program “Investissements d’Avenir” (16-IDEX-0001 CAP 20-25).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Florence Brizard for her help during a fusicoccin assay. We also thank the experimental infrastructure VégéPôle and Richard Blanc for their help in plant cultivation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.921074/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Acharya, B. R., Raina, S., Maqbool, S. B., Jagadeeswaran, G., Mosher, S. L., Appel, H. M., et al. (2007). Overexpression of CRK13, an *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*: overexpression of CRK13 induces pathogen defense. *Plant J.* 50, 488–499. doi: 10.1111/j.1365-3113.2007.03064.x
- Beck, M., Wyrsh, I., Strutt, J., Wimalasekera, R., Webb, A., Boller, T., et al. (2014). Expression patterns of FLAGELLIN SENSING 2 map to bacterial entry sites in plant shoots and roots. *J. Exp. Bot.* 65, 6487–6498. doi: 10.1093/jxb/eru366
- Bourdais, G., Burdiak, P., Gauthier, A., Nitsch, L., Salojärvi, J., Rayapuram, C., et al. (2015). Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning roles for CRKs in responses related to oxidative stress. *PLoS Genet.* 11:e1005373. doi: 10.1371/journal.pgen.1005373
- Brading, P. A., Verstappen, E. C. P., Kema, G. H. J., and Brown, J. K. M. (2002). A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the septoria tritici blotch pathogen. *Phytopathology* 92, 439–445. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.4.439
- Brown, J. K. M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., and Saintenac, C. (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet. Biol.* 79, 33–41. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.017
- Brown, J. K. M., Kema, G. H. J., Forrer, H.-R., Verstappen, E. C. P., Arraiano, L. S., Brading, P. A., et al. (2001). Resistance of wheat cultivars and breeding lines to septoria tritici blotch caused by isolates of *Mycosphaerella graminicola* in field trials: resistance to *Mycosphaerella graminicola* isolates. *Plant Pathol.* 50, 325–338. doi: 10.1046/j.1365-3059.2001.00565.x
- Chan, C., Panzeri, D., Okuma, E., Töldsepp, K., Wang, Y.-Y., Louh, G.-Y., et al. (2020). STRESS INDUCED FACTOR 2 regulates *Arabidopsis* stomatal immunity through phosphorylation of the anion channel SLAC1. *Plant Cell* 32, 2216–2236. doi: 10.1105/tpc.19.00578
- Chen, C.-Y., and Howlett, B. J. (1996). Rapid necrosis of guard cells is associated with the arrest of fungal growth in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) inoculated with avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48, 73–81. doi: 10.1006/pmpp.1996.0007
- Cohen, L., and Eyal, Z. (1993). The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathol.* 42, 737–743. doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01560.x
- David, L., Harmon, A. C., and Chen, S. (2019). Plant immune responses – from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. *Plant Signal. Behav.* 14:e1588667. doi: 10.1080/15592324.2019.1588667
- De Wit, P. J. G. M. (1977). A light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Neth. J. Plant Pathol.* 83, 109–122. doi: 10.1007/BF01981556
- Desclos-Theveniau, M., Arnaud, D., Huang, T.-Y., Lin, G. J.-C., Chen, W.-Y., Lin, Y.-C., et al. (2012). The *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-V.5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *PLoS Pathog.* 8:e1002513. doi: 10.1371/journal.ppat.1002513
- Duncan, K. E., and Howard, R. J. (2000). Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycol. Res.* 104, 1074–1082. doi: 10.1017/S0953756299002294
- Fabre, F., Bormann, J., Urbach, S., Roche, S., Langin, T., and Bonhomme, L. (2019). Unbalanced roles of fungal aggressiveness and host cultivars in the establishment of the *Fusarium* head blight in bread wheat. *Front. Microbiol.* 10:2857. doi: 10.3389/fmicb.2019.02857
- Fan, L.-M., Zhao, Z., and Assmann, S. M. (2004). Guard cells: a dynamic signaling model. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 537–546. doi: 10.1016/j.pbi.2004.07.009
- Fanourakis, D., Aliniaefard, S., Sellin, A., Giday, H., Körner, O., Rezaei Nejad, A., et al. (2020). Stomatal behavior following mid- or long-term exposure to high relative air humidity: a review. *Plant Physiol. Biochem.* 153, 92–105. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.05.024
- Fantozzi, E., Kilaru, S., Gurr, S. J., and Steinberg, G. (2021). Asynchronous development of *Zymoseptoria tritici* infection in wheat. *Fungal Genet. Biol.* 146:103504. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103504
- Fones, H., and Gurr, S. (2015). The impact of septoria tritici blotch disease on wheat: an EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* 79, 3–7. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.004
- Fones, H. N., Eyles, C. J., Kay, W., Cowper, J., and Gurr, S. J. (2017). A role for random, humidity-dependent epiphytic growth prior to invasion of wheat by *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet. Biol.* 106, 51–60. doi: 10.1016/j.fgb.2017.07.002
- Goodwin, S. B., Ben, M., Barek, S., Dhillon, B., Wittenberg, A. H. J., Crane, C. F., et al. (2011). Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genet.* 7:e1002070. doi: 10.1371/journal.pgen.1002070
- Grimmer, M. K., John Foulkes, M., and Paveley, N. D. (2012). Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *J. Exp. Bot.* 63, 4321–4331. doi: 10.1093/jxb/ers143
- Guo, F., Shan, Z., Yu, J., Xu, G., and Zhang, Z. (2020). The cysteine-rich repeat protein TaCRR1 participates in defense against both *Rhizoctonia cerealis* and *Bipolaris sorokiniana* in wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 21:5698. doi: 10.3390/ijms21165698
- Guo, F., Wu, T., Shen, F., Xu, G., Qi, H., and Zhang, Z. (2021). The cysteine-rich receptor-like kinase TaCRK3 contributes to defense against *Rhizoctonia cerealis* in wheat. *J. Exp. Bot.* 72, 6904–6919. doi: 10.1093/jxb/erab328
- Hausein, J., Möller, M., Eschenbrenner, C. J., Grandaubert, J., Seybold, H., Adamiak, H., et al. (2019). Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecol. Evol.* 9, 275–294. doi: 10.1002/ece3.4724
- Jing, H., Lovell, D., Gutteridge, R., Jenk, D., Korniyukhin, D., Mitrofanova, O. P., et al. (2008). Phenotypic and genetic analysis of the *Triticum monococcum* – *Mycosphaerella graminicola* interaction. *New Phytol.* 179, 1121–1132. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02526.x
- Kema, G. (1996). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86, 777–786. doi: 10.1094/Phyto-86-777
- Kema, G. H. J., Verstappen, E. C. P., and Waalwijk, C. (2000). Avirulence in the wheat septoria tritici leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* is controlled by a single locus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 1375–1379. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.12.1375
- Keon, J., Antoniw, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J. L., Baker, J. M., et al. (2007). Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to Programmed Cell Death (PCD) of its susceptible wheat host. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 178–193. doi: 10.1094/MPMI-20-2-0178
- Kimura, S., Hunter, K., Vaahtera, L., Tran, H. C., Citterico, M., Vaattovaara, A., et al. (2020). CRK2 and C-terminal phosphorylation of NADPH oxidase RBOHD regulate reactive oxygen species production in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 32, 1063–1080. doi: 10.1105/tpc.19.00525
- Kochman, J. K., and Brown, J. F. (1976). Host and environmental effects on the penetration of oats by *Puccinia graminis* avenae and *Puccinia coronata* avenae. *Ann. Appl. Biol.* 82, 251–258. doi: 10.1111/j.1744-7348.1976.tb00560.x
- Lazarovits, G., and Higgins, V. J. (1976). Histological comparison of *Cladosporium fulvum* race 1 on immune, resistant, and susceptible tomato varieties. *Can. J. Bot.* 54, 224–234. doi: 10.1139/b76-022
- Lee, D. S., Kim, Y. C., Kwon, S. J., Ryu, C.-M., and Park, O. K. (2017). The *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase CRK36 regulates immunity through interaction with the cytoplasmic kinase BIK1. *Front. Plant Sci.* 8:1856. doi: 10.3389/fpls.2017.01856
- Lee, W.-S., Rudd, J. J., and Kanyuka, K. (2015b). Virus induced gene silencing (VIGS) for functional analysis of wheat genes involved in *Zymoseptoria tritici* susceptibility and resistance. *Fungal Genet. Biol.* 79, 84–88. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.006
- Lee, W.-S., Devonshire, B. J., Hammond-Kosack, K. E., Rudd, J. J., and Kanyuka, K. (2015a). Deregulation of plant cell death through disruption of chloroplast functionality affects asexual sporulation of *Zymoseptoria tritici* on wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28, 590–604. doi: 10.1094/MPMI-10-14-0346-R
- Liu, J. Q., and Harder, D. E. (1996). Components of resistance in barley to stem rust: pre- and post-penetration development in seedling and adult plant leaves. *Can. J. Bot.* 74, 1305–1312. doi: 10.1139/b96-158
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Ma, L.-S., Wang, L., Trippel, C., Mendoza-Mendoza, A., Ullmann, S., Moretti, M., et al. (2018). The *Ustilago maydis* repetitive effector Rsp3 blocks the antifungal activity of mannose-binding maize proteins. *Nat. Commun.* 9:1711. doi: 10.1038/s41467-018-04149-0
- Marchegiani, E., Sidhu, Y., Haynes, K., and Lebrun, M.-H. (2015). Conditional gene expression and promoter replacement in *Zymoseptoria tritici* using fungal

- nitrate reductase promoters. *Fungal Genet. Biol.* 79, 174–179. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.021
- McDonald, B. A., and Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 349–379. doi: 10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S. Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969–980. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.054
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., and He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiol.* 174, 561–571. doi: 10.1104/pp.16.01853
- Miyakawa, T., Hatano, K., Miyauchi, Y., Suwa, Y., Sawano, Y., and Tanokura, M. (2014). A secreted protein with plant-specific cysteine-rich motif functions as a mannose-binding lectin that exhibits antifungal activity. *Plant Physiol.* 166, 766–778. doi: 10.1104/pp.114.242636
- Nogueira Júnior, A. F., Tränkner, M., Ribeiro, R. V., von Tiedemann, A., and Amorim, L. (2020). Photosynthetic cost associated with induced defense to *Plasmopara viticola* in grapevine. *Front. Plant Sci.* 11:235. doi: 10.3389/fpls.2020.00235
- Pujol, V., Robles, J., Wang, P., Taylor, J., Zhang, P., Huang, L., et al. (2016). Cellular and molecular characterization of a stem rust resistance locus on wheat chromosome 7AL. *BMC Res. Notes* 9:502. doi: 10.1186/s13104-016-2320-z
- Ricciardi, L., Sparapano, L., and Graniti, A. (2003). Use of fusaric acid in the early selection of durum wheat for tolerance to water stress. *Phytopathol. Mediterr.* 42, 27–34. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1693
- Rohel, E. A., Payne, A. C., Fraaije, B. A., and Hollomon, D. W. (2001). Exploring infection of wheat and carbohydrate metabolism in *Mycosphaerella graminicola* transformants with differentially regulated green fluorescent protein expression. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 156–163.
- Saintenac, C., Cambon, F., Aouini, L., Verstappen, E., Ghaffary, S. M. T., Poucet, T., et al. (2021). A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against septoria tritici blotch. *Nat. Commun.* 12:433. doi: 10.1038/s41467-020-20685-0
- Saintenac, C., Lee, W.-S., Cambon, F., Rudd, J. J., King, R. C., Marande, W., et al. (2018). Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nat. Genet.* 50, 368–374. doi: 10.1038/s41588-018-0051-x
- Seybold, H., Demetrowitsch, T. J., Hassani, M. A., Szymczak, S., Reim, E., Hauelsen, J., et al. (2020). A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nat. Commun.* 11:1910. doi: 10.1038/s41467-020-15633-x
- Shetty, N. P., Jensen, J. D., Knudsen, A., Finnie, C., Geshi, N., Blennow, A., et al. (2009). Effects of -1,3-glucan from septoria tritici on structural defence responses in wheat. *J. Exp. Bot.* 60, 4287–4300. doi: 10.1093/jxb/erp269
- Shetty, N. P., Kristensen, B. K., Newman, M.-A., Møller, K., Gregersen, P. L., and Jørgensen, H. J. L. (2003). Association of hydrogen peroxide with restriction of septoria tritici in resistant wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62, 333–346. doi: 10.1016/S0885-5765(03)00079-1
- Siah, A., Deweer, C., Duyme, F., Sanssené, J., Durand, R., Halama, P., et al. (2010). Correlation of in planta endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*: xylanase and septoria tritici blotch. *Plant Pathol.* 59, 661–670. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02303.x
- Sidhu, Y. S., Chaudhari, Y. K., Usher, J., Cairns, T. C., Csukai, M., and Haynes, K. (2015). A suite of Gateway-compatible ternary expression vectors for functional analysis in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet. Biol.* 79, 180–185. doi: 10.1016/j.fgb.2015.03.021
- Steinberg, G. (2015). Cell biology of *Zymoseptoria tritici* : pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genet. Biol.* 79, 17–23. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.002
- Stephens, C., Hammond-Kosack, K. E., and Kanyuka, K. (2022). WAKsing plant immunity, waning diseases. *J. Exp. Bot.* 73, 22–37. doi: 10.1093/jxb/erab422
- Stubbs, R. W., and Plotnikova, J. M. (1972). Uredospore germination and germ tube penetration of *Puccinia striiformis* in seedling leaves of resistant and susceptible wheat varieties. *Neth. J. Plant Pathol.* 78, 258–264. doi: 10.1007/BF01976434
- Torriani, S. F. F., Melichar, J. P. E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., and Courbot, M. (2015). *Zymoseptoria tritici*: a major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet. Biol.* 79, 8–12. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.010
- Turner, N. C., and Graniti, A. (1969). Fusaric acid: a fungal toxin that opens stomata. *Nature* 223, 1070–1071. doi: 10.1038/2231070a0
- van der Burgh, A. M., and Joosten, M. H. A. J. (2019). Plant immunity: thinking outside and inside the box. *Trends Plant Sci.* 24, 587–601. doi: 10.1016/j.tplants.2019.04.009
- Wu, T., Guo, F., Xu, G., Yu, J., Zhang, L., Wei, X., et al. (2021). The receptor-like kinase TaCRK-7A inhibits *Fusarium pseudograminearum* growth and mediates resistance to *Fusarium* crown rot in wheat. *Biology* 10:1122. doi: 10.3390/biology10111122
- Yadeta, K. A., Elmore, J. M., Creer, A. Y., Feng, B., Franco, J. Y., Rufian, J. S., et al. (2017). A cysteine-rich protein kinase associates with a membrane immune complex and the cysteine residues are required for cell death. *Plant Physiol.* 173, 771–787. doi: 10.1104/pp.16.01404
- Yang, F., Li, W., Derbyshire, M., Larsen, M. R., Rudd, J. J., and Palmisano, G. (2015). Unraveling incompatibility between wheat and the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* through apoplast proteomics. *BMC Genomics* 16:362. doi: 10.1186/s12864-015-1549-6
- Yang, L.-N., Liu, H., Wang, Y.-P., Seematti, J., Grenville-Briggs, L. J., Wang, Z., et al. (2021). Pathogen-mediated stomatal opening: a previously overlooked pathogenicity strategy in the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 12:668797. doi: 10.3389/fpls.2021.668797
- Yang, N., McDonald, M. C., Solomon, P. S., and Milgate, A. W. (2018). Genetic mapping of Stb19, a new resistance gene to *Zymoseptoria tritici* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 131, 2765–2773. doi: 10.1007/s00122-018-3189-0
- Ye, W., Munemasa, S., Shinya, T., Wu, W., Ma, T., Lu, J., et al. (2020). Stomatal immunity against fungal invasion comprises not only chitin-induced stomatal closure but also chitosan-induced guard cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 20932–20942. doi: 10.1073/pnas.1922319117
- Yeh, Y.-H., Chang, Y.-H., Huang, P.-Y., Huang, J.-B., and Zimmerli, L. (2015). Enhanced *Arabidopsis* pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases. *Front. Plant Sci.* 6:322. doi: 10.3389/fpls.2015.00322
- Yrigou, D., and Caldwell, R. M. (1963). Stomatal penetration of wheat seedlings by stem and leaf rust: effect of light and carbon dioxide. *Science* 141, 272–273. doi: 10.1126/science.141.3577.272

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Battache, Lebrun, Sakai, Soudière, Cambon, Langin and Saintenac. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CONCLUSION

Les résultats contenus dans ce premier chapitre avaient pour objectif la caractérisation fine du lieu et du stade d'arrêt d'un isolat de *Z. tritici* avirulent lors d'une interaction incompatible impliquant le gène majeur de résistance *Stb16q*. Les résultats des expériences d'infiltration et l'analyse cytologique quantitative fine et comparative de l'ensemble des étapes de la pathogénèse ont permis de démontrer clairement qu'avec 92 % des hyphes bloqués au niveau du stomate (stade d'arrêt D), contre moins de 5 % pour les interactions compatibles, la pénétration et les stomates représentent le stade et le lieu d'arrêt majeurs de *Z. tritici*. Un blocage secondaire a été observé lors de la colonisation de l'apoplasme, où les 8 % d'hyphes ayant réussi à pénétrer les tissus végétaux sont bloqués dans ou à proximité des cavités sous-stomatiques (stade d'arrêt C).

CHAPITRE 2 : « OU » ET « QUAND » *Z. TRITICI* EST-IL ARRÊTÉ AU COURS D'AUTRES INTERACTIONS INCOMPATIBLES ?

INTRODUCTION

Les résultats présentés dans le Chapitre 1 ont démontré que l'étape de pénétration et les stomates constituaient le stade et le lieu d'arrêt majeurs de *Z. tritici*. Toutefois, ces résultats se basent sur l'analyse d'une unique interaction incompatible entre l'isolat avirulent IPO9415 et le gène *Stb16q*. Des variations isolat-spécifiques dans le lieu et le stade d'arrêt de *Z. tritici* lors de la résistance médiée par *Stb16q* ne sont donc pas à exclure. D'autre part, la mise en œuvre de différentes sources majeures de résistance pourrait également être à l'origine de divergences qualitatives (absence/présence) et/ou quantitatives (différentes proportions) dans les lieux et stades d'arrêt de l'agent pathogène. Afin de mieux comprendre l'importance du blocage à la pénétration dans la résistance du blé à la septoriose, il semblait nécessaire de déterminer si le lieu et le stade d'arrêt, et leurs importances relatives observées pour l'interaction *Stb16q* / IPO9415, sont également retrouvés lors d'interactions incompatibles impliquant d'autres isolats avirulents et/ou d'autres gènes *Stb*.

L'objectif de ce deuxième chapitre consistait donc à caractériser finement les lieux et stades d'arrêt de *Z. tritici* lors d'interactions incompatibles impliquant *Stb16q* et cinq isolats avirulents différents d'une part, et quatre autres gènes *Stb* (*Stb5*, *Stb6*, *Stb7* et *Stb9*) et des isolats avirulents correspondants d'autre part.

Isolat	Profil de virulence					Provenance	Référence
	<i>Stb5</i>	<i>Stb6</i>	<i>Stb7</i>	<i>Stb9</i>	<i>Stb16q</i>		
IPO9415	av	vir	vir	vir	av	Champs de blé français Cultivar Premio (2009)	
CFZ008	av	vir	vir	vir	vir	Champs de blé français Cultivar Cellule (2016)	
IPO89011	av	vir	vir	av	av	Champs de blé néerlandais (1989)	Brown et al., 2001
IPO323	?	av	?	vir	av	Champs de blé néerlandais Cultivar Arminda (1981)	Goodwin et al., 2011
ISR398	av	vir	av	av?	av	Champs de blé israélien	Cohen et al., 1993
IPO92006	vir	vir	vir	vir	av	Champs de blé portugais	Jing et al., 2008
IPO94269	av	vir	vir	vir	av	Champs de blé allemand et néerlandais Cultivar Vivant ? (1994)	Kema et al., 1996 Jing et al., 2008
SE19010	?	av	?	vir	vir?	Champs de blé français Cultivar Nogal (2019)	
IPO88004	?	?	?	?	av	Champs de blé éthiopien	Arraiano et al., 2006

TABLE 1. PROFIL DE VIRULENCE DES DIFFERENTS ISOLATS DE *Z. TRITICI* INOCULES SUR LES NILS *STB*.

av = avirulent ; vir = virulent

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL VEGETAL

Les expérimentations de ce chapitre ont été conduites avec les NIL^{stb}, NIL^{Stb6} et NIL^{Stb9} décrites dans le Chapitre 1. En complément, les NIL^{Stb5} et NIL^{Stb7} ont été construites comme suit. La NIL^{Stb5} a été obtenue après un croisement F₁ CS × CS-Synthetic 6X, un rétrocroisement avec le parent CS et quatre rétrocroisements avec la NIL^{stb}. À chaque génération, les plantes ont été phénotypées avec l'isolat IPO94269 et génotypées avec les marqueurs SSR gwm044 et wmc405 pour maintenir l'hétérozygotie de *Stb5* dans la descendance. Une plante BC₃F₁ hétérozygote pour *Stb5* a été autofécondée et un descendant portant l'allèle de résistance *Stb5* à l'état homozygote a été sélectionné et nommé NIL^{Stb5}. La NIL^{Stb7} a été développée similairement à la NIL^{Stb5}, en commençant par un croisement F₁ CS × Estenzuela Federal et en utilisant l'isolat ISR398 pour le phénotypage et les marqueurs SSR wmc313, wmc219 et wmc497 pour le génotypage.

MATERIEL FONGIQUE

Les isolats de *Z. tritici* utilisés pour les expérimentations de ce chapitre et leurs profils de virulence sont listés dans la **TABLE 1**. Pour les analyses cytologiques, des transformants GFP des isolats IPO89011, IPO323, IPO92006 ont été réalisés selon le même mode opératoire que celui décrit dans le matériel et méthode de l'article du Chapitre 1.

PROCEDURES EXPERIMENTALES

Les cultures des plantes et de *Z. tritici*, les procédures d'inoculation et les expérimentations d'infiltration et de cytologie de ce chapitre ont été réalisées selon les modes opératoires mis en place dans le Chapitre 1 et décrits dans le [matériel et méthode de l'article](#), à l'exception du système de feuilles attachées qui n'a pas été utilisé. Les analyses cytologiques ont été menées à 6 et 9 jours post-inoculation (jpi), qui sont les premiers points de cinétique pour lesquels des différences significatives dans les pénétrations réussies ont été observées entre interactions compatibles et incompatible sur les NIL^{Stb16q}. Les résultats des essais d'infiltration ont été obtenus à partir de trois feuilles individuelles par condition provenant d'une expérimentation. Les résultats des essais de cytologie ont été obtenus à partir de dix feuilles individuelles par condition provenant de deux expérimentations indépendantes, excepté pour l'essai cytologique sur les NILs *Stb5* qui a été réalisé à partir de cinq feuilles individuelles par condition provenant d'une expérimentation.

ANALYSES STATISTIQUES

Les données des essais d'infiltration ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis, en comparant les deux méthodes d'inoculation pour chaque combinaison génotype de blé × traitement indépendamment. Les données cytologiques ainsi que les taux de pénétrations réussies ont été analysés selon la méthode décrite dans le [matériel et méthode de l'article](#) du Chapitre 1 (test statistique de Van der Waerden). L'efficacité de blocage à la pénétration a été analysée à l'aide d'un test exact de Fisher.

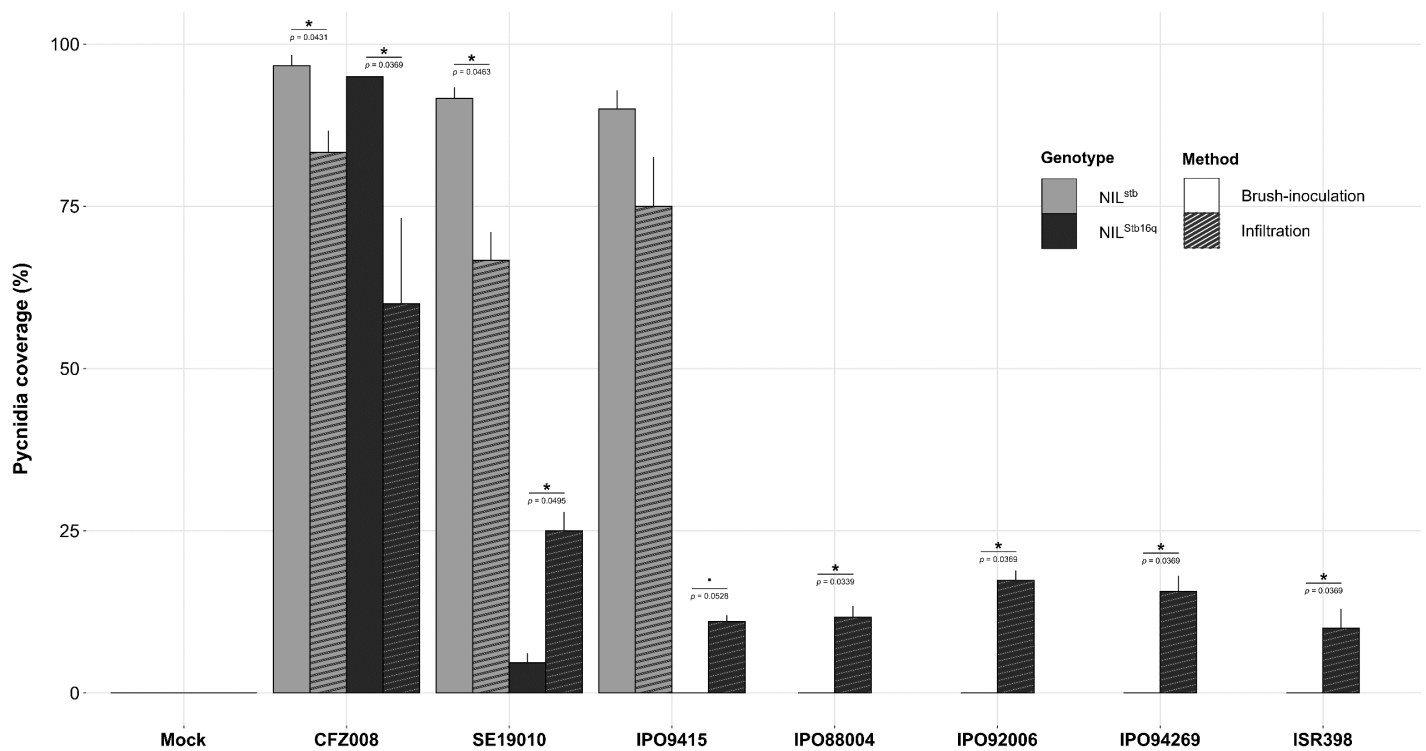


FIGURE 7. SURFACE FOLIAIRE COUVERTE DE PYCNIDES 21 JOURS APRES INOCULATION DE DIFFERENTS ISOLATS DE *Z. TRITICI* SUR LES NILS *STB16Q*.

La NIL^{Stb16q} (noir) et la NIL^{stb} (gris) ont été inoculées au pinceau (bars vides) ou par infiltration dans l'apoplasme (bars rayées) avec une solution contrôle (eau/Tween20 0.05% (v/v) ; = Mock) ou avec des spores d'isolats de *Z. tritici* virulent (CFZ008) ou avirulents (SE19010, IPO9415, IPO88004, IPO92006, IPO94269, ISR398). Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM [$n = 3$]. Les symboles indiquent des valeurs significativement différentes entre l'inoculation au pinceau et l'infiltration pour un même isolat (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

RESULTATS

LIEU(X) ET STADE(S) D'ARRET POUR LES INTERACTIONS INCOMPATIBLES *STB16Q* / *Z. TRITICI*

Les résultats du Chapitre 1 ont démontré, par une approche par infiltration de spores dans l'apoplasme et par des analyses cytologiques quantitatives, que la pénétration était l'étape majeure de blocage du champignon dans la résistance médiée par *Stb16q* contre l'isolat avirulent IPO9415. Dans ce chapitre, l'approche par infiltration a été utilisée similairement chez la NIL^{Stb16q} avec cinq nouveaux isolats avirulents (SE19010, IPO88004, IPO92006, IPO94269 et ISR398) et comparée avec l'inoculation au pinceau afin d'évaluer si le contournement de la résistance médiée par *Stb16q* lors de l'infiltration de l'isolat IPO9415 (et donc le blocage à la pénétration) est une réponse isolat-spécifique ou non. Les isolats CFZ008 et IPO9415 ont également été infiltrés dans les NILs *Stb16q* en tant que contrôles.

Pour les interactions NIL^{stb}/CFZ008, NIL^{Stb16q}/CFZ008, NIL^{stb}/SE19010 et NIL^{stb}/IPO9415, entre 60 et 97 % de la surface foliaire était couverte de pycnides 21 jours après inoculation au pinceau et après infiltration, confirmant le caractère compatible attendu de ces interactions (FIGURE 7). Aucun pycnide n'a été observé pour les isolats IPO9415, IPO88004, IPO92006, IPO94269 et ISR398 inoculés au pinceau sur la NIL^{Stb16q}, confirmant leur caractère avirulent sur *Stb16q*. L'isolat SE19010 présentait lui moins de 5 % de pycnides lorsqu'inoculé au pinceau sur la NIL^{Stb16q}. En revanche, l'ensemble de ces isolats, y compris l'isolat SE19010, ont développé 10 à 20 % de pycnides de plus après infiltration dans l'apoplasme qu'après inoculation au pinceau sur la NIL^{Stb16q}. Ces résultats montrent que, pour les interactions incompatibles avec ces cinq nouveaux isolats comme pour l'interaction incompatible avec IPO9415, la résistance médiée par *Stb16q* a été partiellement contournée lorsque les premières étapes de la pathogénèse (développement épiphyte et pénétration) ont été contournées, suggérant que la pénétration par les stomates constitue un stade d'arrêt majeur pour ces interactions incompatibles également.

LIEU(X) ET STADE(S) D'ARRET POUR LES INTERACTIONS INCOMPATIBLES AUTRES GENES *STB* / *Z. TRITICI*

APPROCHE PAR INFILTRATION DE SPORES DE *Z. TRITICI* DANS L'APOPLASME DE NILS

Afin d'évaluer si le contournement de la résistance médiée par *Stb16q* lors de l'infiltration de spores d'isolats avirulents de *Z. tritici* (et donc le blocage à la pénétration) est une réponse gène

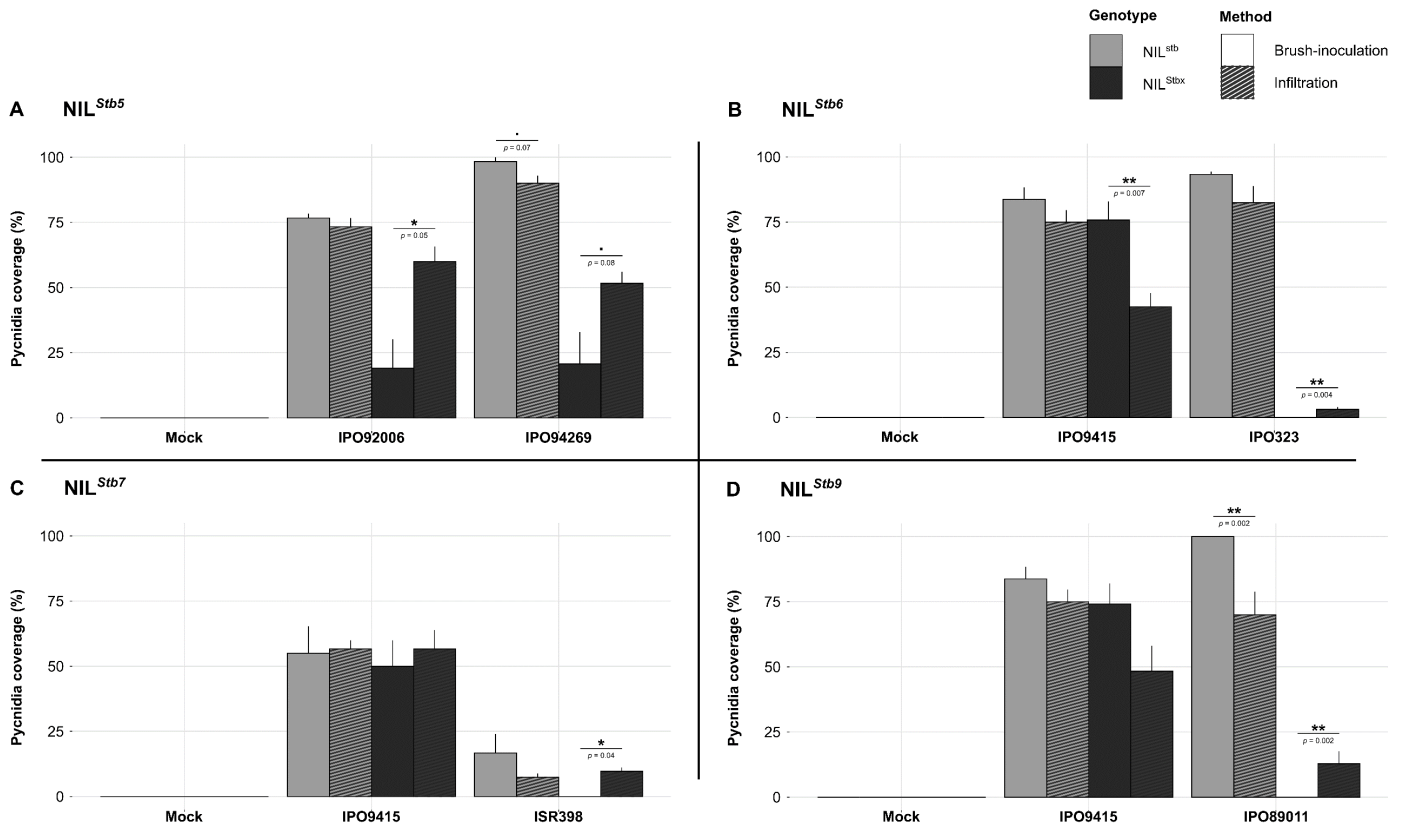


FIGURE 8. SURFACE FOLIAIRE COUVERTE DE PYCNIDES 21 JOURS APRES INOCULATION DE DIFFERENTS ISOLATS DE *Z. TRITICI* SUR LES NILS *STB5*, NILS *STB6*, NILS *STB7* ET NILS *STB9*.

La NIL^{stb} (gris) et les NILs portant le gène *Stb* (noir) (A) *Stb5*, (B) *Stb6*, (C) *Stb7* et (D) *Stb9* ont été inoculées au pinceau (bars vides) ou par infiltration dans l'apoplasme (bars rayées) avec une solution contrôle (eau/Tween20 0.05% (v/v) ; = Mock) ou avec des spores d'isolats de *Z. tritici* virulents ((A) IPO92006, (B), (C) et (D) IPO9415) ou avirulents ((A) IPO94269, (B) IPO323, (C) ISR398, (D) IPO89011). Les valeurs représentent la moyenne ± ESM [(A), (C) $n = 3$; (B), (D) $n = 6$]. Les symboles indiquent des valeurs significativement différentes entre l'inoculation au pinceau et l'infiltration pour un même isolat (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

Stb-spécifique ou non, l'approche par infiltration de spores a été utilisée sur les NIL *Stb5* et NIL *Stb7* avec respectivement les isolats IPO92006 (virulent sur *Stb5*) / IPO94269 (avirulent sur *Stb5*) et IPO9415 (virulent sur *Stb7*) / ISR398 (avirulent sur *Stb7*) et comparée avec une inoculation au pinceau. Les résultats d'inoculation au pinceau et par infiltration, obtenus dans l'article du Chapitre 1, sur les NIL *Stb6* et NIL *Stb9* avec les isolats IPO9415 (virulent sur *Stb6* et *Stb9*), IPO323 (avirulent sur *Stb6*) et IPO89011 (avirulent sur *Stb9*) ont également été repris pour cette analyse.

Pour l'ensemble des isolats de *Z. tritici* testés, les feuilles de la NIL^{stb} ont été couvertes de pycnides à hauteur d'au moins 50 % 21 jours après inoculation au pinceau (excepté pour l'isolat ISR398 qui a développé seulement 17 % de pycnides), confirmant le caractère compatible attendu de ces interactions (**FIGURE 8**). Les feuilles des NIL^{Stb6}, NIL^{Stb7} et NIL^{Stb9} ont présenté 50 à 75 % de pycnides lorsqu'inoculées au pinceau avec l'isolat IPO9415 (**FIGURE 8.B, 8.C, 8.D**), confirmant la virulence de cet isolat vis-à-vis de ces gènes. Pour ces trois NIL, aucun pycnide n'a été observé après inoculation au pinceau des isolats avirulents IPO323, ISR398 et IPO89011 respectivement (**FIGURE 8.B, 8.C, 8.D**). En revanche, l'infiltration de ces trois isolats dans l'apoplasme des NIL^{Stb6}, NIL^{Stb7} et NIL^{Stb9} a entraîné entre 3 et 13 % de pycnides (**FIGURE 8.B, 8.C, 8.D**). Les résistances médiées par *Stb6*, *Stb7* et *Stb9* ont donc été partiellement contournées lorsque les premières étapes de la pathogénèse de *Z. tritici* l'ont été également, suggérant que, similairement à *Stb16q*, le blocage à la pénétration par les stomates constitue un stade d'arrêt majeur pour les interactions incompatibles impliquant ces gènes de résistance.

Pour la NIL^{Stb5}, l'avirulence de l'isolat IPO94269 n'a pas pu être confirmée dans nos conditions, ni une agressivité forte de l'isolat IPO92006, puisque chacun a développé environ 20 % de pycnides sur les feuilles de la NIL^{Stb6} lorsqu'inoculé au pinceau (**FIGURE 8.A**). Ces résultats suggèrent une résistance quantitative médiée par *Stb5* contre ces deux isolats. Malgré tout, les isolats IPO92006 et IPO94269 ont développé 30 à 40 % de pycnides de plus lorsqu'infiltrés dans l'apoplasme de la NIL^{Stb5} que lorsqu'inoculés au pinceau (**FIGURE 8.A**). Ces résultats suggèrent que la résistance quantitative de *Stb5* contre ces isolats a été partiellement contournée lorsque les premières étapes de la pathogénèse ont été contournées et donc que le blocage à la pénétration par les stomates pourrait également constituer un stade d'arrêt important pour cette résistance quantitative.

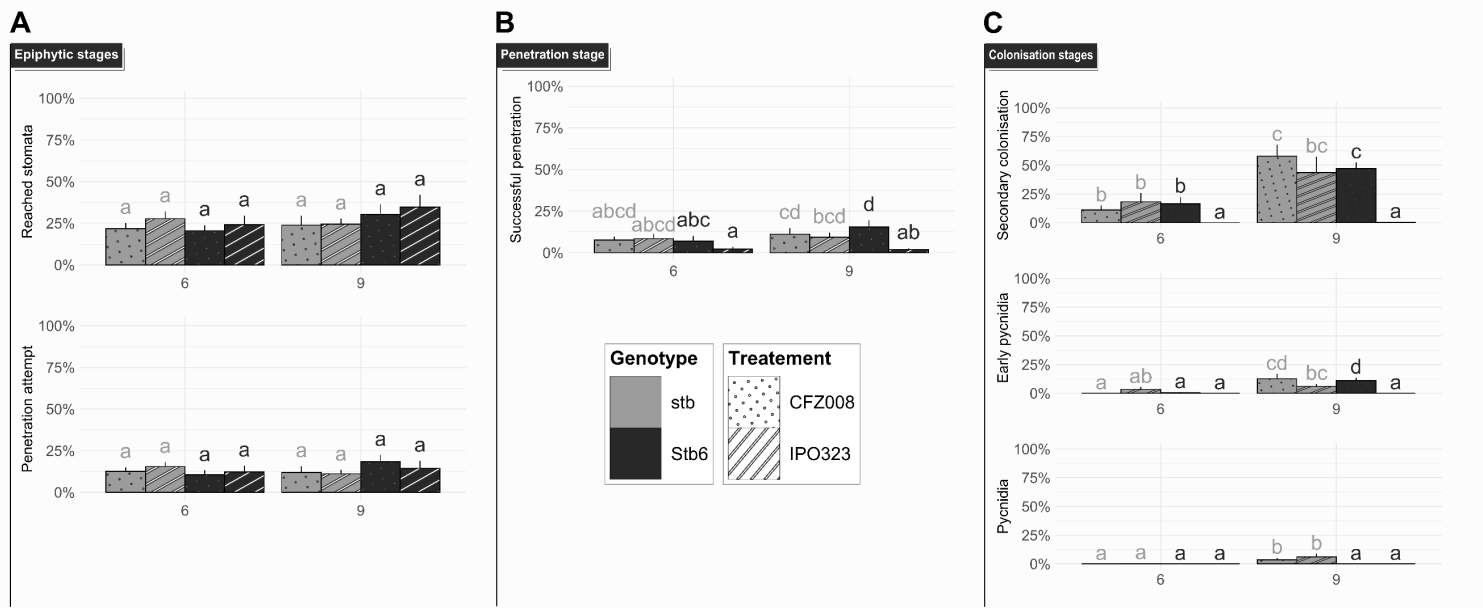


FIGURE 9. ANALYSE CYTOLOGIQUE QUANTITATIVE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA PATHOGENESE DE *Z. TRITICI* SUR LES NILS *STB6*.

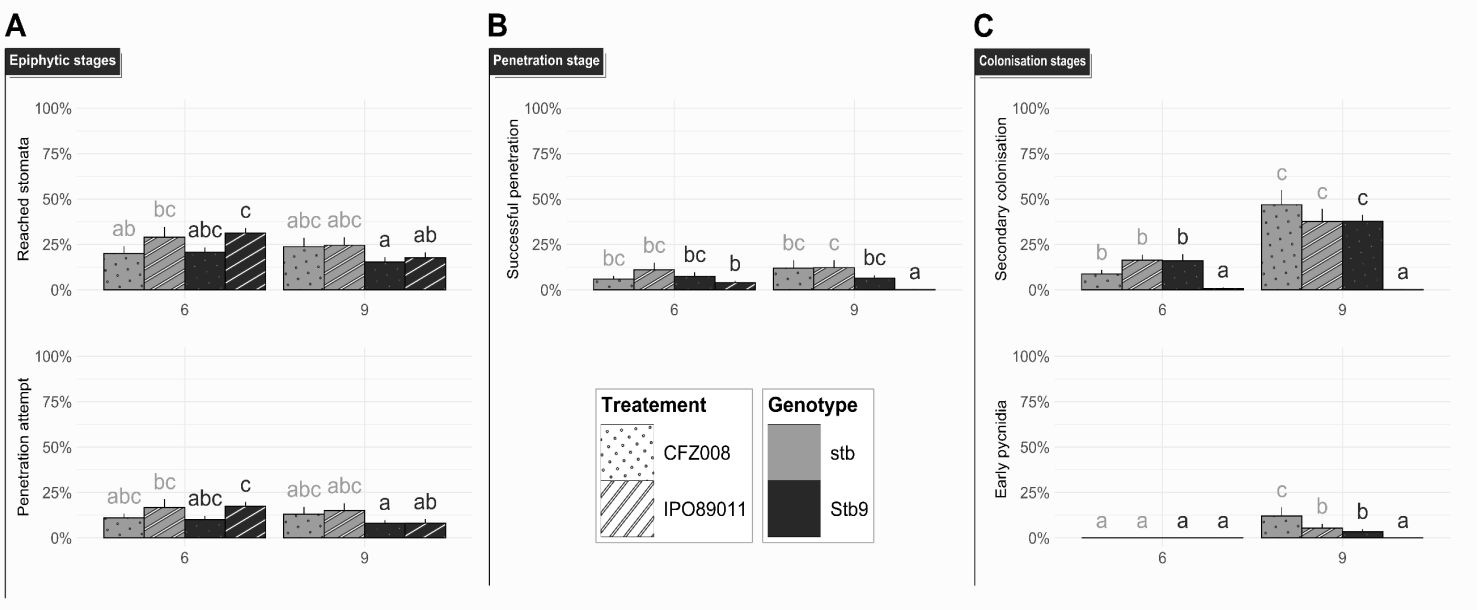


FIGURE 10. ANALYSE CYTOLOGIQUE QUANTITATIVE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA PATHOGENESE DE *Z. TRITICI* SUR LES NILS *STB9*.

La NIL^{stb} (gris) et la NIL^{Stb^x} (noir) ont été inoculées au pinceau avec les isolats de *Z. tritici* virulent-GFP (bars à pois) ou avirulent-GFP (bars rayées). **(A)** Les étapes pré-pénétration, comprenant les stomates atteints (nombre de stomates avec des hyphes en contact sur le nombre total de stomate) et les tentatives de pénétration (nombre de stomates avec des hyphes plongeant dans leur ostiole sur le nombre total de stomate), **(B)** L'étape de pénétration, avec les pénétrations réussies (nombre de stomates avec un hyphe passant à travers l'ostiole et visible dans la cavité sous-stomatique sur le nombre total de stomate) et **(C)** Les étapes de colonisation, avec les colonisations secondaires des cavités sous-stomatique (nombre de stomate avec des hyphes présents dans la cavité sous-stomatique, et absent en surface, sur le nombre total de stomate) et les pycnidies en formation (nombre de stomates avec des hyphes ramifiés dans la cavité sous-stomatique sur le nombre total de stomate). Les valeurs représentent la moyenne ± ESM [$n = 10$]. Des lettres différentes indiquent des valeurs statistiquement différentes (test de Van der Waerden, $p < 0.05$).

ANALYSES CYTOLOGIQUES QUANTITATIVES

Pour évaluer plus précisément le lieu et stade d'arrêt de *Z. tritici* lors des résistances médiées par les gènes *Stb5*, *Stb6* et *Stb9*, des analyses cytologiques quantitatives similaires à celle conduite avec la NIL^{Stb16q} dans le Chapitre 1 ont été réalisées à 6 et 9 jours post-inoculation (jpi) en utilisant les NILs *Stb5*, NILs *Stb6* et NILs *Stb9* inoculées au pinceau avec les couples d'isolats virulents/avirulents IPO92006/CFZ008, CFZ008/IPO323 et CFZ008/IPO89011 respectivement.

LES ETAPES PRE-PENETRATION

Pour l'analyse menée sur les NILs *Stb6*, les pourcentages de stomates atteints et de stomates avec tentatives de pénétration n'ont pas différé significativement à 6 et à 9 jpi entre l'interaction incompatible NIL^{Stb6} / IPO323 (34,6 % et 14,5 % à 9 jpi) et les interactions compatibles NIL^{stb} / CFZ008, NIL^{stb} / IPO323 et NIL^{Stb6} / CFZ008 ($26,2 \pm 3,5$ % et $13,8 \pm 4$ % à 9 jpi) (**FIGURE 9.A**). Similairement, pour l'analyse menée sur les NILs *Stb9*, les pourcentages de stomates atteints et de stomates avec tentative de pénétration n'ont pas différé significativement à 6 et à 9 jpi entre l'interaction incompatible NIL^{Stb9} / IPO89011 (17,6 % et 8,2 % à 9 jpi) et les interactions compatibles NIL^{stb} / CFZ008, NIL^{stb} / IPO89011 et NIL^{Stb9} / CFZ008 ($21,2 \pm 5,1$ % et $12 \pm 3,6$ % à 9 jpi) (**FIGURE 10.A**). Ces résultats suggèrent que les étapes pré-pénétration ne sont pas impactées par les résistances médiées par ces deux gènes *Stb*. Pour l'analyse menée sur les NILs *Stb5*, les pourcentages de stomates atteints et de stomates avec tentatives de pénétration étaient significativement moins importants à 6 et 9 jpi pour les interactions compatibles NIL^{stb} / IPO92006 (7,2 % et 4,3 % à 9 jpi) et NIL^{Stb5} / IPO92006 (7,6 % et 4,8 % à 9 jpi) que pour l'interaction compatible NIL^{stb} / CFZ008 (22,1 % et 13 % à 9 jpi) (**FIGURE 11.A**). En revanche, ces pourcentages étaient similaires à 6 et 9 jpi entre l'interaction compatible NIL^{stb} / CFZ008 et l'interaction incompatible NIL^{Stb5} / CFZ008 (15,1 % et 8,2 % à 9 jpi). Ces résultats suggèrent que les étapes pré-pénétration sont impactées par des spécificités dépendantes de l'isolat testé mais pas par la résistance médiée par le gène *Stb5*.

L'ETAPE DE PENETRATION

Au regard de l'étape de pénétration, $12 \pm 3,2$ % du nombre total de stomates observés ont été soumis à des pénétrations réussies à 9 jpi pour les interactions compatibles NIL^{stb} / CFZ008, NIL^{stb} / IPO323 et NIL^{Stb6} / CFZ008 tandis que seulement 2 % le sont pour l'interaction incompatible NIL^{Stb6} / IPO323 (**FIGURE 9.B**). Pour les interactions compatibles NIL^{stb} / CFZ008, NIL^{stb} / IPO89011 et NIL^{Stb9} / CFZ008, $10,2 \pm 3,2$ % du nombre total de stomates

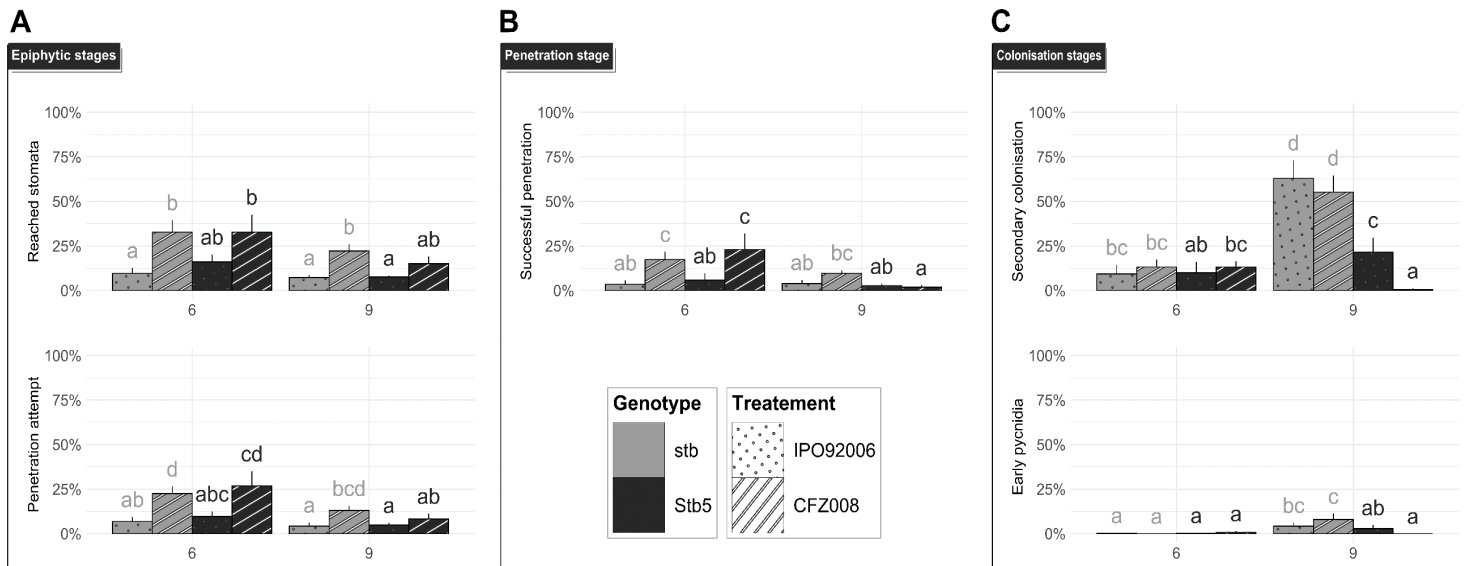


FIGURE 11. ANALYSE CYTOLOGIQUE QUANTITATIVE DES DIFFERENTES ETAPES DE LA PATHOGENESE DE *Z. TRITICI* SUR LES NILS *STB5*.

La NIL^{stb} (gris) et la NIL^{Stb5} (noir) ont été inoculées au pinceau avec les isolats de *Z. tritici* virulent IPO92006-GFP (bars à pois) ou avirulent CFZ008-GFP (bars rayées). **(A)** Les étapes pré-pénétration, comprenant les stomates atteints (nombre de stomates avec des hyphes en contact sur le nombre total de stomate) et les tentatives de pénétration (nombre de stomates avec des hyphes plongeant dans leur ostiole sur le nombre total de stomate), **(B)** L'étape de pénétration, avec les pénétrations réussies (nombre de stomates avec un hyphe passant à travers l'ostiole et visible dans la cavité sous-stomatique sur le nombre total de stomate) et **(C)** Les étapes de colonisation, avec les colonisations secondaires des cavités sous-stomatique (nombre de stomate avec des hyphes présents dans la cavité sous-stomatique, et absent en surface, sur le nombre total de stomate) et les pycnides en formation (nombre de stomates avec des hyphes ramifiés dans la cavité sous-stomatique sur le nombre total de stomate). Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM [$n = 5$]. Des lettres différentes indiquent des valeurs statistiquement différentes (test de Van der Waerden, $p < 0.05$).

observés contenaient des hyphes dans leurs cavités sous-stomatiques, contre seulement 0,2 % pour l'interaction incompatible NIL^{Stb9} / IPO89011 (**FIGURE 10.B**). Pour l'analyse menée sur les NILs *Stb5*, 9,5 % des stomates ont été soumis à des pénétrations réussies à 9 jpi pour l'interaction compatible NIL^{stb} / CFZ008, 3,8 % pour l'interaction compatible NIL^{stb} / IPO92006, 2,7 % pour l'interaction compatible NIL^{Stb5} / IPO92006 et seulement 1,8 % pour l'interaction incompatible NIL^{Stb5} / CFZ008 (**FIGURE 11.B**). Ces résultats montrent que la pénétration par les stomates est impactée par les résistances médiées par les gènes *Stb5*, *Stb6* et *Stb9* et constitue un premier stade d'arrêt important lors des interactions incompatibles impliquant ces gènes.

L'ETAPE DE COLONISATION

Enfin, en termes de colonisation, $49,5 \pm 7,4$ % des cavités sous-stomatiques ont été colonisées par des hyphes infectieux secondaires à 9 jpi pour les interactions compatibles NIL^{stb} / CFZ008, NIL^{stb} / IPO323 et NIL^{Stb6} / CFZ008 (**FIGURE 9.C**) et $40,8 \pm 5,2$ % pour les interactions compatibles NIL^{stb} / CFZ008, NIL^{stb} / IPO89011 et NIL^{Stb9} / CFZ008 (**FIGURE 10.C**). En moyenne, similairement aux interactions compatibles testées sur *Stb16q* (**Chapitre 1**), ce sont donc quatre cavités sous-stomatiques qui ont été colonisées à partir d'un seul évènement de pénétration lors d'interactions compatibles avec les gènes *Stb6* et *Stb9*. Pour les interactions incompatibles NIL^{Stb6} / IPO323 et NIL^{Stb9} / IPO89011, respectivement seuls 0,3 et 0,2 % des cavités sous-stomatiques (représentant une seule cavité sous-stomatique sur 381 et 357 stomates analysés respectivement) ont été colonisées par des hyphes infectieux secondaires à 9 jpi. Pour l'analyse menée sur les NILs *Stb5*, 63 %, 21,1 % et 55,2 % des cavités sous-stomatiques ont été colonisées par des hyphes infectieux secondaires à 9 jpi respectivement pour les interactions compatibles NIL^{stb} / IPO92006, NIL^{Stb5} / IPO92006 et NIL^{stb} / CFZ008 (**FIGURE 11.C**), soit 17, 9 et 6 cavités sous-stomatiques colonisées à partir d'un évènement de pénétration respectivement. Pour l'interaction incompatible NIL^{Stb5} / CFZ008, en revanche, seules 0,6 % des cavités sous-stomatiques ont été colonisées par des hyphes infectieux secondaires. Ces résultats montrent que l'étape de colonisation est également impactée par les résistances médiées par les gènes *Stb5*, *Stb6* et *Stb9* et constitue un second stade d'arrêt important lors des interactions incompatibles impliquant ces gènes.

EFFICACITE DE BLOCAGE A LA PENETRATION

Pour évaluer plus précisément l'importance des gènes *Stb* étudiés dans le blocage de *Z. tritici* lors de sa pénétration, le taux de pénétrations réussies, c'est-à-dire le nombre de stomates avec

A

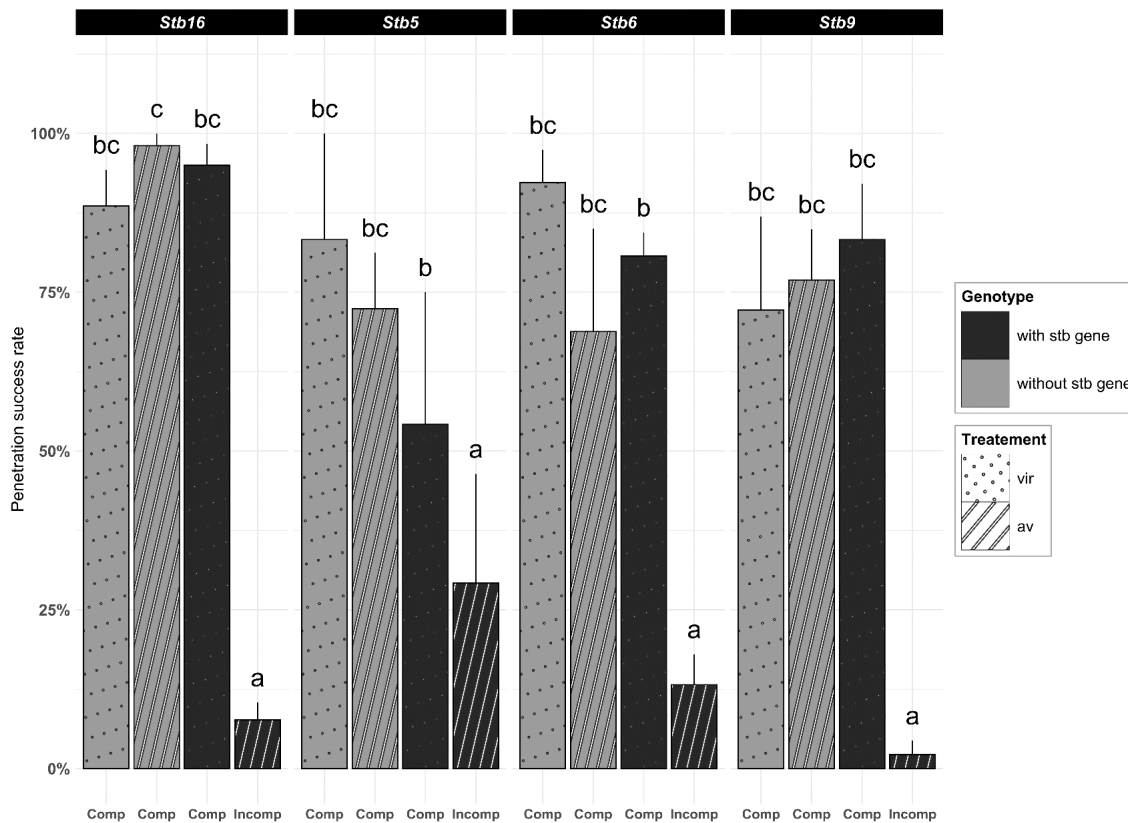
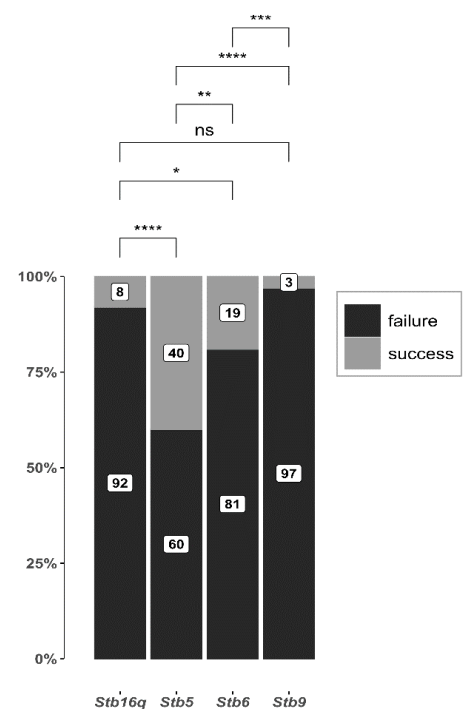


FIGURE 12. TAUX DE PENETRATIONS REUSSIES ET EFFICACITE DE BLOCAGE A LA PENETRATION A 9 JPI DES DIFFERENTS NILS *STB*.

(A) Taux de pénétrations réussies (nombre de stomates avec des pénétrations réussies sur le nombre de stomates avec des tentatives de pénétration) des différents isolats virulents (vir, bars à pois) et avirulents (av, bars rayées) 9 jours post-inoculation au pinceau (jpi) lors des interactions compatibles (comp) et incompatibles (incomp) sur la NIL^{stb} et les NIL^{Stb16q}, NIL^{Stb5}, NIL^{Stb6} et NIL^{Stb9}. Les valeurs représentent les moyennes ± ESM [$n = 10$ pour *Stb16q*, *Stb6* et *Stb9* et $n = 5$ pour *Stb5*]. Des lettres différentes indiquent des valeurs statistiquement différentes (test de Van der Waerden, $p < 0.05$). (B) Efficacité de blocage à la pénétration des isolats avirulents (en noir = pourcentage d'échecs à la pénétration des isolats avirulents spécifiquement dus aux gènes *Stb* sur le pourcentage de pénétrations réussies de ces isolats sur la NIL^{stb}). Les symboles indiquent les résultats du test statistique de Fischer (ns = non significatif, * = $0.01 < p < 0.05$, ** = $0.001 < p < 0.01$, *** = $0.0001 < p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$).

B



des pénétrations réussies rapporté au nombre de stomates avec des tentatives de pénétration (et non au nombre total de stomates), a d'abord été calculé à 9 jpi pour chacune des interactions étudiées (**FIGURE 12.A**).

Dans un premier temps, le taux de pénétrations réussies des différents isolats avirulents utilisés pour les analyses cytologiques a été calculé pour la lignée ne portant pas de gènes *Stb*. Le taux de pénétrations réussies des isolats IPO9415, CFZ008, IPO323 et IPO89011 sur la NIL^{stb} était ainsi de respectivement 98 %, 72 %, 69 % et 77 %. Ces données indiquent que lors des interactions compatibles avec la NIL^{stb}, toutes les tentatives de pénétration n'aboutissent pas à une pénétration réussie, suggérant que les différents isolats ont différentes capacités à compléter l'étape de pénétration ou qu'un QTL mineur de résistance pourrait être présent dans cette lignée. Ensuite, le taux de pénétrations réussies de ces mêmes isolats avirulents a été calculé pour les lignées de blé résistantes correspondantes. Le taux de pénétrations réussies des isolats IPO9415, CFZ008, IPO323 et IPO89011 sur les NIL^{Stb16q}, NIL^{Stb5}, NIL^{Stb6} et NIL^{Stb9} était ainsi respectivement de seulement 8 %, 29 %, 13 % et 2 %. En excluant les échecs isolats-spécifiques observés sur la NIL^{stb} (soit 2 %, 28 %, 31 % et 23 %), ces résultats indiquent que 90 %, 43 %, 56 % et 75 % des tentatives de pénétration ont échoué spécifiquement du fait des mécanismes de résistance médiés par les gènes *Stb16q*, *Stb5*, *Stb6* et *Stb9* respectivement.

Enfin, à partir de ces chiffres, il a été possible d'estimer l'efficacité de blocage à la pénétration en rapportant le pourcentage d'échecs à la pénétration spécifiquement dus aux mécanismes de résistance médiés par les gènes *Stb* au pourcentage de pénétrations réussies sur la NIL^{stb} pour chaque isolat avirulent considéré. L'efficacité de blocage à la pénétration a alors été de 92 %, 60 %, 81 % et 97 % respectivement pour les NIL^{Stb16q}, NIL^{Stb5}, NIL^{Stb6} et NIL^{Stb9} (**FIGURE 12.B**). Avec plus de 60 % d'hyphes bloqués à la pénétration spécifiquement par les gènes *Stb*, ces résultats montrent que la pénétration et les stomates constituent un lieu et un stade d'arrêt majeurs, mais d'importance contrastée, pour les résistances médiées par les gènes *Stb* testés.

CONCLUSION

L'objectif de ce deuxième chapitre visait à déterminer si le blocage de *Z. tritici* à la pénétration, identifié au Chapitre 1, était conservé pour d'autres interactions incompatibles faisant intervenir d'autres isolats et/ou d'autres gènes *Stb*. D'une part, les résultats des expériences d'infiltration de cinq isolats avirulents dans l'apoplasme de la NIL^{Stb16q} suggèrent que, similairement aux résultats obtenus pour l'isolat IPO9415 au Chapitre 1, la résistance à la pénétration est le mécanisme majeur de la résistance médiée par *Stb16q*, indépendamment de l'isolat testé. Un nouvel essai d'infiltration (pour obtenir plus de réplicats) et une analyse cytologique quantitative seraient cependant nécessaires pour confirmer ce résultat. D'autre part, les résultats des essais d'infiltration et de cytologie quantitative ont démontré que l'étape de pénétration par les stomates représentait un lieu et un stade d'arrêt majeur (stade d'arrêt D) de *Z. tritici* lors des interactions incompatibles impliquant les gènes *Stb5*, *Stb6*, (*Stb7*) et *Stb9*. De plus, de façon similaire à ce qui avait été observé dans l'interaction incompatible IPO9415 / NIL^{Stb16q}, les hyphes d'isolats avirulents parvenant à pénétrer par les stomates des NILs portant ces trois gènes *Stb* ont été bloqués dans ou à proximité directe de la cavité sous-stomatique du stomate infecté (stade d'arrêt C). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les mécanismes de résistance médiés par ces différents gènes *Stb* ont comme point commun un blocage précoce du champignon lors de l'étape de pénétration par les stomates, avec en complément, une composante mineure de la résistance limitant la colonisation apoplasmique.

Malgré le caractère virulent de l'isolat IPO92006 vis-à-vis de la NIL^{Stb5}, les résultats d'inoculation au pinceau ont montré une résistance partielle de cette lignée contre cet isolat, avec seulement 20 % de surface foliaire couverte par des pycnides (FIGURE 8.A). Bien que l'analyse cytologique quantitative n'ait pas révélé de différence significative dans le taux de pénétrations réussies de l'isolat IPO92006 sur les NIL^{stb} et NIL^{Stb5} (FIGURE 12.A), une résistance à la pénétration pourrait tout de même exister, avec seulement 54,2 ± 20,8 % de pénétrations réussies sur la NIL^{Stb5} contre 83,3 ± 16,7 % sur la NIL^{stb}. Cette hypothèse est appuyée par le contournement partiel de cette résistance quantitative lorsque l'isolat IPO92006 est infiltré dans l'apoplasme de la NIL^{Stb5} (FIGURE 8.A). L'analyse cytologique quantitative de cette interaction a également mis en évidence une résistance à la colonisation importante, avec deux fois moins de cavités sous-stomatiques colonisées secondairement par l'isolat IPO92006 sur la NIL^{Stb5} comparée à la NIL^{stb} (FIGURE 11.C). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que dans le cadre de résistances quantitatives médiées par les gènes *Stb*, comme pour les résistances totales, deux stades d'arrêt de *Z. tritici* coexistent – à savoir la pénétration par les

stomates et la colonisation dans l'apoplasme – mais que la résistance à la colonisation et surtout la résistance à la pénétration seraient moins efficaces pour arrêter l'agent pathogène que lors des résistances totales. Il faudrait toutefois réaliser une seconde expérimentation avec les NILs *Stb5* (cinq réplicats provenant d'un seul essai ici), et analyser davantage de résistances quantitatives, pour appuyer cette hypothèse.

Enfin, il est à noter que l'efficacité de blocage au niveau des stomates différait significativement entre les différentes résistances totales étudiées (**FIGURE 12.B**). Avec des efficacités de blocage au niveau des stomates de 97 % et 92 %, les mécanismes médiés par les gènes *Stb9* et *Stb16q*, respectivement, semblent ainsi les plus performants à la pénétration, comparés aux mécanismes médiés par les gènes *Stb6* et *Stb5* qui sont responsables respectivement de 81 % et 60 % de blocage à cette étape. Cette observation suggère que les différents gènes *Stb* pourraient contrôler soit des mécanismes de résistances à la pénétration différents par nature, soit les mêmes mécanismes de résistances à la pénétration mais dont les efficacités dépendent de l'isolat et/ou du gène *Stb* mis en jeu.

CHAPITRE 3 : « COMMENT » LA RESISTANCE MEDIÉE PAR STB16 SE MET-ELLE EN PLACE ?

INTRODUCTION

Si les résultats présentés et discutés dans les deux chapitres précédents ont permis d'identifier précisément les lieux et stades d'arrêt de *Z. tritici* lors d'interactions incompatibles, la nature du ou des mécanisme(s) responsable(s) de ces blocages restaient à caractériser. Le clonage des deux gènes *Stb6* et *Stb16q* ouvre la voie à l'exploration des mécanismes moléculaires et physiologiques associés à la résistance du blé à la septoriose. Ces deux gènes codent pour des CSIRs, de type RLK. Les RLK, une des plus grandes familles de protéines chez les plantes et subdivisées en sous-familles selon la nature de leurs domaines extracellulaires, intègrent une multitude de signaux environnementaux grâce à leurs domaines extracellulaires et transduisent le signal perçu *via* l'activité de leur domaine kinase. Les RLKs régulent une grande diversité de processus biologiques majeurs comme la croissance, le développement et les réponses aux stressés biotiques et abiotiques (Shiu and Bleeker, 2001; Jose et al., 2020). STB6 appartient à la sous-famille des WAKs. En plus de leurs implications dans la croissance et le développement et dans la tolérance aux stressés abiotiques, les WAKs ont émergé récemment en tant qu'éléments clés de l'immunité des plantes, avec un rôle entre autres dans la perception d'effecteurs et d'autres IMs ainsi que dans la maintenance de l'intégrité des parois des cellules et de leur restructuration (Stephens et al., 2022). STB6 reconnaît les isolats de *Z. tritici* portant le gène d'avirulence *AvrStb6*, comme l'isolat de référence IPO323, mais aucune interaction directe entre les protéines STB6 et *AvrStb6* n'a pu être démontrée (Saintenac et al., 2018). Le ou les ligand(s) de cette WAK est (sont) donc toujours inconnu(s), ainsi que les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans la résistance médiée par STB6. *Stb16q* est le premier gène majeur de résistance identifié chez les plantes à coder pour une protéine appartenant à la sous-famille des CRKs. Si de plus en plus de CRKs ont été associées ces dernières années à l'immunité des plantes, les données relatives à leurs fonctions exactes dans l'immunité sont éparpillées. Afin de rassembler ces données et d'orienter sur des hypothèses quant au(x) rôle(s) de STB16 dans la résistance contre *Z. tritici*, un article de revue sur le rôle des CRKs dans l'immunité des plantes a été rédigé.

ARTICLE DE REVUE – CYSTEINE-RICH RECEPTOR-LIKE KINASES (CRK), THE NEW TRENDY AND YET ENIGMATIC PROTEIN FAMILY IN PLANT IMMUNITY

Cysteine-rich receptor-like kinases (CRK), the new trendy and yet enigmatic protein family in plant immunity

1 Méli^ssa Battache¹, Thierry Langin¹, Cyrille Saintenac^{1*}

2 ¹UCA, INRAE, GDEC, 63000, Clermont-Ferrand, France

3 * **Correspondence:**

4 Cyrille Saintenac

5 cyrille.saintenac@inrae.fr

6 **Keywords: cysteine-rich receptor-like kinases, immune receptor, DUF26, disease resistance,**
7 **ROS signaling pathway, stomatal immunity, HR-type cell death**

8 **Abstract**

9 Plants are exposed to a wide range of environmental stresses and they must deliver adapted responses
10 for their survival. Cell-surface localized receptor-like protein kinases (RLK) represent the main gene
11 family involved in signal perception and transduction. Among their genetic diversity, the cysteine-rich
12 receptor like kinases (CRK) have been shown to play an increasingly significant role in pathogens
13 perception and disease resistance mechanisms these past few years. Present in all vascular plant
14 species, they are positively or negatively involved in resistance against pathogens with different
15 lifestyles from necrotrophic to biotrophic. Once activated through their extracellular domain, CRK
16 proteins participate in a stress-dependant manner to plant immunity. They act as major R gene or
17 initiate pathogen-associated molecular pattern triggered immunity and systemic-acquired resistance
18 pathways, generally in complexes with other RLK. Anchored at the plasma membrane, the signature
19 of their extracellular domain relies on canonical cysteine-rich motifs. While the role of these conserved
20 motifs and more generally of the extracellular domain are still unknown, many original functions have
21 been hypothesised, which makes it such an enigmatic extracellular domain. Collectively, these recent
22 data emphasise the importance of these multifaceted and still unheeded protein family in diverse plant-
23 defence related molecular and physiological responses.

24 **1 Introduction**

25 Cysteine-rich receptor-like kinases (CRK, originally referred as DUF26 RLK) represent a large
26 subfamily of receptor-like kinases (RLK) specific to vascular plants. CRK have a canonical RLK
27 architecture that consists of a signal peptide, an extracellular domain, a single-pass transmembrane
28 domain and a conserved cytoplasmic Ser/Thr protein kinase domain. The CRKs ectodomain, which
29 distinguishes them from other RLK subfamilies, contains one to four copies (Vaattovaara et al., 2019)
30 – usually two – of the 90~110 amino acids length domain of unknown function 26 (DUF26, also
31 referred as PF01657, stress-antifungal domain or Gnk2-like). This domain includes a conserved
32 cysteine-rich motif C-X₈-C-X₂-C, which most likely plays a significant role for ectodomains biological
33 activities. The CRK kinase domain shares similarity with kinase domains from S-locus lectin and LRR
34 RLK from LRR_clade_3 (Vaattovaara et al., 2019). This identity of sequences led to propose that
35 CRKs originate from a fusion between single DUF26 cysteine-rich receptor-like secreted proteins
36 (CRRSP) and transmembrane and kinase domains from LRR_clade_3 RLKs. Interestingly, unlike most
37 RLK involved in plant immunity, most CRK kinases are Arg-Asp (RD) kinases (Vaattovaara et al.,

Organism	Pathogen	Disease	Studied CRK	Analysis type	Link with resistance	Positive or negative regulators	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Hemibiotrophic bacterium	Family (44) ACR6*, ACR62*, ACR64*, ACR65*, ACR66*, ACR67*, ACR68*, ACR69*, ACR70*, ACR71*, ACR72*, ACR73*, ACR74*, ACR75*, ACR76*, ACR77*, ACR78*, ACR79*, ACR80*, ACR81*, ACR82*, ACR83*, ACR84*, ACR85*, ACR86*, ACR87*, ACR88*, ACR89*, ACR90*, ACR91*, ACR92*, ACR93*, ACR94*, ACR95*, ACR96*, ACR97*, ACR98*, ACR99*, ACR100*	Transcriptomic, Functional	Some differentially expressed during infection or after PAMP treatment Overexpression of disease resistance Immunity impaired in some mutants	At least some are positive regulators ACR20 negative regulator	(Chen et al., 2004) (Yabeu et al., 2017) (Zhang et al., 2014) (Zhang et al., 2015) (Zhang et al., 2015) (Zhang et al., 2017) (Ederli et al., 2011) (Kumara et al., 2020) (Chen et al., 2003)
	<i>Geloinomyces armitii</i>	Powdery mildew	Several	Transcriptomic	CRKs upregulated after <i>Chlorella flacca</i> treatment (bioccontrol agent training/defences)		(Lee et al., 2020)
	<i>Barytis sinerea</i>	Grey mould	Family (44) Isolated CRKs ACR245	Transcriptomic, Functional	Some differentially expressed during infection Susceptibility enhanced in some mutants Induced after pathogen treatment	At least some are positive regulators	(Bardais et al., 2015)
	<i>Alternaria brassicicola</i>	Black spot disease in <i>Brassica</i> species	ACR36*	Transcriptomic	Overexpression enhances susceptibility Resistance enhanced in knock-out mutant	Negative regulator	(Lee et al., 2017)
	<i>Erwinia carotovora</i>	Soft rot	Several ACR4*, ACR5 ACR20 or ACR39	Transcriptomic, Functional	22 CRKs upregulated in <i>hsl1-4/sork4-1</i> mutant Overexpression of ACR65* associated with cell death Genetic loci associated with disease-related phenotypes differentially induced by virus strains		(de Oliveira et al., 2016)
	<i>Turnip mosaic potyvirus</i>	Vascular wilt disease	ACR5, ACR22	Genetic	Upregulated upon virus treatment Defense responses to virus treatment impaired in mutants	Positive regulators	(Bukhová et al., 2021)
	<i>Ferticarium dahliae</i>	Fly	Several	Transcriptomic, Functional	17 CRKs differentially expressed during infection Some upregulated during infection		(Suhanyam et al., 2019)
	<i>Mayetiella destructor</i>	Hemibiotrophic fungus	Several	Transcriptomic	Cluster of 8 CRKs in TC A01 QTL which confers quantitative resistance		(Hakdadi et al., 2016)
	<i>Leposphaeria maculans</i>	Phoma stem canker	Ca-CR6*	Transcriptomic, Functional	Upregulated during infection Silencing enhances susceptibility Overexpression enhances resistance	Positive regulator	(Mou et al., 2021)
	<i>Rabsonia solanacearum</i>	Lethal wilt	CRK10	Transcriptomic	Upregulated during incompatible interaction (no change in expression during compatible)		(Chamank et al., 2021)
<i>Cicer aridum</i>	Nematode	Several	Transcriptomic	16 CRKs upregulated during infection of which 7 only during incompatible interaction 1 CRK downregulated during infection		(Toljano et al., 2016)	
<i>Fragaria vesca</i>	Hemibiotrophic oomycete	Family (91)	Transcriptomic	7 CRKs upregulated during infection		(Delgado-Cerrone et al., 2018)	
<i>Glycine max</i>	Biotrophic fungus	Family (30) GCRK18*	Transcriptomic, Functional	Several differentially expressed during infection Several differentially expressed during infection Silencing of GCRK18 impaired resistance	Positive regulator	(Li et al., 2018)	
<i>Gossypium hirsutum</i>	Hemibiotrophic oomycete	Family (118)	Transcriptomic	9 CRKs upregulated during incompatible interaction of which 3 downregulated during compatible interaction Upregulation during compatible interaction Silencing enhances basal resistance	Negative regulator	(Hussain et al., 2022)	
<i>Hordeum vulgare</i>	Hemibiotrophic oomycete	Hs-CR1*	Transcriptomic, Functional	Complement the <i>ym17</i> mutant (suppressor of NHI-mediated immunity) Silencing compromises NHI-mediated immunity Overexpression of O-CR10 enhances resistance	Positive regulator	(Beyapuram et al., 2012)	
<i>Oryza sativa</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. Hordei</i>	Powdery mildew	O-CR6*, O-CR10*	Functional			(Chen et al., 2016)
	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	Bacterial blight	LIL1 (mutant CRK)	Functional	<i>LIL1</i> (a lesion mimic mutant with a point mutation in kinase domain of a predicted CRK) associated with spontaneous PCD and enhanced resistance		(Zhou et al., 2017)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i> (<i>Magnaporthe oryzae</i>)	Rice blast	ALS1 (mutant CRK)	Functional	<i>ALS1</i> (a lesion mimic mutant with a point mutation in kinase domain of a CRK) associated with constitutive activation of innate immunity and enhanced resistance		(Du et al., 2019)
	<i>Fusarium solani f.sp. Phaseoli</i>	Fusarium root rot	Several	Transcriptomic	3 upregulated specifically during incompatible interaction (compared to compatible) Some induced after treatment with MSP1 (secreted protein from <i>M. oryzae</i>) and flg22		(Wang et al., 2014)
<i>Prunus persica</i>	<i>Xanthomonas arboricola pv. pruni</i>	Fusarium root rot	PRK2b-1	Transcriptomic	Upregulated during infection, more upregulated during incompatible interaction		(Meng et al., 2019)
<i>Sesuvium spp.</i>	<i>Acidovorax avenae subsp. avenae</i>	Bacterial spot	Several	Transcriptomic	4 CRKs differentially expressed during infection, of which 2 upregulated only during incompatible interaction		(Lange et al., 1999)
	<i>Erwinia carotovora</i>	Red stripe Soft rot	PRK-1 and PRK-4 TaCRK3* (TaCRK-7A)	Transcriptomic	2 CRKs upregulated during infection Induced by filtrate of pathogen culture Expression level related to resistance degree Silencing impairs resistance Inhibits of the fungus growth <i>in vitro</i>	Positive regulator	(Santo Dígida et al., 2016) (Montesano et al., 2001)
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Puccinia tritica</i>	Leaf rust	TaCRK2*	Transcriptomic, Functional	Upregulated during incompatible interaction, no change in expression during compatible interaction Heterologous expression leads to cell death Silencing enhances susceptibility	Positive regulator	(Gu et al., 2020)
	<i>Blumeria graminis f.sp. Tritici</i>	Powdery mildew	Family (170)	Transcriptomic	Many differentially expressed (mainly upregulated) during infection Many differentially expressed during infection		(Shumayla et al., 2019)
<i>Vitis amurensis</i>	<i>Puccinia uvaiformis f. sp. Tritici</i>	Stripe rust	TaCRK10*	Transcriptomic, Functional	Upregulated following inoculation and high temperature Overexpression enhances resistance Silencing impairs resistance Heterologous expression leads to cell death	Positive regulator	(Wang et al., 2021)
	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Slump eyespot	TaCRK1	Transcriptomic, Functional	Upregulated during incompatible interaction while downregulated during compatible Silencing NOT impairing resistance		(Yang et al., 2013)
<i>Vitis amurensis</i>	<i>Zymoseptoria tritici</i>	Septoria tritici blotch	TaCRK3* (TaCRK-7A)	Transcriptomic, Functional	Upregulated during infection, higher during incompatible interaction (compared to compatible) Silencing impairs resistance Inhibits of the fungus growth <i>in vitro</i>	Positive regulator	(Guo et al., 2021)
	<i>Barytis sinerea</i>	Grey mould	TaCRK6* (STB16) VaCRK2*	Genetic, Transcriptomic, Functional	Upregulated during infection, higher and sooner during incompatible interaction Integression in susceptible genotype confers resistance Upregulated during incompatible interaction, no change during compatible interaction Heterologous expression enhances resistance	Positive regulator Positive regulator	(Santense et al., 2021) (Li et al., 2021)

* represents CRKs whose role in immunity has been functionally validated

38 2019). While sharing a conserved Arg in the subdomain VIb catalytic loop, these kinases require
39 phosphorylation of the activation loop for activation and subsequent downstream signalling.

40 Expert-guided functional annotation of this multigene family in seventeen plant genomes has revealed
41 an average of 61 CRK per plant genome ranging from four members in *Vitis amurensis* to 170 in
42 *Triticum aestivum*, suggesting species-specific genome amplification. These genes are mainly
43 organized in tandem array that likely reveal recent duplications (Bourdais et al., 2015; Delgado-
44 Cerrone et al., 2018; Hussain et al., 2022; Li et al., 2018; Quezada et al., 2019; Shumayla et al., 2019).
45 This is illustrated in *Arabidopsis thaliana* (Bourdais et al., 2015; Chen, 2001) with a large cluster of
46 20 members out of 44 on chromosome 4 or in cotton (Li et al., 2018) with 30% of CRKs distributed
47 on chromosomes A06 and D06. Phylogenetic analyses and transcriptomic studies have also revealed
48 sequence-based related CRKs and tissue/organs and stress expression specificity (Wrzaczek et al.,
49 2010; Bourdais et al., 2015; Delgado-Cerrone et al., 2018; Quezada et al., 2019; Shumayla et al.,
50 2019), which allow to cluster these proteins according to similar biological functions (Li et al., 2018).

51 While few CRK have been described to respond to abiotic stresses such as drought tolerance (Bourdais
52 et al., 2015; Lu et al., 2016), transcriptomic and functional analysis during the past ten years in many
53 species have pointed out that resistance against a wide range of biotic stresses is associated with CRKs
54 (Table 1), highlighting the particular importance of this family during defence processes. Here, we
55 review CRKs functions in plant immunity. We first provide an exhaustive view of CRK involved in
56 plant immunity. Then, we discuss hypothetical roles of the enigmatic extracellular CRK domains based
57 on literature from related DUF26 domain containing proteins. Finally, we summarize current
58 knowledge on defence pathways and molecular functions related to CRKs.

59 2 Resistance to multiple pest and pathogen species

60 Historically, the role of CRK in plant immunity was first described in the model plant species
61 *Arabidopsis thaliana*. Phenotypic evaluation of T-DNA insertion mutants for 38 *Arabidopsis thaliana*
62 CRK revealed that knock out of three (*CRK5/20/29*) and fourteen CRK induced susceptibility to
63 *Pseudomonas syringae* and to the biotrophic fungal pathogen *Golovinomyces orontii*, respectively
64 (Bourdais et al., 2015). By contrast, *CRK2* and *CRK5* mutant lines were more resistant to *G. orontii*.
65 Overexpression of seven of the *AtCRK* genes (*CRK4/5/6/13/28/36/45*) conferred resistance to *P.*
66 *syringae* (Table 1). However, *CRK36* overexpression in *A. thaliana* also increased its susceptibility to
67 the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* (Lee et al., 2017). Collectively, phenomic analyses in
68 *A. thaliana* have highlighted the role of CRK in immunity against bacteria and fungi with different
69 lifestyles, antagonist effect and functional redundancy. Since *A. thaliana* studies, a number of CRK
70 have been functionally characterized in cotton, pepper, grape, rice, barley and wheat (Table 1). While
71 the majority of them are positive regulators of plant immunity, silencing *HvCRK1* enhanced barley
72 resistance to the biotrophic fungus *Blumeria graminis* (Rayapuram et al., 2012). Like in *A. thaliana*,
73 CRK participate in resistance against pathogens with different lifestyles such as wheat genes *TaCRK2*,
74 *TaCRK10*, *TaCRK3* and *Stb16q* that are positively involved in resistance to the biotrophic fungi
75 *Puccinia tritricina* and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the necrotrophic fungus *Rhizoctonia cerealis*
76 and the hemibiotrophic fungus *Zymoseptoria tritici*, respectively (Gu et al., 2020; Guo et al., 2021;
77 Sautenac et al., 2021; Wang et al., 2021; Wu et al., 2021). Overall, 24 CRK have now been reported
78 to be involved in plant resistance or susceptibility upon pathogen attacks (Table 1). While the role of
79 CRK in plant immunity against bacteria and fungi is now largely recognized, transcriptomic data
80 suggest that these proteins may also participate in plant resistance to viruses and insects (Butković et
81 al., 2021; Channale et al., 2021; Hussain et al., 2022; Subramanyam et al., 2019).

82 **3 CRKs, a cornerstone in plant immunity**

83 CRKs most likely behave like classical RLK meaning that they perceive an external signal that is
 84 transduced through their intracellular kinase domain to activate target proteins, which ultimately induce
 85 a set of molecular and physiological changes. Their intracellular domain is an active serine/threonine
 86 kinase (Tanaka et al., 2012; Idänheimo et al., 2014; Yeh et al., 2015) required for protein functions as
 87 mutations in the kinase catalytic site results in defective interactions or in loss-of-function phenotypes
 88 (Chen et al., 2004; Hunter et al., 2019; Kimura et al., 2020; Lee et al., 2017; Sainenac et al., 2021;
 89 Yadeta et al., 2017). The activation of the kinase induces responses involving all major known plant
 90 immunity processes namely a rapid oxidative burst (Acharya et al., 2007; Bourdais et al., 2015;
 91 Kimura et al., 2020; Lee et al., 2017; Yadeta et al., 2017; Yeh et al., 2015), activation of MAPK
 92 phosphorylation cascades (Kimura et al., 2020), transcriptional reprogramming of pathogenesis-related
 93 (PR) genes (Acharya et al., 2007; Chen et al., 2003; Lee et al., 2017, 36; Li et al., 2018, 2021; Mou et
 94 al., 2021; Wang et al., 2021; Yeh et al., 2015; Zhang et al., 2013a), HR-type cell death (Acharya et
 95 al., 2007; Chen et al., 2003, 2004; de Oliveira et al., 2016; Gu et al., 2020; Lee et al., 2017; Yadeta et
 96 al., 2017), stomatal closure (Bourdais et al., 2015; Kimura et al., 2020; Lee et al., 2017; Yeh et al.,
 97 2015) and callose deposition (Kimura et al., 2020; Lee et al., 2017; Yeh et al., 2015). These latter are
 98 activated either through direct CRKs actions or by modulating different phytohormonal pathways as
 99 constitutive or inducible overexpression of CRKs leads to change in hormones concentration or genes
 100 involved in hormones biosynthesis (Acharya et al., 2007; Chern et al., 2016; Du et al., 2019; Li et al.,
 101 2018; Zhang et al., 2013a)(Figure 1).

102 **3.1 CRKs and the oxidative burst**

103 CRKs are involved in the control of basal ROS production as ROS production was either significantly
 104 lower or higher in thirteen and two *AtCrk* mutants, respectively (Bourdais et al., 2015; Idänheimo et
 105 al., 2014). The level of ROS was also affected when some *crk* mutants were challenged by biotic
 106 stresses. Eleven of the *crk* T-DNA insertion lines (*AtCRK6/16/19-2/20/22/23-1/23-2/24/25/29/32*) in
 107 *Arabidopsis* displayed increased ROS production upon flg22 elicitation (Bourdais et al., 2015) while
 108 five mutants (*AtCRK2/3/13/31/36*) showed decreased ROS production (Bourdais et al., 2015; Kimura
 109 et al., 2020; Lee et al., 2017). Overexpression of *AtCRK4/6/13/28/36* also led to increased ROS
 110 production (Acharya et al., 2007; Lee et al., 2017; Yadeta et al., 2017; Yeh et al., 2015) during PAMP
 111 elicitation. It is important to notice that some CRKs impair ROS production in a stress-dependant
 112 manner. Overexpression of *AtCRK28* increased ROS burst in response to flg22 elicitation but not upon
 113 chitin elicitation suggesting the recruitment of specific CRK to cope with distinct stresses (Yadeta et
 114 al., 2017).

115 PTI and ETI-related extracellular ROS burst is mainly ensured by NADPH oxidases (NOXs), also
 116 known as RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS (RBOH) (Torres, 2010). These plasma
 117 membrane-localized enzymes transfer electrons to form apoplastic super oxide anion O_2^- , which is
 118 then converted to H_2O_2 . In response to flg22, the PRR FLS2-BAK1 complex elicits BIK1
 119 phosphorylation. Activation of BIK1 in turn phosphorylates NADPH oxidase, which triggers the ROS
 120 burst. Overexpression of *AtCRK36* led to enhanced oxidative burst in the apoplast while its
 121 downregulation resulted in lower ROS production following inoculation with the necrotrophic fungus
 122 *Alternaria brassicicola* or the bacteria *P. syringae*. Upon flg22 elicitation, *AtCRK36* physically
 123 interacted with BIK1 and phosphorylated this latter, which suggests that *AtCRK36* dependant ROS
 124 production occur through BIK1/NADPH oxidase activation (Lee et al., 2017). As *AtCRK4/6/28*
 125 interact with FLS2 and are positively involved in ROS production during PAMP recognition (Yadeta
 126 et al., 2017; Yeh et al., 2015), we may suspect that these proteins participate in the ROS burst via the
 127 activation of the PRR FLS2-BAK1 complex and the NOXs as well. Similarly, *Aterk2* mutants

128 displayed reduced ROS production during flg22 elicitation compared to *Arabidopsis* wild type plants
 129 (*Bourdais et al., 2015*). More recently, AtCRK2 was shown to form a complex with RBOHD, one of
 130 the ten *Arabidopsis* RBOH proteins. Upon flg22 elicitation, AtCRK2 activated RBOHD through C-
 131 terminus phosphorylation to trigger PAMP-induced ROS production (*Kimura et al., 2020*). Overall,
 132 with their possible ability to sense extracellular ROS, CRKs are collectively assumed to tightly regulate
 133 ROS signalling pathway, possibly by modulating, directly or indirectly, RBOH activity.

134 3.2 CRKs and cell death

135 Cell death (CD) is a hallmark of plant defense mechanism. Many CRKs have been associated with CD
 136 processes in plants (*Acharya et al., 2007; Chen et al., 2003, 2004; de Oliveira et al., 2016; Gu et al.,*
 137 *2020; Lee et al., 2017; Yadeta et al., 2017*). Overexpression of *AtCRK4, 5, 13, 18, 20* in *A. thaliana*
 138 induced HR-type CD, which could even be lethal in the case of *AtCRK13*. Likewise, overexpression
 139 of *AtCRK4, AtCRK5, AtCRK28, AtCRK29* and *TaCRK2* in tobacco induced CD (*de Oliveira et al.,*
 140 *2016; Gu et al., 2020; Yadeta et al., 2017*). *AtCRK28*-mediated CD requires the presence of the
 141 conserved extracellular cysteine residues and an active kinase domain as mutations in these regions
 142 compromised CD (*Yadeta et al., 2017*). Furthermore, the interaction of *AtCRK28* with *BAK1* is also
 143 required for CD induction. In rice, the *Os07g0488400* gene encoding a CRK was identified as the
 144 causal gene involved in the *ALS1 (apoptosis leaf and sheath 1)/LIL1 (lesion mimic mutant 1)* lesions
 145 mimic mutant (LMM) that displays constitutive HR-cell death and defence-related genes activation
 146 (*Du et al., 2019; Zhou et al., 2017*). This mutant carries a point mutation in the CRK kinase domain
 147 that likely results in the constitutive activation of the CRK kinase domain and of the CD phenotype. In
 148 the same species, *OsCRK6* and *OsCRK10* were shown to be involved in spontaneous cell death in
 149 response to BTH treatment, an analogue of SA (*Chern et al., 2016*). These two CRK were identified
 150 in a screen for components of the systemic acquired resistance (SAR) mediated by *NH1* (the rice
 151 ortholog of *NPR1*) and induced by salicylic acid (SA). *OsCRK6/10* were deleted in the rice mutant
 152 *snim1 (suppressor of NH1-mediated immunity 1)* which was unable to activate cell death in response
 153 to BTH. Complementation of this mutant with functional copies of *OsCRK6/10* restored the BTH-
 154 induced spontaneous CD phenotype, which confirm the involvement of these CRK in SAR-mediated
 155 CD. Besides the dependence of *OsCRK6/10* on the SA pathway, the auto-active mutated version of
 156 *Os07g0488400* showed overexpression of *NH1* and defense-related genes suggesting as well a link
 157 with the SA-mediated SAR response. Furthermore, *A. thaliana* overexpressing *AtCRK13* showed high
 158 level of SA accumulation (*Acharya et al., 2007*). Overexpression of this gene in *A. thaliana sid2* and
 159 *NahG* backgrounds, deficient in SA biosynthesis, showed mild to moderate CD compared to massive
 160 CD in the wild type background emphasizing again the importance of SA in *AtCRK13*-mediated CD.
 161 However, HR-cell death was not completely abolished in the *sid2* mutant background overexpression
 162 *AtCRK13*. Furthermore, *AtCRK5*-mediated HR-cell death is independent of the known *NPR1- SA-*
 163 *EDS- or NDR1- mediated cell death* as it triggered CD in *npr1, ndr1, eds1* and *nahG* mutants
 164 background (*Chen et al., 2003*). Together, these data suggest that CRK-mediated CD required SA-
 165 dependant and independent activation pathways.

166 3.3 CRKs and stomatal immunity

167 Stomata are two- or four-cells key structures that allow plant to exchange gas and water with their
 168 environment. Stomata are also natural openings for pathogen entry into plant tissues. Therefore,
 169 stomatal movement is tightly controlled to efficiently regulated photosynthesis while minimizing water
 170 losses and pathogens entry (*Gudesblat et al., 2009*). Stomatal immunity is mainly defined as pathogen-
 171 induced stomatal closure to limit pathogens penetration. Among all RLK involved in stomatal
 172 immunity (*Wang and Gou, 2021*), many reports have now pointed out CRK as major components.

173 Flg22-triggered stomatal closure was impaired in six *A. thaliana* *crk* mutants (*crk2/5/17/20/28/36*)
 174 (*Bourdais et al., 2015; Kimura et al., 2020; Lee et al., 2017*). Lines overexpressing *AtCRK36* showed
 175 a stronger stomatal closure following flg22 treatment compared to the wild type and *AtCRK4/36* were
 176 even unable to reopen stomata after treatment with *Pst* DC3000 that produces coronatine (COR) which
 177 normally forces stomatal opening (*Lee et al., 2017; Yeh et al., 2015*). Interestingly, stomatal closure
 178 was also inhibited after application of the fungal PAMP chitin in *crk2*, *crk6*, *crk10-2*, *crk10-4*, *crk12*,
 179 and *crk19-2* mutants (*Bourdais et al., 2015*). Furthermore, a transient stomatal closure was observed
 180 specifically in response to an avirulent *Zymoseptoria tritici* isolate on wheat lines carrying the
 181 resistance gene *Stb16q* (*Battache et al., 2022*). These data suggest that stomatal responses to different
 182 elicitors are regulated by different CRK.

183 Stomatal movements result from the perception of various external stimuli and are mainly driven by
 184 ABA, calcium (Ca²⁺) or ROS signalling pathways (*Arnaud and Hwang, 2015*). *A. thaliana* carrying
 185 loss-of-function mutation in the RBOHD (and thus depleted in H₂O₂ production) lost their ability to
 186 trigger stomatal closure in response to flg22 (*Rodrigues and Shan, 2022*). Likewise, mutations in the
 187 PIP2 protein involved in cellular H₂O₂ influx had a stomatal closure defect in response to flg22
 188 (*Rodrigues and Shan, 2022*). In the same way, *AtCRK2* and *AtCRK36* mutants had a reduced flg22-
 189 dependant ROS production and stomatal closure (*Kimura et al., 2020; Lee et al., 2017*). These results
 190 suggest that *AtCRK2* and *AtCRK36* flg22-dependant stomatal closure is mediated through ROS
 191 signalling. However, some CRKs, like *AtCRK5/17*, are required for flg22-induced stomatal closure but
 192 are not involved in ROS production (*Bourdais et al., 2015*), which suggests that some CRKs may
 193 regulate stomatal immunity independently or downstream of ROS signalling.

194 **4 A multifaceted role of CRKs DUF26 ectodomains in plant immunity ?**

195 In addition to CRKs, land plant-specific DUF26 domains are found in two other protein families also
 196 involved in pathogen defence: the PLASMODESMATA-LOCATED PROTEINs (PDLPs), which
 197 consist of two conserved DUF26 domains and a transmembrane domain, and the CRRSPs, which are
 198 single or bi-modular soluble DUF26 domains (*Han et al., 2019; Lee et al., 2011; Ma et al., 2018;*
 199 *Miyakawa et al., 2014*). While few DUF26 domains from the CRRSPs and the PDLPs groups have
 200 been functionally characterized (*Han et al., 2019; Ma et al., 2018; Miyakawa et al., 2014*), the roles of
 201 CRKs DUF26 domains remain hypothetical (Figure 1). However, it is noteworthy that conserved
 202 cysteine residues present in these domains play critical role in DUF26 function. Four *AtCRK28*
 203 mutants carrying each an alanine instead of one cysteine residue of the DUF26 domains were unable
 204 to induce cell death in *N. benthamiana* compared to the wild type protein (*Yadeta et al., 2017*).
 205 Similarly, two versions of *AtCRK36* mutated in either all cysteine residues of the first or the second
 206 DUF26 domains lost their capacity to induce PTI and ETI (*Lee et al., 2017*).

207 **4.1 Detection of invasion patterns**

208 Similar to RLK ectodomains functions in plant defence (*Tang et al., 2017*), CRKs DUF26 domains are
 209 expected to be primary involved in the perception of apoplastic invasion patterns, *i.e.* all microbe or
 210 plant derived molecules that indicate pathogens invasion. While no ligand has been identified for CRK
 211 DUF26 domains, a body of evidences suggests that they may act as carbohydrate recognition modules.
 212 *In silico* structural homology analyses showed structural similarities between plant CRKs DUF26
 213 domains and different eukaryotic lectins known to specifically bind to carbohydrates (*Vaattovaara et*
 214 *al., 2019*). Furthermore, expression of CRK genes is modulated by the concentration of carbohydrates.
 215 For instance, an early expression of potato CRK genes was observed in response to leaves treatment
 216 by short oligogalacturonides (*Montesano et al., 2001*). Likewise, *AtCRKs* were upregulated upon
 217 apoplastic accumulation of *N*-acetylglucosamine oligosaccharide (*Vanholme et al., 2014*). Finally, and

218 most importantly, DUF26 domains from *Ginkgo biloba* CRRSP Ginkbilobin-2 (Gnk2) and from the
 219 maize CRRSP AFP1 both bind mannan from fungus cell wall (Ma et al., 2018; Miyakawa et al., 2014)
 220 and protein sequence alignments revealed the presence of the three conserved amino acid required for
 221 Gnk2 lectin activity in one DUF26 domain of some CRKs involved in immunity (Guo et al., 2021;
 222 Saintenac et al., 2021). More recently, the secreted CRRSP CRR1 from cotton containing a DUF26
 223 domain was shown to directly interact with class IV chitinase Chi28 to protect this protein from
 224 cleavage by the *Verticillium dahliae* protease (Han et al., 2019). This recent result leads to revisit our
 225 first thought for CRK DUF26 domain potential ligands and suggests that they may recognize different
 226 molecules including proteins and carbohydrates.

227 4.2 ROS sensors

228 Apoplastic accumulation of ROS is one of the earliest plant responses induced by the perception of
 229 invasion agents or environmental disturbances (Wrzaczek et al., 2013). CRKs are highly responsive to
 230 the apoplastic oxidative burst, as demonstrated by their specific upregulation following O₃ treatment
 231 while there was no change or downregulation in transcript levels in response to chloroplastic or
 232 mitochondrial ROS (Wrzaczek et al., 2010). Once produced, in addition to their anti-microbial effect,
 233 ROS act as signalling molecules through oxidation of targeted cysteine residues and formation of
 234 disulphide bridges (Couturier et al., 2013). The cysteine-rich motif C-X-C-X-C present in the DUF26
 235 domains, which is a widespread motif in bacterial ROS-sensing proteins (Ortiz de Orué Lucana et al.,
 236 2012), is most likely oxidized following ROS accumulation. According to these observations, it is
 237 speculated that CRKs is one of the extensively sought apoplastic ROS sensor (Bourdais et al., 2015;
 238 Castro et al., 2021; Qi et al., 2017; Wrzaczek et al., 2010, 2013), like the recently discovered LRR-
 239 RLK HPCA1 (Wu et al., 2020). This ROS-sensitive regulation may promote CRK conformational
 240 changes, which in turn would activate or modulate CRKs biological activities (Couturier et al., 2013;
 241 Paulsen and Carroll, 2010).

242 4.3 Mediator of protein-protein interaction

243 The rapid formation or stabilization of immune receptors complexes is crucial to initiate defence-
 244 signalling pathways (Wang and Chai, 2020). One of the best-described plasma membrane receptor
 245 complexes involves the PRR FLS2 and BAK1, which together recognize a conserved 22 amino acid
 246 sequence of the bacterial flagellin protein (flg22) to initiate PTI. In response to flg22 elicitation, BAK1
 247 associates with FLS2 and phosphorylates the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1 that in turn trans-
 248 phosphorylates FLS2 and BAK1 to activate downstream signalling (Lu et al., 2010). Protein-protein
 249 interaction experiments showed that AtCRK4, 6, 28 and 36 associate with FLS2 in an flg22-
 250 independent manner (Lee et al., 2017; Yadeta et al., 2017; Yeh et al., 2015) while AtCRK28 and
 251 AtCRK36 also interact with BAK1 and BIK1, respectively in presence of flg22. Furthermore, a yeast
 252 two-hybrid assay revealed that the AtCRK36 kinase domain is not sufficient for AtCRK36 association
 253 with FLS2, highlighting the importance of DUF26 domains in this interaction (Lee et al., 2017). These
 254 data demonstrate that CRKs integrate immune complexes thanks to their DUF26 domains. Cysteines
 255 present in the DUF26 domains are likely to form intra- and inter- disulphide bridges or zinc fingers,
 256 and/or to bind metal ions, such as zinc or iron (Ortiz de Orué Lucana et al., 2012), which could be
 257 critical for the establishment of successful protein interaction. However, versions of AtCRK36 lacking
 258 all the conserved cysteines in the first or in the second DUF26 domains were still able to associate with
 259 BIK1 (Lee et al., 2017), which suggest that other mechanisms are involved, at least for AtCRK36
 260 DUF26 dependant interaction with BIK1.

261 4.4 Antifungal peptide

262 Following mannose binding, the CRRSPs Gnk2 and AFP1 both exhibit antifungal activity against
 263 *Fusarium ssp.* and *Ustilago maydis*, respectively (Ma et al., 2018; Miyakawa et al., 2014). Likewise,
 264 the DUF26 domains from the recently identified TaCRK3 (or TaCRK-7A) protein has been reported
 265 to inhibit *in vitro* mycelial growth of the wheat necrotrophic fungus *Rhizoctonia cerealis* and the
 266 hemibiotrophic pathogen *Fusarium pseudograminearum* (Guo et al., 2021; Wu et al., 2021). However,
 267 whether the antifungal activity of TaCRK3 relies on mannose binding is unknown. This recent
 268 discovery ascertains the antifungal activity of the DUF26 domains from CRRSPs and CRK proteins
 269 but it questions whether the antifungal activity of the CRK DUF26 domains are conserved once the
 270 protein is embedded in the plasma membrane.

271 **5 Concluding remarks and prospects**

272 Since the large-scale phenomic analysis of *A. thaliana* CRK mutant lines, which has thoroughly
 273 highlighted the importance of CRK in plant immunity, several reports have related this role in other
 274 plant species. In addition to this prominent role, these proteins also participate in response to abiotic
 275 stresses and in the control of plant symbiotic interactions (Arellano-Villagómez et al., 2021; Berrabah
 276 et al., 2015; Bourdais et al., 2015; Hunter et al., 2019; Lu et al., 2016; Quezada et al., 2019; Quilbé et
 277 al., 2021; Zhang et al., 2013b). It is fascinating to see that even a single CRK could have a dual role in
 278 response to biotic and abiotic stresses like *AtCRK2*, which participates in resistance to bacterial
 279 pathogen *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 and to salt tolerance (Hunter et al., 2019). This
 280 questions on how CRKs orchestrate such different responses and how they can participate in such wide
 281 number of biological processes. Despite the number of important studies in *A. thaliana*, we are at the
 282 beginning of understanding the potential of CRK in regulating different biological processes, especially
 283 in crop species.

284 One of the most intriguing aspects of these proteins is the roles of their extracellular DUF26 domains
 285 that are postulated to be either ligand binding, ROS sensing, mediators of protein-protein interactions
 286 or antifungal activity. So far, the only validation is the *in vitro* antifungal activity of the *TaCRK3*
 287 extracellular domain. If validated *in planta*, this represents a new and original activity of RLK
 288 extracellular domains. Whether the CRK DUF26 bind mannose, another carbohydrate or represent the
 289 eagerly sought ROS sensors certainly represents a promising line of research. This diversity of putative
 290 roles questions whether one CRK DUF26 plays different role and how the two DUF26 domains of the
 291 CRK ectodomain work together. All the putative roles might not be exclusive and it may be
 292 hypothesized that this extracellular domain work as multi-sensors to integrate waves of complex
 293 external stimulus to efficiently and specifically trigger adapted cellular responses. Undoubtedly, these
 294 proteins and their enigmatic extracellular domains represent an important target to cope with crop
 295 diseases in a global perspective of climatic changes.

296 **6 Conflict of Interest**

297 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial
 298 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

299 **7 Author Contributions**

300 MB, TL and CS conceptualized the review. MB and CS surveyed the literature and synthesized the
 301 sources. MB organized the table and figure. MB, TL and CS wrote the final version of the paper. All
 302 authors contributed to the article and approved the submitted version.

303 **8 Funding**

304 This work was supported by the Region Auvergne-Rhône-Alpes, the Biologie et Amélioration des
 305 Plantes INRAE department, and the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER). We also
 306 acknowledge the support received from the Agence Nationale de la Recherche of the French
 307 government through the program “Investissements d’Avenir” (16-IDEX-0001 CAP 20-25).

308 9 References

- 309 Acharya, B. R., Raina, S., Maqbool, S. B., Jagadeeswaran, G., Mosher, S. L., Appel, H. M., et al.
 310 (2007). Overexpression of CRK13, an Arabidopsis cysteine-rich receptor-like kinase, results
 311 in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*: Overexpression of CRK13 induces
 312 pathogen defense. *The Plant Journal* 50, 488–499. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03064.x.
- 313 Arellano-Villagómez, F. C., Guevara-Olvera, L., Zuñiga-Mayo, V. M., E. Cerbantez-Bueno, V.,
 314 Verdugo-Perales, M., R. Medina, H., et al. (2021). Arabidopsis cysteine-rich receptor-like
 315 protein kinase *CRK33* affects stomatal density and drought tolerance. *Plant Signaling &*
 316 *Behavior* 16, 1905335. doi: 10.1080/15592324.2021.1905335.
- 317 Arnaud, D., and Hwang, I. (2015). A Sophisticated Network of Signaling Pathways Regulates
 318 Stomatal Defenses to Bacterial Pathogens. *Molecular Plant* 8, 566–581. doi:
 319 10.1016/j.molp.2014.10.012.
- 320 Battache, M., Lebrun, M.-H., Sakai, K., Soudière, O., Cambon, F., Langin, T., et al. (2022). Blocked
 321 at the Stomatal Gate, a Key Step of Wheat Stb16q-Mediated Resistance to *Zymoseptoria*
 322 *tritici*. *Frontiers in Plant Science* 13. Available at:
 323 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.921074> [Accessed July 29, 2022].
- 324 Berrabah, F., Ratet, P., and Gourion, B. (2015). Multiple steps control immunity during the
 325 intracellular accommodation of rhizobia. *Journal of Experimental Botany* 66, 1977–1985.
 326 doi: 10.1093/jxb/eru545.
- 327 Bourdais, G., Burdiak, P., Gauthier, A., Nitsch, L., Salojärvi, J., Rayapuram, C., et al. (2015). Large-
 328 Scale Phenomics Identifies Primary and Fine-Tuning Roles for CRKs in Responses Related to
 329 Oxidative Stress. *PLoS Genet* 11, e1005373. doi: 10.1371/journal.pgen.1005373.
- 330 Butković, A., González, R., Rivarez, M. P. S., and Elena, S. F. (2021). A genome-wide association
 331 study identifies Arabidopsis thaliana genes that contribute to differences in the outcome of
 332 infection with two Turnip mosaic potyvirus strains that differ in their evolutionary history and
 333 degree of host specialization. *Virus Evolution* 7, veab063. doi: 10.1093/ve/veab063.
- 334 Castro, B., Citterico, M., Kimura, S., Stevens, D. M., Wrzaczek, M., and Coaker, G. (2021). Stress-
 335 induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nat. Plants*
 336 7, 403–412. doi: 10.1038/s41477-021-00887-0.
- 337 Channale, S., Kalavikatte, D., Thompson, J. P., Kudapa, H., Bajaj, P., Varshney, R. K., et al. (2021).
 338 Transcriptome analysis reveals key genes associated with root-lesion nematode *Pratylenchus*
 339 *thornei* resistance in chickpea. *Sci Rep* 11, 17491. doi: 10.1038/s41598-021-96906-3.
- 340 Chen, K., Du, L., and Chen, Z. (2003). Sensitization of defense responses and activation of
 341 programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in Arabidopsis.
 342 *Plant Molecular Biology* 53, 61–74. doi: 10.1023/B:PLAN.0000009265.72567.58.

- 343 Chen, K., Fan, B., Du, L., and Chen, Z. (2004). Activation of hypersensitive cell death by pathogen-
344 induced receptor-like protein kinases from Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 56, 271–
345 283. doi: 10.1007/s11103-004-3381-2.
- 346 Chen, Z. (2001). A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats. *Plant Physiol.* 126, 473–
347 476.
- 348 Chern, M., Xu, Q., Bart, R. S., Bai, W., Ruan, D., Sze-To, W. H., et al. (2016). A Genetic Screen
349 Identifies a Requirement for Cysteine-Rich–Receptor-Like Kinases in Rice NH1 (OsNPR1)-
350 Mediated Immunity. *PLoS Genet* 12, e1006049. doi: 10.1371/journal.pgen.1006049.
- 351 Couturier, J., Chibani, K., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N. (2013). Cysteine–based redox regulation
352 and signaling in plants. *Front. Plant Sci.* 4. doi: 10.3389/fpls.2013.00105.
- 353 de Oliveira, M. V. V., Xu, G., Li, B., de Souza Vespoli, L., Meng, X., Chen, X., et al. (2016).
354 Specific control of Arabidopsis BAK1/SERK4-regulated cell death by protein glycosylation.
355 *Nature Plants* 2, 15218. doi: 10.1038/nplants.2015.218.
- 356 Delgado-Cerrone, L., Alvarez, A., Mena, E., Ponce de León, I., and Montesano, M. (2018). Genome-
357 wide analysis of the soybean CRK-family and transcriptional regulation by biotic stress
358 signals triggering plant immunity. *PLoS ONE* 13, e0207438. doi:
359 10.1371/journal.pone.0207438.
- 360 Du, D., Liu, M., Xing, Y., Chen, X., Zhang, Y., Zhu, M., et al. (2019). Semi-dominant mutation in
361 the cysteine-rich receptor-like kinase gene, *ALS1*, conducts constitutive defence response in
362 rice. *Plant Biol J* 21, 25–34. doi: 10.1111/plb.12896.
- 363 Gu, J., Sun, J., Liu, N., Sun, X., Liu, C., Wu, L., et al. (2020). A novel cysteine-rich receptor-like
364 kinase gene, *TaCRK2*, contributes to leaf rust resistance in wheat. *Molecular Plant
365 Pathology*. doi: 10.1111/mpp.12929.
- 366 Gudesblat, G. E., Torres, P. S., and Vojnov, A. A. (2009). Stomata and pathogens: Warfare at the
367 gates. *Plant Signal Behav* 4, 1114–1116.
- 368 Guo, F., Wu, T., Shen, F., Xu, G., Qi, H., and Zhang, Z. (2021). The cysteine-rich receptor-like
369 kinase TaCRK3 contributes to defense against *Rhizoctonia cerealis* in wheat. *Journal of
370 Experimental Botany*, erab328. doi: 10.1093/jxb/erab328.
- 371 Han, L.-B., Li, Y.-B., Wang, F.-X., Wang, W.-Y., Liu, J., Wu, J.-H., et al. (2019). The Cotton
372 Apoplastic Protein CRR1 Stabilizes Chitinase 28 to Facilitate Defense against the Fungal
373 Pathogen *Verticillium dahliae*. *Plant Cell* 31, 520–536. doi: 10.1105/tpc.18.00390.
- 374 Hunter, K., Kimura, S., Rokka, A., Tran, H. C., Toyota, M., Kukkonen, J. P., et al. (2019). CRK2
375 Enhances Salt Tolerance by Regulating Callose Deposition in Connection with PLD α 1.
376 *Plant Physiol.* 180, 2004–2021. doi: 10.1104/pp.19.00560.
- 377 Hussain, A., Asif, N., Pirzada, A. R., Noureen, A., Shaukat, J., Burhan, A., et al. (2022). Genome
378 wide study of cysteine rich receptor like proteins in *Gossypium* sp. *Sci Rep* 12, 4885. doi:
379 10.1038/s41598-022-08943-1.

- 380 Idänheimo, N., Gauthier, A., Salojärvi, J., Siligato, R., Brosché, M., Kollist, H., et al. (2014). The
381 *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinases CRK6 and CRK7 protect against
382 apoplastic oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 445,
383 457–462. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.013.
- 384 Kimura, S., Hunter, K., Vaahtera, L., Tran, H. C., Citterico, M., Vaattovaara, A., et al. (2020). CRK2
385 and C-terminal Phosphorylation of NADPH Oxidase RBOHD Regulate Reactive Oxygen
386 Species Production in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.19.00525.
- 387 Lee, D. S., Kim, Y. C., Kwon, S. J., Ryu, C.-M., and Park, O. K. (2017). The *Arabidopsis* Cysteine-
388 Rich Receptor-Like Kinase CRK36 Regulates Immunity through Interaction with the
389 Cytoplasmic Kinase BIK1. *Frontiers in Plant Science* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.01856.
- 390 Lee, J.-Y., Wang, X., Cui, W., Sager, R., Modla, S., Czymbek, K., et al. (2011). A Plasmodesmata-
391 Localized Protein Mediates Crosstalk between Cell-to-Cell Communication and Innate
392 Immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23, 3353–3373. doi: 10.1105/tpc.111.087742.
- 393 Li, T., Gao, H., Tang, X., and Gong, D. (2021). VaCRK2 Mediates Gray Mold Resistance in *Vitis*
394 *amurensis* by Activating the Jasmonate Signaling Pathway. *Agronomy* 11, 1672. doi:
395 10.3390/agronomy11081672.
- 396 Li, T.-G., Zhang, D.-D., Zhou, L., Kong, Z.-Q., Hussaini, A. S., Wang, D., et al. (2018). Genome-
397 Wide Identification and Functional Analyses of the CRK Gene Family in Cotton Reveals
398 GbCRK18 Confers *Verticillium* Wilt Resistance in *Gossypium barbadense*. *Front. Plant Sci.*
399 9, 1266. doi: 10.3389/fpls.2018.01266.
- 400 Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase,
401 BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity.
402 *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 496–501. doi:
403 10.1073/pnas.0909705107.
- 404 Lu, K., Liang, S., Wu, Z., Bi, C., Yu, Y.-T., Wang, X.-F., et al. (2016). Overexpression of an
405 *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like protein kinase, CRK5, enhances abscisic acid
406 sensitivity and confers drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 67, 5009–5027.
407 doi: 10.1093/jxb/erw266.
- 408 Ma, L.-S., Wang, L., Trippel, C., Mendoza-Mendoza, A., Ullmann, S., Moretti, M., et al. (2018). The
409 *Ustilago maydis* repetitive effector Rsp3 blocks the antifungal activity of mannose-binding
410 maize proteins. *Nature Communications* 9. doi: 10.1038/s41467-018-04149-0.
- 411 Miyakawa, T., Hatano, K. -i., Miyauchi, Y., Suwa, Y. -i., Sawano, Y., and Tanokura, M. (2014). A
412 Secreted Protein with Plant-Specific Cysteine-Rich Motif Functions as a Mannose-Binding
413 Lectin That Exhibits Antifungal Activity. *PLANT PHYSIOLOGY* 166, 766–778. doi:
414 10.1104/pp.114.242636.
- 415 Montesano, M., Koiv, V., Mae, A., and Palva, E. T. (2001). Novel receptor-like protein kinases
416 induced by *Erwinia carotovora* and short oligogalacturonides in potato. *Mol Plant Pathol* 2,
417 339–346. doi: 10.1046/j.1464-6722.2001.00083.x.

- 418 Mou, S., Meng, Q., Gao, F., Zhang, T., He, W., Guan, D., et al. (2021). A cysteine-rich receptor-like
419 protein kinase CaCKR5 modulates immune response against *Ralstonia solanacearum*
420 infection in pepper. *BMC Plant Biol* 21, 382. doi: 10.1186/s12870-021-03150-y.
- 421 Ortiz de Orué Lucana, D., Wedderhoff, I., and Groves, M. R. (2012). ROS-Mediated Signalling in
422 Bacteria: Zinc-Containing Cys-X-X-Cys Redox Centres and Iron-Based Oxidative Stress.
423 *Journal of Signal Transduction* 2012, 1–9. doi: 10.1155/2012/605905.
- 424 Paulsen, C. E., and Carroll, K. S. (2010). Orchestrating Redox Signaling Networks through
425 Regulatory Cysteine Switches. *ACS Chem. Biol.* 5, 47–62. doi: 10.1021/cb900258z.
- 426 Qi, J., Wang, J., Gong, Z., and Zhou, J.-M. (2017). Apoplastic ROS signaling in plant immunity.
427 *Current Opinion in Plant Biology* 38, 92–100. doi: 10.1016/j.pbi.2017.04.022.
- 428 Quezada, E.-H., García, G.-X., Arthikala, M.-K., Melappa, G., Lara, M., and Nanjareddy, K. (2019).
429 Cysteine-Rich Receptor-Like Kinase Gene Family Identification in the Phaseolus Genome
430 and Comparative Analysis of Their Expression Profiles Specific to Mycorrhizal and
431 Rhizobial Symbiosis. *Genes* 10, 59. doi: 10.3390/genes10010059.
- 432 Quilbé, J., Lamy, L., Brottier, L., Leleux, P., Fardoux, J., Rivallan, R., et al. (2021). Genetics of
433 nodulation in *Aeschynomene evenia* uncovers mechanisms of the rhizobium–legume
434 symbiosis. *Nat Commun* 12, 829. doi: 10.1038/s41467-021-21094-7.
- 435 Rayapuram, C., Jensen, M. K., Maiser, F., Shanir, J. V., Hornshøj, H., Rung, J. H., et al. (2012).
436 Regulation of basal resistance by a powdery mildew-induced cysteine-rich receptor-like
437 protein kinase in barley: CRK-regulated basal resistance in barley. *Molecular Plant*
438 *Pathology* 13, 135–147. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00736.x.
- 439 Rodrigues, O., and Shan, L. (2022). Stomata in a state of emergency: H₂O₂ is the target locked.
440 *Trends in Plant Science* 27, 274–286. doi: 10.1016/j.tplants.2021.10.002.
- 441 Sainenac, C., Cambon, F., Aouini, L., Verstappen, E., Ghaffary, S. M. T., Poucet, T., et al. (2021). A
442 wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against *Septoria*
443 *tritici* blotch. *Nat Commun* 12, 433. doi: 10.1038/s41467-020-20685-0.
- 444 Shumayla, Tyagi, S., Sharma, A., Singh, K., and Upadhyay, S. K. (2019). Genomic dissection and
445 transcriptional profiling of Cysteine-rich receptor-like kinases in five cereals and functional
446 characterization of TaCRK68-A. *International Journal of Biological Macromolecules* 134,
447 316–329. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.016.
- 448 Subramanyam, S., Nemacheck, J. A., Hargarten, A. M., Sardesai, N., Schemerhorn, B. J., and
449 Williams, C. E. (2019). Multiple molecular defense strategies in *Brachypodium distachyon*
450 surmount Hessian fly (*Mayetiola destructor*) larvae-induced susceptibility for plant survival.
451 *Sci Rep* 9, 2596. doi: 10.1038/s41598-019-39615-2.
- 452 Tanaka, H., Osakabe, Y., Katsura, S., Mizuno, S., Maruyama, K., Kusakabe, K., et al. (2012).
453 Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in
454 *Arabidopsis*: Receptor-like kinases in ABA signaling. *The Plant Journal* 70, 599–613. doi:
455 10.1111/j.1365-313X.2012.04901.x.

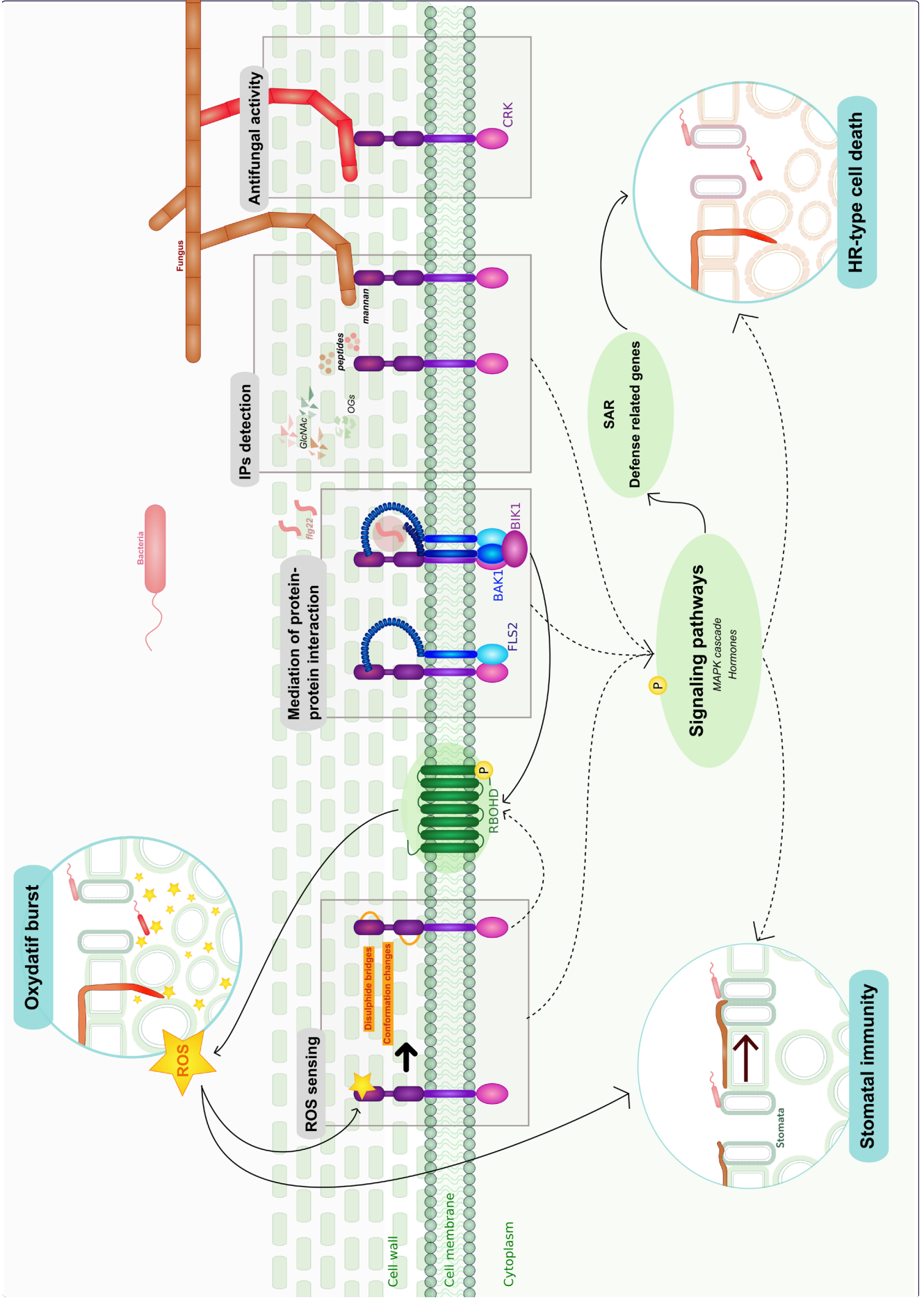
- 456 Tang, D., Wang, G., and Zhou, J.-M. (2017). Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More
457 Than Pattern Recognition. *The Plant Cell* 29, 618–637. doi: 10.1105/tpc.16.00891.
- 458 Torres, M. A. (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138, 414–429. doi:
459 10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x.
- 460 Vaattovaara, A., Brandt, B., Rajaraman, S., Safronov, O., Veidenberg, A., Luklová, M., et al. (2019).
461 Mechanistic insights into the evolution of DUF26-containing proteins in land plants.
462 *Communications Biology* 2. doi: 10.1038/s42003-019-0306-9.
- 463 Vanholme, B., Vanholme, R., Turumtay, H., Goeminne, G., Cesarino, I., Goubet, F., et al. (2014).
464 Accumulation of N-Acetylglucosamine Oligomers in the Plant Cell Wall Affects Plant
465 Architecture in a Dose-Dependent and Conditional Manner. *PLANT PHYSIOLOGY* 165, 290–
466 308. doi: 10.1104/pp.113.233742.
- 467 Wang, J., and Chai, J. (2020). Structural Insights into the Plant Immune Receptors PRRs and
468 NLRs1 [OPEN]. *Plant Physiology* 182, 1566–1581. doi: 10.1104/pp.19.01252.
- 469 Wang, J., Wang, J., Li, J., Shang, H., Chen, X., and Hu, X. (2021). The RLK protein TaCRK10
470 activates wheat high-temperature seedling-plant resistance to stripe rust through interacting
471 with TaH2A.1. *Plant J*, tpj.15513. doi: 10.1111/tpj.15513.
- 472 Wang, Z., and Gou, X. (2021). The First Line of Defense: Receptor-like Protein Kinase-Mediated
473 Stomatal Immunity. *IJMS* 23, 343. doi: 10.3390/ijms23010343.
- 474 Wrzaczek, M., Brosché, M., and Kangasjärvi, J. (2013). ROS signaling loops — production,
475 perception, regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 16, 575–582. doi:
476 10.1016/j.pbi.2013.07.002.
- 477 Wrzaczek, M., Brosché, M., Salojärvi, J., Kangasjärvi, S., Idänheimo, N., Mersmann, S., et al.
478 (2010). Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of Receptor-like protein kinases
479 by ozone and plant hormones in Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 10, 95. doi: 10.1186/1471-
480 2229-10-95.
- 481 Wu, F., Chi, Y., Jiang, Z., Xu, Y., Xie, L., Huang, F., et al. (2020). Hydrogen peroxide sensor
482 HPCA1 is an LRR receptor kinase in Arabidopsis. *Nature* 578, 577–581. doi:
483 10.1038/s41586-020-2032-3.
- 484 Wu, T., Guo, F., Xu, G., Yu, J., Zhang, L., Wei, X., et al. (2021). The Receptor-like Kinase TaCRK-
485 7A Inhibits *Fusarium pseudograminearum* Growth and Mediates Resistance to *Fusarium*
486 Crown Rot in Wheat. *Biology* 10, 1122. doi: 10.3390/biology10111122.
- 487 Yadeta, K. A., Elmore, J. M., Creer, A. Y., Feng, B., Franco, J. Y., Rufian, J. S., et al. (2017). A
488 Cysteine-Rich Protein Kinase Associates with a Membrane Immune Complex and the
489 Cysteine Residues Are Required for Cell Death. *Plant Physiol.* 173, 771–787. doi:
490 10.1104/pp.16.01404.
- 491 Yeh, Y.-H., Chang, Y.-H., Huang, P.-Y., Huang, J.-B., and Zimmerli, L. (2015). Enhanced
492 Arabidopsis pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like
493 kinases. *Frontiers in Plant Science* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00322.

- 494 Zhang, X., Han, X., Shi, R., Yang, G., Qi, L., Wang, R., et al. (2013a). Arabidopsis cysteine-rich
 495 receptor-like kinase 45 positively regulates disease resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant*
 496 *Physiology and Biochemistry* 73, 383–391. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.10.024.
- 497 Zhang, X., Yang, G., Shi, R., Han, X., Qi, L., Wang, R., et al. (2013b). Arabidopsis cysteine-rich
 498 receptor-like kinase 45 functions in the responses to abscisic acid and abiotic stresses. *Plant*
 499 *Physiology and Biochemistry* 67, 189–198. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.03.013.
- 500 Zhou, Q., Zhang, Z., Liu, T., Gao, B., and Xiong, X. (2017). Identification and Map-Based Cloning
 501 of the Light-Induced Lesion Mimic Mutant 1 (LIL1) Gene in Rice. *Front. Plant Sci.* 8, 2122.
 502 doi: 10.3389/fpls.2017.02122.

503 10 Figure Legends

504 **Figure 1.** Model for CRK functions in plant immunity.

505 Upon pathogen invasion, four roles (grey boxes) have been hypothesized for CRKs ectodomain
 506 composed most often of two DUF26 motifs: (i) ROS sensing; (ii) mediation of protein-protein
 507 interaction, with stabilization of immune complexes prior to or post ligand binding; (iii) detection of
 508 invasion patterns (IPs) such as pathogen-derived carbohydrates or peptides (OGs = oligo-
 509 galacturonides, GlcNAc = N-acetylglucosamine) and (iv) antifungal activity. Signal perception triggers
 510 the activation of CRKs kinase domain that subsequently initiates different immune signalling pathways
 511 (circle in green) by phosphorylation events (yellow circled “P”). These intracellular signalling, that
 512 likely involved MAPK cascades and hormones, lead to molecular and physiological changes (blue
 513 circles), including extracellular ROS production by activation of RBOHD, stomatal immunity and HR-
 514 type cell death, ultimately resulting in resistance. Full and dashed arrows indicate functionally
 515 validated and hypothesized link between different components respectively.



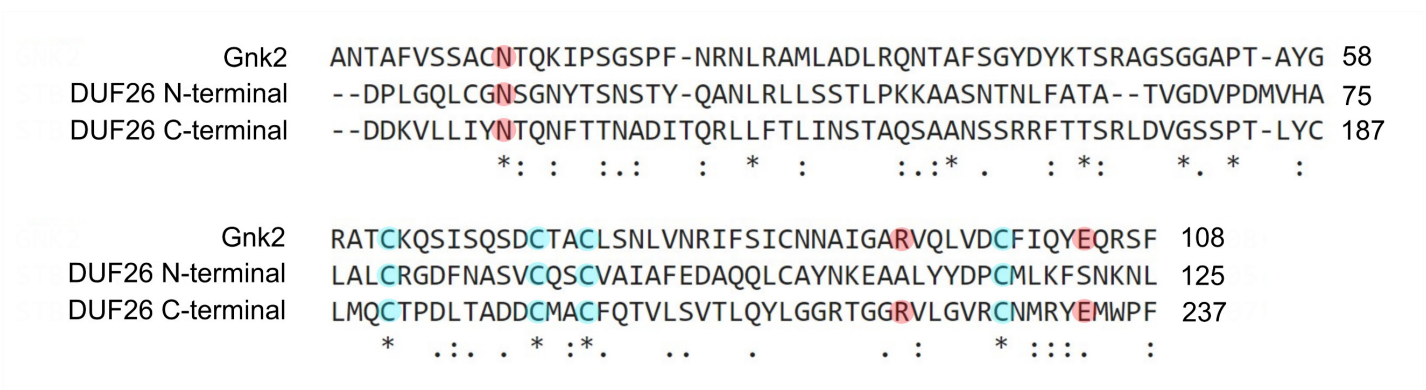


FIGURE 13. ALIGNEMENT DES SEQUENCES PROTEIQUES DE GNK2 ET DES DEUX DOMAINES DUF26 DE STB16.

L'alignement des séquences a été effectué avec Clustal Omega. «*» indique des acides aminés identiques entre séquences, «:» indique des acides aminés aux propriétés physico-chimiques fortement similaires, «.» indique des acides aminés aux propriétés physico-chimiques faiblement similaires. Les ronds bleus montrent les résidus cystéines conservés entre les trois séquences. Les ronds rouges montrent les trois résidus impliqués dans la liaison du mannose par Gnk2 et leur conservation dans les séquences protéiques des deux domaines DUF26.

Le Chapitre 3 regroupe l'ensemble des expérimentations visant à apporter des informations relatives aux événements moléculaires et physiologiques conduisant à l'arrêt de *Z. tritici* dans le cadre de la résistance médiée par le gène *Stb16q*. Ce chapitre est structuré autour de trois axes visant à répondre aux questions suivantes :

Axe 1 – « Comment » STB16 reconnaît la présence de *Z. tritici* ?

Axe 2 – « Comment » STB16 transduit le signal suite à la reconnaissance de *Z. tritici* ?

Axe 3 – « Comment » *Z. tritici* est-il arrêté suite à la transduction du signal ?

AXE 1 – LA RECONNAISSANCE DE *Z. TRITICI*

La première étape conduisant à l'activation des réponses de défense est la reconnaissance de l'agent pathogène (Introduction – Section 2.1). Un des premiers rôles de la plupart des RLK impliquées dans l'immunité est donc de percevoir, *via* leurs domaines extracellulaires, des signaux caractéristiques de la présence de l'agent pathogène (IMs, « Invasion Molecules »). Dans l'objectif de caractériser le signal perçu par STB16 lors de l'infection par *Z. tritici*, nous sommes par conséquent focalisés sur l'identification du ou des ligand(s) reconnus par les domaines extracellulaires de la protéine STB16.

L'alignement de la séquence des deux domaines DUF26 de STB16 (2xDUF26) avec la séquence de la protéine CRRSP Gnk2 a révélé 42 % de similarités, et la présence, dans le domaine DUF26 C-terminal de la protéine STB16, des trois acides aminés (Asn₁₃₉, Arg₂₂₂ et Glu₂₃₃) impliqués dans la fixation par Gnk2 du mannane, un polymère de mannose présent dans la paroi fongique (Miyakawa et al., 2014) (FIGURE 13). Sur la base de cette observation et sur la littérature relative aux CRKs (Article de revue), notre hypothèse est qu'au moins l'un des deux domaines DUF26 de STB16 pourrait lier un glucide ou un composé glucidique, soit d'origine fongique (composé de la paroi fongique), soit d'origine végétale (issu de la dégradation des parois végétales par le champignon). Pour tester cette hypothèse, notre stratégie a consisté à produire les domaines 2xDUF26 de STB16 en système hétérologue afin de pouvoir réaliser des essais d'interactions protéine-sucre. Les travaux conduits au cours de cet axe ont été menés en collaboration avec l'équipe Glycobiologie Moléculaire et Structurale (GBMS, Annabelle Varrot) de l'Unité de recherche CERMAV du CNRS à Grenoble, spécialisée dans les glycosciences.

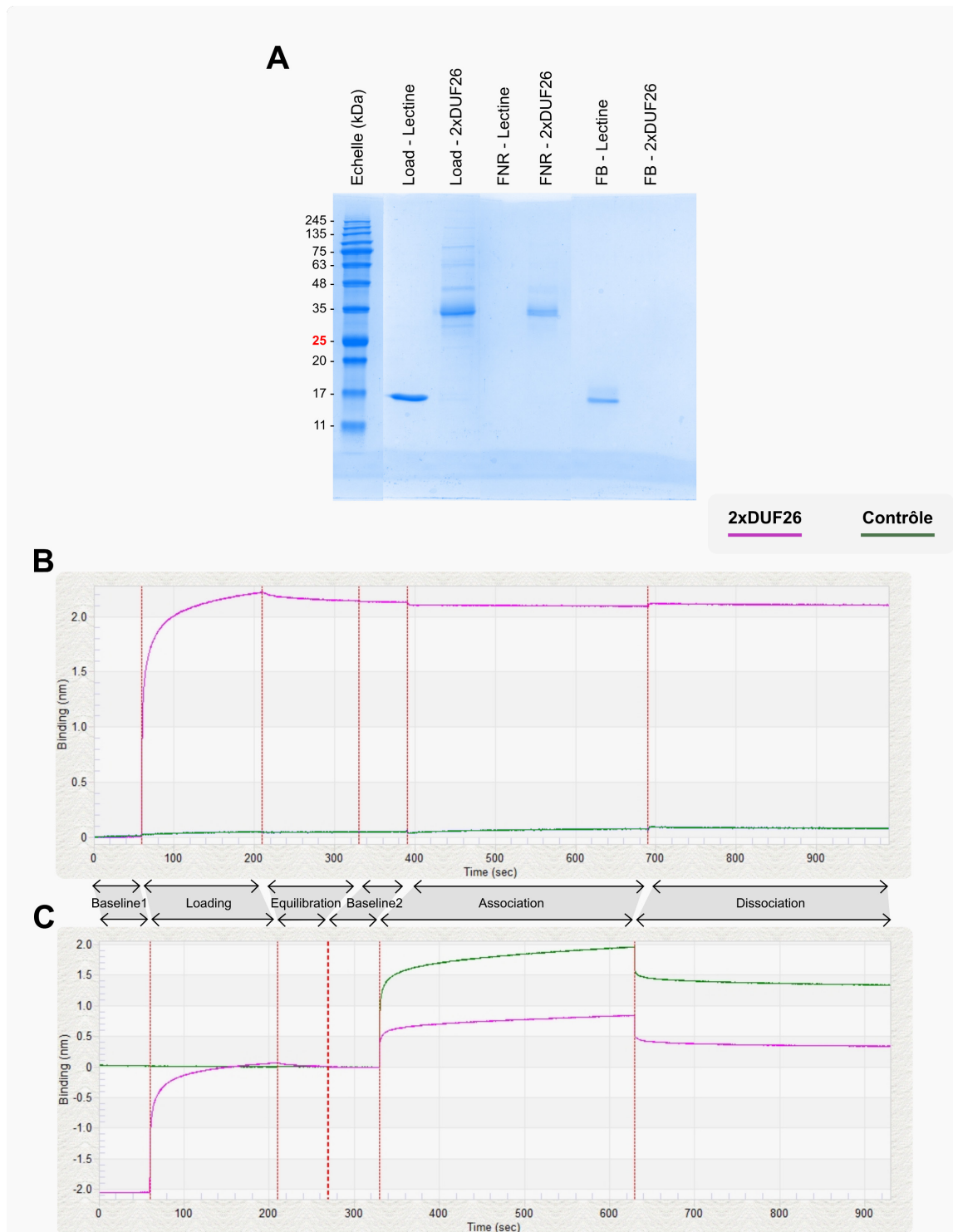


FIGURE 14. TESTS D'INTERACTIONS ENTRE LES DOMAINES 2xDUF26 RECOMBINANTS ET DIFFERENTS COMPOSES.

(A) Chromatographie d'affinité au mannose. La fraction « Load », contenant soit la lectine à mannose BC2LA (Load - Lectine), soit les domaines 2xDUF26 recombinants (Load - 2xDUF26), représente la solution chargée sur la colonne à mannose. La fraction « FNR » représente la Fraction Non Retenue sur la colonne. La fraction « FB » représente la Fraction Bouillie, issue de l'éluion par dénaturation des protéines fixées sur la colonne. (B) et (C) Décalages de longueur d'onde (« Binding ») types obtenus par BioLayer Interferométrie. En rose, les biocapteurs « chargés » avec les domaines 2xDUF26 recombinants, en vert les biocapteurs « nu ». L'étape « Loading » correspond à l'immobilisation des domaines 2xDUF26 recombinants biotinylés sur le biocapteur couvert de streptavidine. L'étape « Association » correspond aux tests d'interactions entre les domaines 2xDUF26 recombinants immobilisés sur le biocapteur et des solutions contenant des ligands candidats, avec (B) pas d'interaction entre les 2xDUF26 et les ligands candidats et (C) des interactions non spécifiques entre le biocapteur et des composés des solutions testées. Les étapes « Baseline », « Equilibration » et « Dissociation » correspondent à des étapes de lavages du biocapteur dans du PBS 1X.

RESULTATS

PRODUCTION DES DOMAINES 2xDUF26 RECOMBINANTS

Suite aux essais infructueux de production des domaines extracellulaires DUF26 de la protéine STB16 en système procaryote *E. coli* (non présentés dans ce manuscrit), nous avons décidé de faire produire ces domaines en système eucaryote. Une protéine recombinante 2xDUF26_TevHis a ainsi été produite en cellules d'insecte par le prestataire de service ProtéoGénix avec un rendement de 1,6 - 2,4 mg/L (FIGURE SUPPLEMENTAIRE 1). D'après le certificat d'analyse fourni par ProtéoGénix, la protéine recombinante était visible autour de 35 kDa lors de l'analyse SDS-PAGE, contre les 28 kDa attendus, suggérant de possibles modifications post-traductionnelles qui impacteraient la migration de la protéine sur gel (Yadeta et al., 2017). Cette protéine recombinante a été utilisée pour les tests d'interaction suivants (Matériel et Méthodes : Annexes au Chapitre 3).

TESTS D'INTERACTION AVEC LES DOMAINES 2xDUF26 RECOMBINANTS

Pour tester l'interaction entre les domaines 2xDUF26 de STB16 et le mannose, une chromatographie d'affinité au mannose a été réalisée avec les domaines 2xDUF26 recombinants produits en cellules d'insecte. La chromatographie d'affinité n'a révélé aucune affinité des domaines 2xDUF26 recombinants pour le mannose, contrairement au contrôle positif qui était une lectine à mannose (FIGURE 14.A).

Pour tester une gamme de ligands candidats plus diversifiée, la technique d'interférométrie de biocouches (BioLayer Interferometry, BLI) a été utilisée en collaboration avec le CERMAV pour tester l'interaction des domaines 2xDUF26 recombinants avec : des sucres disponibles au laboratoire (galactane, galactomannane, β -D-mannane, laminarine, yeast β -D-glucane, xyloglucane-fucose, rhamnogalacturonane, cellopentaose, 1,4- β -D mannohexaose, chitotetraose, Man- α -1,3-Man- α -1,6-Man), des suspensions de spores de *Z. tritici* et des extraits totaux, de paroi ou apoplasmiques de feuilles des NIL^{Stb16q} et NIL^{stb} inocuées avec l'isolat avirulent IPO9415 de *Z. tritici*. Ces différents tests ont révélé soit aucune interaction entre les domaines 2xDUF26 recombinants et les ligands candidats (FIGURE 14.B), soit des interactions non spécifiques (FIGURE 14.C).


```

>seq      Length = 220
Potential N-Linked Glycosylated Sites:
DPLGQLCGNSGNYTSNSTYQANLRLLSSTLPKKAASNTNLFATATVGDVPMVHALALCRGDFNASVCQSCVAIAFEDAQQLCAYNKEAALYYDPCMLKF
SNKNLATTDDDKVLLIYNNTQNFNTNADITQRLFLTLINSTAQSAANSRRRFTTSRLDVGSSPTLYCLMQCTPDLTADDCMACFQTVLSVTLQYLGGR
GGRVLGVRCNMRYEMWPFQGG
-----
Position      Residue  Score      Prediction
-----
  9      NSG      -0.6516484  Non-glycosylated
 12      NYT      1.0631934   Potential Glycosylated
 16      NST      1.1493854   Potential Glycosylated
 22      NLR      -0.95676496 Non-glycosylated
 37      NTN      -0.33058266 Non-glycosylated
 39      NLF      -1.4055075  Non-glycosylated
 64      NAS      0.84971242  Potential Glycosylated
 86      NKE      -0.89937206 Non-glycosylated
102      NKN      -0.33203359 Non-glycosylated
104      NLA      -0.92457017 Non-glycosylated
119      NTQ      -0.78518563 Non-glycosylated
122      NFT      1.3289107   Potential Glycosylated
126      NAD      -0.85894653 Non-glycosylated
139      NST      1.1219176   Potential Glycosylated
147      NSS      1.031221    Potential Glycosylated
209      NMR      -1.3391849  Non-glycosylated
*****

```

FIGURE 15. SITES DE N-GLYCOSYLATION DES DOMAINES 2xDUF26 DE STB16 PREDITS *IN SILICO*.

La prédiction des sites de N-glycosylation a été réalisée à l'aide du logiciel GlycoEP (Chauhan et al., 2013).

CONCLUSION

L'objectif de cet axe était d'identifier le ou les ligands des domaines extracellulaires de la protéine STB16. Aucune interaction de quelque nature que ce soit (protéine-sucre ou protéine-protéine) n'a pu être détectée lors des tests d'interaction avec la protéine recombinante 2xDUF26_TevHis, y compris lors des tests avec les échantillons biologiques (extraits totaux de feuilles, de parois, d'apoplastes). Le repliement des domaines 2xDUF26 recombinants a été analysé ultérieurement par RMN au CERMAV. Les résultats ont montré qu'une proportion importante de la protéine recombinante n'était pas structurée, reflétant son mauvais repliement. Puisque l'activité biologique d'une protéine est déterminée par son repliement (Miernyk, 1999), ce problème peut expliquer l'absence d'interactions observée.

Plusieurs pistes sont en cours, ou envisagées, pour produire une protéine recombinante 2xDUF26 correctement repliée et lever ainsi ce verrou technique :

- 1) De nouveaux essais de production en système eucaryote levure sont en cours au CERMAV.
- 2) Une CRK de blé (TaCRK3) recombinante a été produite avec succès récemment en système procaryote (Guo et al., 2021). Le protocole expérimental ayant servi à produire cette CRK pourrait être adapté pour produire les 2xDUF26 de STB16.
- 3) Les modifications post-traductionnelles (MPT) peuvent impacter le repliement et l'activité biologique d'une protéine (Shental-Bechor and Levy, 2008). Par exemple, la N-glycosylation, la MPT la plus commune consistant en l'ajout de différents sucres sur un résidu asparagine par diverses enzymes, s'est avérée importante pour la fonction de plusieurs récepteurs de l'immunité, comme FLS2, EFR ou encore les protéines Cf (Häweker et al., 2010; Liebrand et al., 2013). AtCRK28 et AtCRK24 ont également été décrites comme des protéines glycosylées complexes (de Oliveira et al., 2016; Yadeta et al., 2017). Plus particulièrement, la N-glycosylation de AtCRK4, médiée par la protéine STT3a, a été décrite comme nécessaire pour la fonction (et probablement le bon repliement) de la protéine (de Oliveira et al., 2016). Six sites de N-glycosylation potentiels sont prédits *in silico* dans les 2xDUF26 de la protéine STB16 (FIGURE 15). Il est donc envisageable que la protéine STB16 nécessite une ou plusieurs N-glycosylations spécifiques/complexes pour assurer son bon repliement et son activité biologique.

Les processus de N-glycosylation et la structure du sucre lié à la protéine peuvent varier d'un système de production à l'autre (Wilson, 2002; Shi and Jarvis, 2007; Strasser,

2016; Wang et al., 2017). Il se pourrait donc que la ou les N-glycosylation, et plus généralement les MPT, des domaines 2xDUF26 recombinants de STB16 dans les systèmes bactériens, insectes ou levures, ne correspondent pas tout à fait à celle(s) mise(s) en place *in planta*, conduisant *de facto* à un mauvais repliement de la protéine. Afin de s'approcher au plus près de l'environnement moléculaire et cellulaire natif de la protéine, nous pourrions envisager de produire les domaines 2xDUF26 recombinants chez *Nicotiana benthamiana* par agroinfiltration selon la stratégie décrite par Ma (Ma et al., 2018). Le peptide signal de la CRRSP AFP1 serait ajouté à la séquence des domaines 2xDUF26 pour permettre une sécrétion de la protéine recombinante dans l'apoplasme et la purification des domaines 2xDUF26 recombinants serait ensuite réalisée.

Une fois ce verrou méthodologique levé, les tests d'interaction présentés dans cet axe seront à nouveau menés afin d'identifier le ou les ligands des domaines extracellulaires de STB16. L'interaction avec le facteur d'virulence codé par le gène *AvrStb16q*, en cours de clonage, sera également testée.

AXE 2 – LA TRANSDUCTION DU SIGNAL

Après la perception d'un signal, une RLK active une voie de signalisation pour transmettre l'information de l'extérieur de la cellule végétale à son cytoplasme, afin de déclencher des réponses adaptées au signal perçu. Cette transduction de signal, c'est-à-dire la conversion d'un signal externe en réponse cellulaire, est initiée au niveau du domaine cytoplasmique des RLKs. Le domaine cytoplasmique d'une RLK est généralement composé d'un domaine kinase bordée d'une région C-terminale et d'une région juxta-membranaire. Le domaine kinase, responsable de l'activité catalytique de la protéine, est lui-même composé de 12 sous-domaines (Hanks and Hunter, 1995). Les sous-domaines I, II, III et V sont impliqués dans la liaison à l'ATP, les sous-domaines IV et VIa dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle de la kinase et les sous-domaines X et XI pourraient être impliqués dans la liaison à des substrats protéiques. Le sous-domaine VIb constitue la boucle catalytique de la kinase, stabilisée par les sous-domaines VII et IX, avec un motif HxDLKxxN conservé chez toutes les kinases. La présence d'un résidu arginine (R) précède immédiatement le résidu catalytique aspartate (D) dans le sous-domaine VIb différencie les kinases RD, comme celle de STB16, des kinases non-RD. Les kinases RD se distinguent des kinases non-RD notamment par les voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées et par leur mode d'activation qui nécessite l'autophosphorylation d'un à trois résidus dans la boucle d'activation que constitue le sous-domaine VIII de la kinase (Oh et al., 2009; Bender et al., 2021).

Il est généralement admis que, suite à la perception d'un signal, une RLK s'associe à des partenaires membranaires ou cytoplasmiques, souvent par homo- ou hétéro-dimérisation, pour former des complexes immuns (Oh et al., 2000; Han et al., 2014; Jose et al., 2020). Cette association conduirait à l'autophosphorylation et/ou à la transphosphorylation de résidus spécifiques au sein du domaine kinase et des régions juxtaposées. La kinase de la RLK ainsi activée relaye alors le signal en phosphorylant des partenaires protéiques cytoplasmiques, initiant la cascade de signalisation conduisant aux réponses cellulaires adéquates.

Deux approches expérimentales clés pour la compréhension des mécanismes d'activation et de la fonction des RLKs reposent sur l'identification et l'analyse des sites de phosphorylations spécifiques et sur l'identification des partenaires protéiques membranaires et cytoplasmiques du domaine cytoplasmique. Pour comprendre le mécanisme de transduction du signal suite à la reconnaissance de *Z. tritici* par STB16, nous nous sommes donc focalisés sur le domaine cytoplasmique de STB16 avec pour objectif d'en identifier les sites de phosphorylation *in vitro*.

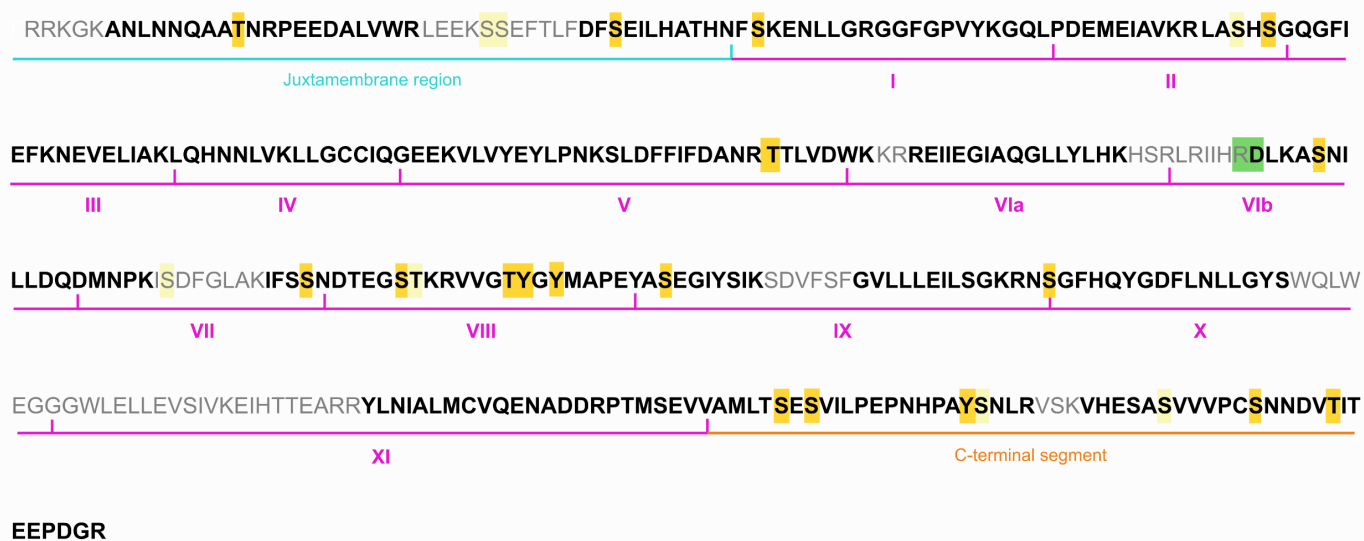


FIGURE 16. SITES DE PHOSPHORYLATION *IN VITRO* DE LA PROTEINE RECOMBINANTE HisMBP-KinStb16.

L'identification des sites de phosphorylation *in vitro* du domaine cytoplasmique recombinant de STB16 a été réalisée grâce à une analyse LC-MS/MS. La séquence couverte par les peptides identifiés à l'issue de l'analyse LC-MS/MS apparaît en gras. Les différentes régions du domaine cytoplasmique apparaissent en bleu (région juxta-membranaire), rose (domaine kinase, avec ses sous-domaines) et orange (région C-terminal). Le carré vert indique le motif RD du domaine kinase. Les carrés jaune foncé indiquent les sites de phosphorylation identifiés, les carrés jaune clair indiquent des sites de phosphorylation incertains.

RESULTATS

De précédents travaux sur les RLK ont démontré que de nombreux domaines cytoplasmiques recombinants exprimés en *E. coli* présentaient une kinase active constitutivement en l'absence de ligand (Braun and Walker, 1996; Oh et al., 2000; Mitra et al., 2015; Suzuki et al., 2016; Taylor et al., 2016). Ce système représente donc une méthode rapide et efficace pour identifier des sites de phosphorylation des kinases *in vitro*. Le domaine cytoplasmique de STB16 a ainsi été exprimé chez la bactérie *E. coli* avec un tag N-terminal histidine-MBP (« Maltose Binding Protein ») favorisant sa solubilité (Annexes au Chapitre 3). Après production, le domaine cytoplasmique recombinant de STB16 a été soumis à une digestion trypsique puis à une analyse en chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), afin d'identifier les peptides phosphorylés.

A l'issue de l'analyse LC-MS/MS, les peptides identifiés couvraient 76 % de la séquence du domaine cytoplasmique de STB16 (FIGURE 16). L'addition de chaque groupe phosphate cause une augmentation de 80 Daltons dans la masse moléculaire d'un peptide donné, comparé à un peptide non phosphorylé. Au total, au moins 18 évènements de phosphorylation *in vitro* ont pu ainsi être détectés et attribués à des résidus sérine (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y). Parmi eux, deux se situaient dans la région juxta-membranaire (Thr³³², Ser³⁵⁷), un dans chacun des sous-domaines I (Ser³⁶⁷), II (Ser⁴⁰⁰), V (Thr⁴⁵⁶), VIb (Ser⁴⁹⁵), VII (Ser⁵¹⁸), IX (Ser⁵⁴¹) et X (Ser⁵⁶⁸), quatre dans le sous-domaine VIII (Ser⁵²⁴, Thr⁵³¹, Tyr⁵³², Tyr⁵³⁴) et cinq dans la région C-terminale (Ser⁶³⁹, Ser⁶⁴¹, Tyr⁶⁵², Ser⁶⁷¹, Thr⁶⁷⁶). Sept autres potentiels évènements de phosphorylation (identifiés avec des paramètres de filtration de données moins restrictifs ou pour lesquels le spectre n'était pas lisible clairement) ont été identifiés dans la région juxta-membranaire (Ser³⁴⁸ et Ser³⁴⁹), dans le domaine kinase (Ser³⁹⁸, Ser⁵⁰⁸ et Thr⁵²⁵) et dans la région C-terminal (Ser⁶⁵³ et Ser⁶⁶⁵).

Afin de déterminer si les sites de phosphorylation *in vitro* identifiés dans le domaine cytoplasmique de STB16 étaient également phosphorylés chez d'autres RLKs impliquées dans l'immunité, un alignement du domaine cytoplasmique de STB16 avec les domaines cytoplasmiques de BRI1 (45% d'identité, RD kinase), BAK1 (41%, RD), Xa21 (33%, non-RD), EFR (35%, non-RD), FLS2 (32%, non-RD), CERK1 (34%, RD) et BIK1 (38%, RD) – dont les sites de phosphorylation ont été caractérisés *in vitro* et/ou *in vivo* – a été réalisé (FIGURE 17). Les résultats d'alignement ont indiqué que huit sites de phosphorylation du domaine cytoplasmique de STB16 étaient également phosphorylés *in vitro* et/ou *in vivo* chez au moins

STB16	-----RRKGGKANLNQA---A T NRPEEDALVWRL-----EKSSEFTL	353
BRI1	---KRRRKKAELEMY A EGHGN S GDR T ANN T NWK L TGVKEA-----LS-INLAAFEKPLRK	870
BAK1	-----WWRKKP--QD-----HFFDVPAAE-EDPEVHLGQLKR	276
Xa21	-----WHRKTKK-----GAP S R- T -- S M--KGHPL	695
EFR	-----WFMKRKKNN-----A S DGN P S-D- S -- T TLGMFHEK	699
FLS2	-----CCKKKEKKIEN-----SS---ESS-LPDLDSALKLKR	857
CERK1	---YRKNKSKG S F----- S S S I L P S T K ADHAS S T S L Q S GGLGGAGV S P G IAAISVDK S VE	309
BIK1	MGSCFSSRVKADIF--HNG-- K S ---SDLYGL S LSSRK S S S ----- T VAA A Q K T -EGELLS S T P V K S	54
STB16	FDF S EILHATHNF S KENLLGRGGFGVPYKGLQLPD-----EMEIAVKRLASH S GQ--GFIEFKNE	410
BRI1	L T FADLLQ A T N GFHND S L I G S GGFGDVYKAI LKD-----G S AVA I KK L I H V S GQ--G D REFMAE	927
BAK1	FSLRELQ V S DNFSNKNILGRGGFGKVKYKRLAD-----G T L V AVKRLKEERT Q G- G ELQ F Q T E	334
Xa21	V S Y SQ L V K A T D G FAPT N L L G S G S F G S V Y K G L N I Q-----D-H V AVK V L K L E N P K--AL K S F T A E	752
EFR	V S Y E L H S A T S R F S T N L I G S G N F G N V F K G L L G P E -----N K L V AV K V L N L L K H G --AT K S F M A E	757
FLS2	F E P K E L E Q A T D S F N S A N I G S S S L S T V Y K Q L E D -----G T V I AV K V L N L K E F S A E S D K W F Y T E	916
CERK1	F S L E E L A K A T D N F N L S F K I Q G G F G A V Y A E L R G E-----K A A I K K M D M E -----A S K Q F L A E	362
BIK1	F T F N E L K L A T R N F R P D S V I G E G G F G C V F K W L D E S T L T P T K P G T L V I A V K K L N Q E G F Q--G H R E W L T E	121
STB16	VELIAKLQHN N L V K L L G C C I Q G-----E E K V L V E Y L P N K S L D F F I D A N---R- T T L V D W K K R E I	468
BRI1	M E T I G K I K H R N L V P L L G Y C K V G -----D E R L L V E F M K Y G S L E D V L H D P K---K A G V K L N W S T R R K I	986
BAK1	V E M I S M A V H R N L R L R G F C M T P-----T E R L L V Y P M A N G S V A S C L R E R P ---E S Q P P L D W P K R Q R I	393
Xa21	C E A L R N M R H R N L V K I V T I C S S I D N R G N D F K A I V D F M P N G S L E D W I H P E T N D Q A D --Q R H L N L H R R V T I	819
EFR	C E T F K G I R H R N L V K L I T V C S S L D S E G N D F R A L V Y E F M P K G S L D M W L Q L E D L E R V N D H S R S L T P A E K L N I	826
FLS2	A K T L S Q L K H R N L V K I L G F A W E S ----G K T K A L V L P F M E N G N L E D T I H G S A -----A P I G S L L E K I D L	974
CERK1	L K V L T R V H H V N L V R L I G Y C V E G -----S L F L V E Y V E N G L Q H L H G S G -----R E P L P W T K R V Q I	418
BIK1	I N Y L Q L S H P N L V K L I G Y C L E D-----E H R L L V E F M Q K S L E N H L F R R G---A Y F K P L P W F L R V N V	180
STB16	IEG I A Q G L L L Y L H K H S R L R I I H R D L K A S N I L L D Q M N P K I S D F G L A K I F S S N D -----T E G S T K R V V G Y	532
BRI1	A I G S A R G L A F L H H N C S P H I I H R D M K S S N V L L D E N L E A R V S D F G M A R L M S A M D ----- T H L S V S T L A G T P	1050
BAK1	A L G S A R G L A Y L H D H C D P K I I H R D V K A A N I L L D E E F E A V G D F L A K L M D Y K D ----- T H V - T T A V R G T I	456
Xa21	L L D V A C A L D Y L H R H G P E P V V H C D I K S S N V L L D S D M V A H V G D F L A R I L V D G T--S L I Q S T S S M G F I G T I	887
EFR	A I D V A S A L E Y L H V H C H D P V A H C D I K P S N I L L D D L T A H V S D F L A Q L L Y K D R E S F L N Q F S S A G V R G T I	895
FLS2	C V H I A S G I D Y L H S G Y G F P I V H C D L K P A N I L L D S R V A H V S D F G T A R I L G F R E D G S --T T A S T S A F E G T I	1041
CERK1	A L D S A R G L E Y I H E H T V P V V H R D I K S A N I L I D Q K F R A K V A D F L T K L T E V G G-----S A T R G A M G T F	480
BIK1	A L D A A K G L A F L H S D--P V K V I Y R D I K A S N I L L D A D Y N A K L S D F L A R D G P M G D -----L S Y V S T R V M G T Y	243
STB16	G Y M A P E Y A S E G I Y S I K S D V S F G V L L L E I L S G K R N S G H F Q Y G D F --L N L L G Y S W Q L W E G G W L E L --L E	597
BRI1	G Y V P E Y Y Q S F R C S T K G D V Y S Y G V V L L E L L T G K R P T D S P D F G D N--N-L V G W V K Q H A K -L R I S D V --F D	1113
BAK1	G H I A P E Y L S T G S E K T D V F G Y G V M L L E L I T G Q R A F D L A R L A N D D D V M L L D W V K G L L K E K K L E A L--V D	523
Xa21	G Y A A P E Y G V L I A S T H G D I Y S Y G I L V L E I V T G K R P T D S T F R P D L --G L R Q Y V E L G L H--G R V T D V --V D	950
EFR	G Y A A P E Y G M G Q P S I Q G D V S F G I L L E M F S G K P T D E S F A G D Y --N L H S Y T K S I L S--G C T S -----	954
FLS2	G Y L A P E F A Y M R K V T T K A D V S F G I M M E L M T K Q R P T S L N D E D S Q--D M T L R Q L V E K S I G N R K G M V--R V	1107
CERK1	G Y M A P E T V Y--G E V S A K V D V Y A F G V V L Y E L I S A G A V K M T E A V G E F R G L V G V F E S F K E T D K E A L R K I	548
BIK1	G Y A A P E Y M S S G L N A R S D V S F G V L L L E I L S G K R A L D H N R P A K E --E N L V D W A R P Y L T S K R K V L L--I	307
STB16	V S I V K-----E I H--T T E A R R Y L N I A L M C V Q E N A D D R P T M S E V V A M L T S E S V I L P -----	645
BRI1	P E L M K-----E D P A L E I E L L Q H L K V A V A C L D D -----	1140
BAK1	V D L-----Q G N Y K D E E V E Q L I Q V A L L C T Q S S P M E R P K M S E V V R M L E G D G L A E R W E E W Q K E	578
Xa21	T K L I L D S E N W L N S T N S P C R R I T E C I V W L R L G L S C S Q E L P S R T P T G D I I D E L N A I K Q N L S G L F P V C E	1019
EFR	-----S G G S N A I D E G L R L V L Q V G I K C E E Y P R D R M R T D E A V R E L I S I R S K F F S S K T T I T	1008
FLS2	L D M E L G -----D S I V S L K Q E E A I E D F L K L C L F C T S S R P E D R D M N E I L T H L M K L R G K A N S -----	1162
CERK1	I D P R L-----G D S Y P D S V K M A E L G A C T Q E N A Q L R P S M R Y I V V A L S T L F S S T G--N W D V G	603
BIK1	V D N R L-----D T Q Y L P E E A V R M A S V A V Q L S F E P K S R P T M D Q V V R A L Q Q L Q D N L G -----	357
STB16	-----E P N H --P A -- Y S N L R V S K V H E S A S V V V C S N N D V T I T E E P D G R---	684
BRI1	-----	1140
BAK1	E M F R Q D F N P T H H --P A --V S G W I I G D -----S T S Q I E --N E Y P S G P R --	615
Xa21	G-----G-----S L E F -----	1025
EFR	E-----S P R D -A P Q S S P Q E W M L N T D M H T M -----	1031
FLS2	--F R E D R N E D R E V-----	1173
CERK1	N F Q N E D L V -----S L M S G R -----	617
BIK1	-----K P S Q T N P V --K D T K L G F-----K T G T K S E K R F T Q K P F R H L V	395

FIGURE 17. ALIGNEMENT DES DOMAINES CYTOPLASMIQUES DE STB16 ET D'AUTRES RLKS IMPLIQUEES DANS L'IMMUNITE.

L'alignement des domaines cytoplasmiques de STB16, de BRI1 (accession O22476), BAK1 (ac. Q94F62), Xa21 (ac. Q1MX30), EFR (ac. C0LGT6), FLS2 (ac. Q9FL28), CERK1 (ac. A8R7E6) et de la RLCK BIK1 (ac. O48814) a été réalisé avec Clustal Omega. Les carrés gris indiquent les résidus conservés entre au moins quatre (gris clair) ou sept/tous les domaines cytoplasmiques (gris foncé). Les sites d'auto- ou de trans-phosphorylation apparaissent en jaune (identifiés *in vitro*), bleu (identifiés *in vivo*) et vert (identifiés *in vitro* et *in vivo*). Les résidus soulignés indiquent des résidus fonctionnellement importants (validés fonctionnellement). Les étoiles rouges indiquent trois résidus (Ser⁵²⁴, Thr⁵³¹ et Tyr⁵³⁴) du sous-domaine VIII hautement conservés entre les kinases analysées. Les informations relatives aux sites de phosphorylation et leurs validations fonctionnelles sont issues de : BRI1 (Mittra et al., 2015; Oh et al., 2000, 2009, 2012; Wang et al., 2005; Wu et al., 2012), BAK1 (Perraki et al., 2018; Wang et al., 2005, 2008), Xa21 (Caddell et al., 2018; Chen et al., 2010; Xu et al., 2006), EFR (Bender et al., 2021; Macho et al., 2014), FLS2 (Cao et al., 2013; Robatzek et al., 2006), CERK1 (Gong et al., 2019; Petutschnig et al., 2010; Suzuki et al., 2016), BIK1 (Feng et al., 2012; Jiang et al., 2019; Lal et al., 2018; Lu et al., 2010; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2018).

l'un des domaines cytoplasmiques des autres kinases analysées. Parmi eux, les résidus Ser⁵²⁴, Thr⁵³¹ et Tyr⁵³⁴ du sous-domaine VIII sont hautement conservés entre les kinases analysées et constituent des sites de phosphorylation importants pour l'activité de certaines des kinases analysées puisqu'un changement de résidu sur ces sites a inhibé l'activité de la protéine en question (Wang et al., 2005, 2008; Robatzek et al., 2006; Oh et al., 2009; Suzuki et al., 2016; Jiang et al., 2019; Bender et al., 2021). Ce résultat suggère un rôle important de ces trois résidus pour l'activité kinase de STB16.

A l'inverse, certains résidus hautement conservés chez l'ensemble des kinases analysées dont STB16 - comme Thr³⁶³ et Tyr⁴⁷⁸ situés respectivement dans la région juxta-membranaire et dans le sous-domaine VIa du domaine cytoplasmique de STB16 – sont des sites de phosphorylation essentiels pour plusieurs des kinases analysées (Robatzek et al., 2006; Chen et al., 2010; Macho et al., 2014; Suzuki et al., 2016; Liu et al., 2018; Perraki et al., 2018), mais n'ont pas été phosphorylés *in vitro* chez STB16. Enfin, il est à noter que sur les dix sites de phosphorylation identifiés *in vitro* uniquement chez STB16, la moitié (Ser³⁵⁷, Ser⁶³⁹, Ser⁶⁴¹, Tyr⁶⁵² et Thr⁶⁷⁶) se situent dans les régions juxtaposées au domaine kinase, particulièrement dans la région C-terminale.

CONCLUSION

L'objectif de cet axe était d'identifier les sites de phosphorylation *in vitro* du domaine cytoplasmique de la protéine STB16 afin d'initier la caractérisation des mécanismes d'action de cette protéine. Les résultats ont montré qu'au moins 18 événements d'auto- et/ou de transphosphorylation (11 sur des résidus sérine, 4 sur des résidus thréonine et 3 sur des résidus tyrosines) avaient eu lieu *in vitro* dans les différentes régions du domaine cytoplasmique de STB16, ce qui suggère que la kinase de cette CRK pourrait être une Ser/Thr RD kinase fonctionnelle avec une préférence pour les résidus sérine. L'identification des sites de phosphorylation *in vitro* suggère également qu'à l'instar de plusieurs autres RLKs (Oh et al., 2009; Wu et al., 2012; Suzuki et al., 2016; Caddell et al., 2018), la kinase de STB16 pourrait se comporter comme une kinase à double spécificité, c'est-à-dire capable d'autophosphoryler des résidus Ser/Thr, mais également des résidus tyrosine.

Plusieurs sites de phosphorylation *in vitro* ont été identifiés dans le domaine catalytique de STB16. Plus particulièrement, l'alignement du domaine cytoplasmique de STB16 avec ceux d'autres kinases impliquées dans l'immunité a révélé que trois sites de phosphorylation dans le sous-domaine VIII de la kinase STB16 (Ser⁵²⁴, Thr⁵³¹ et Tyr⁵³⁴) étaient hautement conservés entre les kinases analysées, ainsi que chez de nombreuses autres LRR RLKs (Mitra et al., 2015). Ces trois résidus ont un intérêt particulier dans la mesure où l'activation de la plupart des kinases RD, dont fait partie STB16, dépend de l'autophosphorylation d'un à trois résidus situés dans la boucle d'activation du sous-domaine VIII – autophosphorylation qui entraîne un changement conformationnel nécessaire à l'établissement d'un état catalytique actif (Oh et al., 2009; Bender et al., 2021). Chez les RLKs BRI1, BAK1 et CERK1, qui comportent toutes trois un domaine kinase RD, la mutation de l'un de ces trois résidus réduit voire supprime presque entièrement l'activité kinase de la RLK (Wang et al., 2008; Oh et al., 2009; Suzuki et al., 2016). Ces données suggèrent ainsi que l'activité kinase de STB16 pourrait dépendre de l'autophosphorylation de ces trois résidus.

Le résidu Tyr⁴⁷⁸ du sous-domaine catalytique VIa de STB16 est conservé chez une majorité des LRR RLKs étudiées (BAK1, Xa21, EFR et FLS2) et plus largement chez 80 % des LRR RLKs d'*A. thaliana* (Perraki et al., 2018). La phosphorylation de ce résidu conservé, noté Tyr-VIa, a été décrite comme essentielle pour la fonction des LRR RLK (Macho et al., 2014; Perraki et al., 2018). Plusieurs autres RLKs non LRR, dont CERK1 ou LORE, requièrent la phosphorylation de ce résidu Tyr-VIa pour l'activation des réponses induites par liaison avec leurs ligands (Suzuki et al., 2016; Liu et al., 2018; Luo et al., 2020). Il a ainsi été suggéré que

ce résidu avait une fonction conservée importante pour l'immunité chez les RLKs avec diverses architectures de domaines extracellulaires (Bender et al., 2021; DeFalco and Zipfel, 2021; Mühlenbeck et al., 2021). Ce résidu Tyr-VIa ne fait cependant pas partie des sites de phosphorylation identifiés *in vitro* pour le domaine cytoplasmique de STB16. Sous réserve que la phosphorylation de ce résidu ne se confirme pas *in vivo*, cela suggérerait un mécanisme d'activation des réponses médié par STB16 différent de celui des RLKs étudiées jusqu'à présent.

Les sites de phosphorylation situés dans les régions juxta-membranaires et C-terminale ont des rôles critiques dans la régulation de l'activité des kinases et/ou dans leurs spécificités de signalisation. Ces sites permettraient en effet de créer des sites d'ancrage pour des partenaires cytoplasmiques spécifiques en aval dans les voies de signalisation des RLKs, ou de moduler l'activité catalytique de ces kinases envers leurs partenaires cytoplasmiques (Oh et al., 2000; Wang et al., 2005; Mitra et al., 2015). Par exemple, la mutation du résidu phosphorylé Thr⁷⁰⁵ situé dans la région juxta-membranaire du domaine cytoplasmique de Xa21 résulte en une incapacité de cette RLK à lier quatre de ses partenaires cytoplasmiques (XB3, XB15, XB24 et XB10) (Chen et al., 2010). La mutation de ce même résidu chez FLS2 impacte sa réponse à l'éliciteur de défense flg22 (Robatzek et al., 2006). Plus récemment, plusieurs sites de phosphorylation du domaine cytoplasmique de BAK1 ont été montrés comme formant un phosphocode requis pour la fonction de BAK1 dans l'immunité, mais pas pour sa fonction dans la voie de signalisation des brassinostéroïdes (Perraki et al., 2018; Wu et al., 2018). Parmi ces sites de phosphorylation responsables de la spécificité de signalisation de BAK1, plusieurs ont été identifiés dans la région C-terminale du domaine cytoplasmique de BAK1. Les sites de phosphorylation identifiés *in vitro* présents dans les régions juxta-membranaire et C-terminale du domaine cytoplasmique de STB16, à savoir Thr³³², Ser³⁵⁷, Ser⁶³⁹, Ser⁶⁴¹, Tyr⁶⁵², Ser⁶⁷¹ et Thr⁶⁷⁶, pourraient ainsi constituer des résidus d'intérêt pour l'étude de la régulation et de la spécificité de signalisation de STB16. Enfin, il est à noter que le résidu Thr³⁶³ situé dans la région juxta-membranaire de STB16 est conservé à la même position chez la plupart des domaines cytoplasmiques de protéines analysées ci-dessus. Si ce résidu est un site de phosphorylation pour les LRR-RLKs BRI1, BAK1, Xa21, EFR, FLS2 et la RLCK BIK1 et est important pour le rôle de Xa21 et FLS2 dans l'immunité (Robatzek et al., 2006; Chen et al., 2010), il n'a pas été identifié comme site phosphorylé pour la LysM-RLK CERK1 ou la CRK STB16. Ces observations suggèrent que la fonction de ce résidu serait importante pour l'activité des LRR RLKs mais pas pour celle d'autres RLKs avec différents domaines extracellulaires.

Dans l'ensemble, bien que l'identification des sites de phosphorylation *in vitro* nous fournissent une première indication concernant les mécanismes d'activation de la kinase STB16 et constituent un outil précieux pour l'approfondissement de l'analyse fonctionnelle *in vitro* et pour l'optimisation des paramètres pour les spectrométries de masse à venir (Mitra et al., 2015), l'identification des sites de phosphorylation *in vitro* d'une « dead » kinase STB16 (afin de distinguer les événements d'autophosphorylation de ceux de transphosphorylation), l'identification et la caractérisation fonctionnelle des sites de phosphorylation *in vivo* en réponse à *Z. tritici* ainsi que l'identification des partenaires cytoplasmiques de STB16 sont en définitive nécessaires à la compréhension complète du mécanisme d'activation, de la régulation et de la spécificité de STB16.

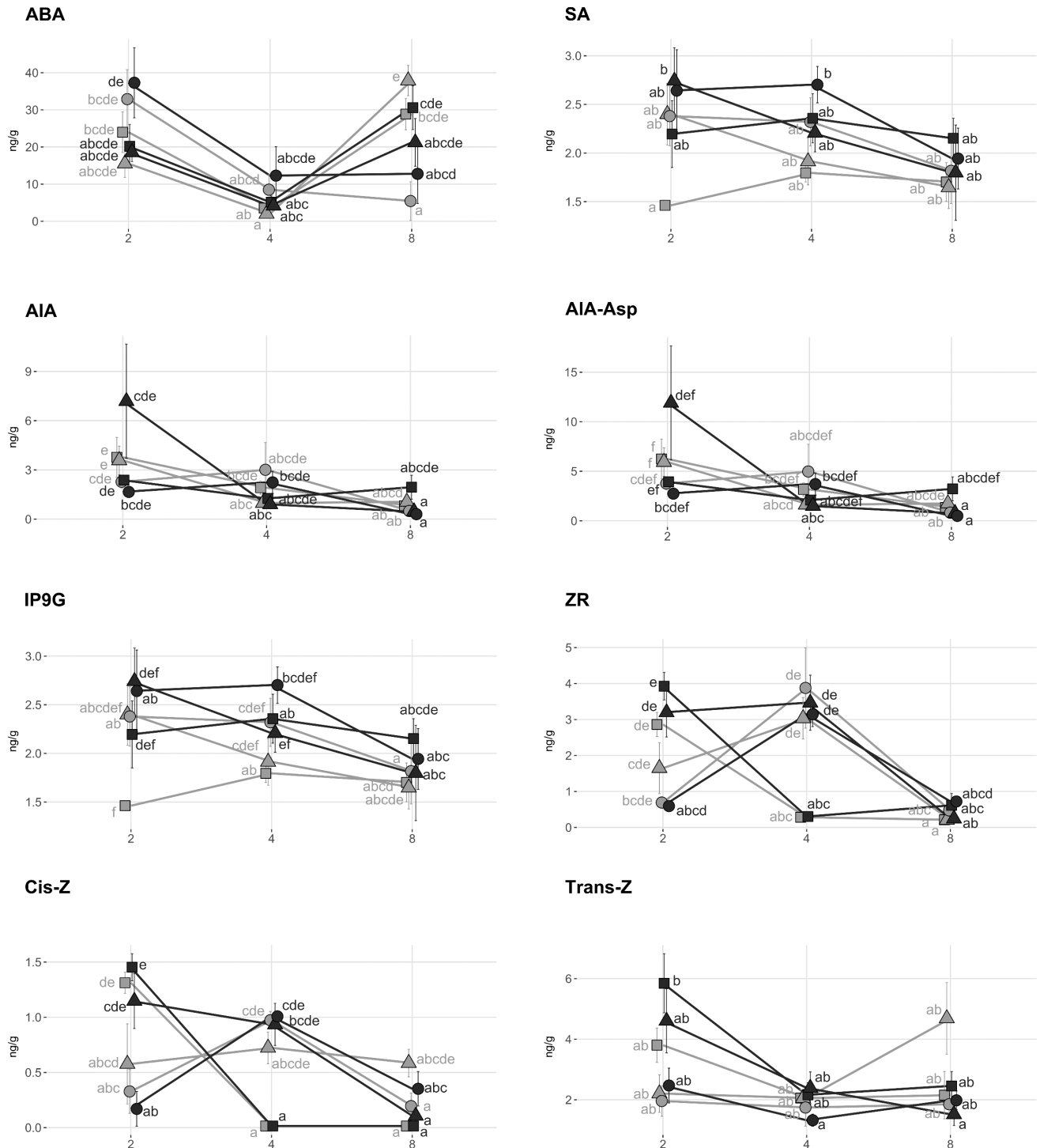


FIGURE 18. QUANTIFICATION DES PHYTOHORMONES AU COURS DE LA CINÉTIQUE D'INFECTION DE *Z. TRITICI* SUR LES NILS *Stb16q*.

La NIL^{Stb16q} (noir) et la NIL^{stb} (gris) ont été inoculées avec une solution contrôle [eau/Tween-20, 0.05% (v/v) ; ronds], l'isolat virulent CFZ008 (carrés) ou l'isolat avirulent IPO9415 (triangles). Huit phytohormones ont été détectées et quantifiées par spectrométrie de masse (LC-MS) à 2, 4 et 8 jours post-inoculation. ABA = Acide abscissique, SA = Acide salicylique, AIA = Auxine, AIA-Asp = Auxine-Aspartate, IP9G = Isopentenyl adénine 9 glucoside (Cytokinine), ZR = Zéatine riboside (Cytokinine), Cis-Z = cis Zéatine (Cytokinine), Trans-Z = trans Zéatine (Cytokinine). Les valeurs représentent les moyennes ± ESM ($n = 6$). Différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (ART anova, $p < 0.05$).

AXE 3 – LES REPONSES DE DEFENSES

La perception d'un agent pathogène et l'activation consécutive d'une voie de signalisation spécifique conduit à l'activation de réponse de défenses, dont le rôle est d'empêcher la pénétration et/ou la propagation de l'agent pathogène dans les tissus de la plante ([Introduction – Section 2](#)). L'objectif de cet axe a donc été d'identifier les réponses de défense médiées par STB16 et susceptibles d'être impliquées dans l'arrêt de *Z. tritici*.

Les réponses de défenses induites par une plante sont souvent multiples et diversifiées, allant du renforcement des parois cellulaires à la production de divers composés toxiques par exemple. À partir de la littérature et des résultats précédents, plusieurs hypothèses ont été émises quant à celles qui pourraient être induites par STB16 :

- Une première hypothèse est qu'à l'instar des CRRSPs Gnk2 et AFP1 ([Miyakawa et al., 2014; Ma et al., 2018](#)) et de la protéine TaCRK3 ([Guo et al., 2021; Wu et al., 2021](#)), STB16 pourrait avoir une activité antifongique portée par ses domaines extracellulaires ([Article de revue](#)). Notre stratégie pour tester cette hypothèse était de réaliser un test d'inhibition de croissance fongique *in vitro* en utilisant les domaines 2xDUF26 recombinants de STB16. Les différents essais de production des domaines 2xDUF26 en système hétérologue conduit lors de l'axe 1 n'ont pas conduit à l'obtention de domaines correctement repliés. Cette hypothèse n'a donc pas encore pu être vérifiée.
- Plusieurs CRKs de la plante modèle *A. thaliana* ont été associées à la régulation de l'immunité stomatique en réponse aux IMs flg22 et chitine ([Article de revue](#)). Compte tenu du stade d'arrêt majeur de *Z. tritici* au niveau des stomates durant des interactions incompatibles avec le NIL^{Stb16q} (Chapitres 1-2), une deuxième hypothèse est que la protéine STB16 induirait une fermeture stomatique empêchant l'agent pathogène de pénétrer dans les feuilles de blé. Pour tester cette hypothèse, un suivi de l'ouverture stomatique au cours de la cinétique d'infection a été réalisé à l'aide d'une technique d'empreintes de feuilles.
- Enfin, une analyse métabolomique a été conduite sur les NILs *Stb16q* dans le but d'identifier des phytohormones et/ou des métabolites secondaires impliqués dans la résistance médiée par *Stb16q*. Cette analyse a été menée en collaboration avec la plateforme MetaboHub – MetaToul – AgromiX de l'UMR LRSV à Toulouse, spécialisée dans les processus d'adaptation des plantes à leur environnement et dans les mécanismes de signalisation cellulaire.

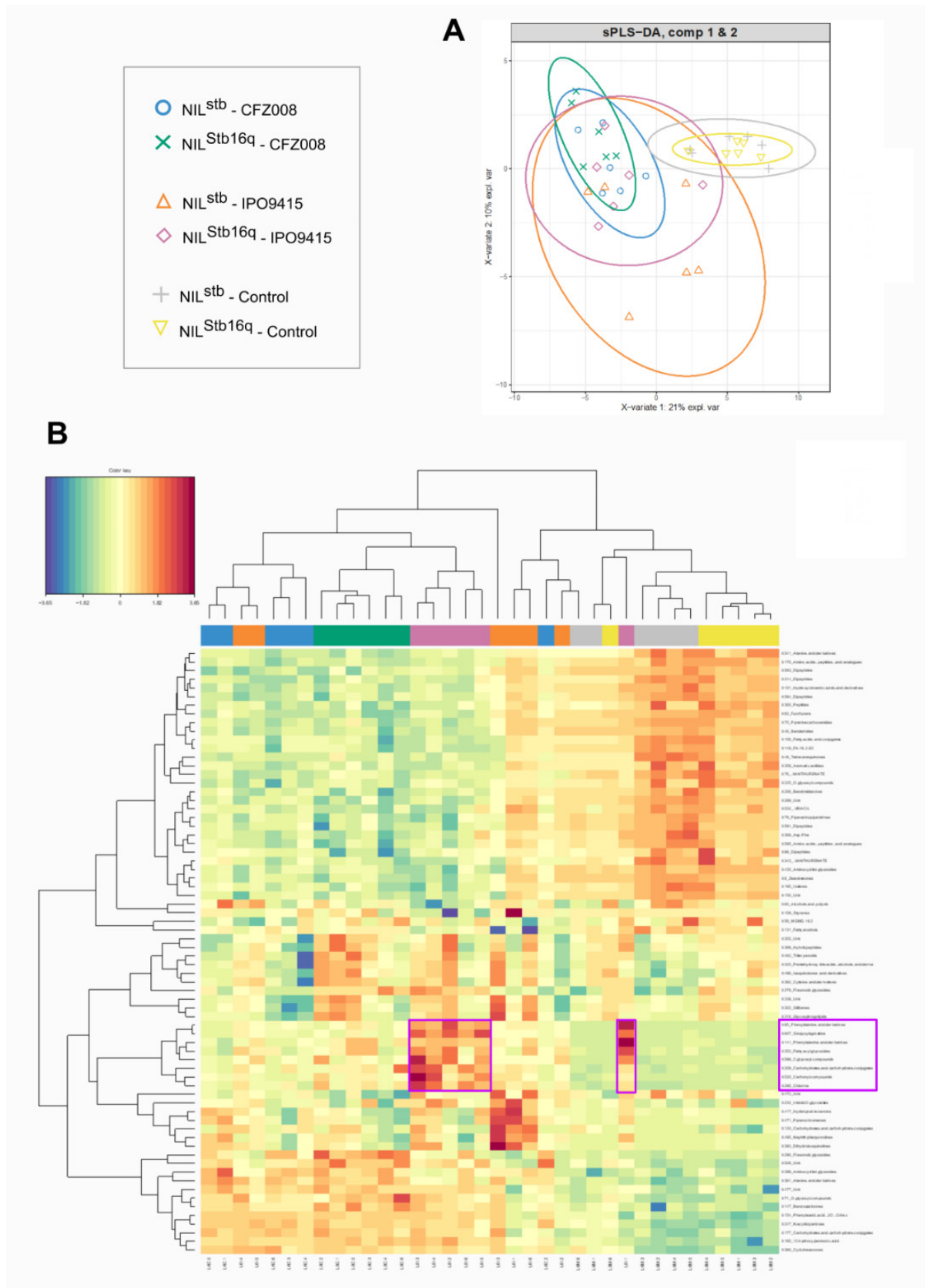


FIGURE 19. ANALYSE GLOBALE DES VARIATIONS DU METABOLOME DES NILS *STB16Q* AU COURS DE LA CINETIQUE D'INFECTION PAR *Z. TRITICI*.

(A) Analyse sPLS-DA avec sélection des 70 métabolites détectés par LC-MS les plus discriminants entre les groupes. Les pentes de variations d'abondance de métabolites au cours de la cinétique (2, 4 et 8 jpi) ont été utilisées pour l'analyse. **(B)** Analyse par heatmap des 70 métabolites. La heatmap a été générée à partir de l'analyse sPLS-DA. Les lignes représentent les métabolites et les colonnes les échantillons biologiques. Le rouge et le bleu indiquent des métabolites induits et réprimés respectivement au cours de la cinétique d'infection.

RESULTATS

FERMETURE STOMATIQUE

Les résultats de l'analyse de l'ouverture stomatique sont présentés dans l'article « *Blocked at the stomatal gate, a key step of wheat *Stb16q*-mediated resistance to *Zymoseptoria tritici** » du Chapitre 1 de ce manuscrit, avec pour conclusion majeure que *Stb16q* induit une fermeture stomatique précoce et transitoire uniquement dans le cas d'une interaction incompatible, ce qui pourrait suggérer un rôle de cette réponse de défense dans l'arrêt de l'agent pathogène.

DETECTION DES PHYTOHORMONES

Une analyse métabolomique ciblée sur certaines phytohormones a été réalisée par spectrométrie de masse à 2, 4 et 8 jpi à partir de feuilles de NIL^{stb} et NIL^{Stb16q} inoculées avec une solution contrôle, avec l'isolat CFZ008 virulent sur *Stb16q* ou avec l'isolat IPO9415 avirulent sur *Stb16q*. Sur 23 phytohormones testées, seules 8 ont été détectées dans nos échantillons (FIGURE 18). L'accumulation de la majorité des phytohormones détectées au cours de la cinétique a été globalement similaire entre les NILs *Stb16q* inoculées avec *Z. tritici* ou avec la solution contrôle, à l'exception de deux cytokinines (Zéatine riboside et Cis-Zéatine), dont l'accumulation a diminué plus précocement à 4 jpi pour les interactions NIL^{stb} × CFZ008 et NIL^{Stb16q} × CFZ008, suggérant une réponse isolat-spécifique. Ces résultats suggèrent que jusqu'à 8 jpi, la présence de *Z. tritici* d'une part, et le type d'interaction (compatible ou incompatible) d'autre part, ont peu d'impact sur l'accumulation de ces phytohormones à l'échelle de la feuille.

METABOLOMIQUE NON CIBLEE

Une analyse métabolomique non ciblée a été réalisée sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour l'analyse des phytohormones. Au total, 614 composés ont été détectés. Une analyse sPLS-DA a été conduite à partir des pentes de variations d'abondance des métabolites sur les trois points de cinétique et en sélectionnant les 70 métabolites les plus discriminants entre les différents groupes sur l'ensemble de la cinétique (FIGURE 19.A). Cette analyse a révélé que l'inoculation des NILs par *Z. tritici* avait un effet sur le métabolome de la feuille, avec une légère discrimination entre les NILs inoculées avec la solution contrôle et celles inoculées avec *Z. tritici*. Bien que le traitement avec l'isolat avirulent IPO9415 ait provoqué une réponse plus variable que celui avec l'isolat virulent CFZ008 ou avec la solution contrôle, le métabolome globale des deux lignées testées était en revanche dans l'ensemble similaire au cours de la cinétique d'infection quel que soit le traitement. Parmi les 70 métabolites sélectionnés, 9 ont

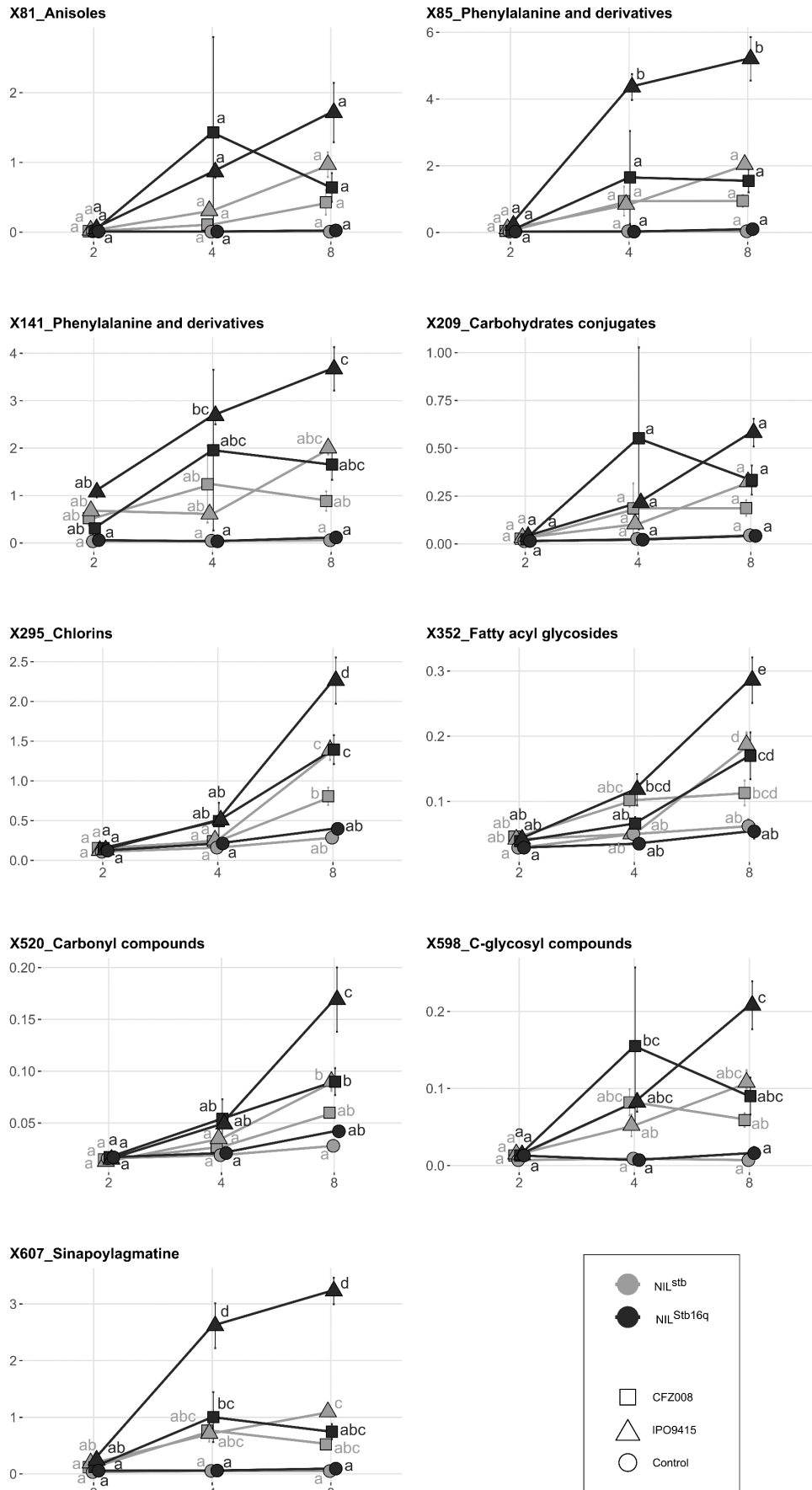


FIGURE 20. VARIATIONS D'ABONDANCE DE 9 MÉTABOLITES AU COURS DE LA CINÉTIQUE D'INFECTION DE *Z. TRITICI* SUR LES NILS *STB16Q*.

Variations d'abondance à 2, 4 et 8 jpi de 9 métabolites des NIL^{Stb} (gris) et NIL^{Stb16q} (noir) inoculées avec une solution contrôle (ronds), l'isolat virulent CFZ008 (carrés) ou l'isolat avirulent IPO9415 (triangles). Différentes lettres indiquent des valeurs significativement différentes (anova, $p < 0.05$).

été accumulés cependant plus fortement au cours de la cinétique pour l'interaction $\text{NIL}^{\text{Stb16q}} \times \text{IPO9415}$ par rapport aux autres interactions (**FIGURE 19.B**).

L'expression de ces neuf métabolites a été analysée individuellement au cours de la cinétique (**FIGURE 20**). Ces métabolites se sont accumulés globalement plus fortement dès 4 jpi (X81, X85, X141, X209, X598, X607) ou 8 jpi (X295, X352, X520) chez les NILs *Stb16q* inoculés avec *Z. tritici* comparées aux NILs contrôles, suggérant qu'ils font partis d'une réponse commune à l'infection par *Z. tritici*. Dans l'ensemble, ces métabolites se sont accumulés plus fortement à 8 jpi pour l'interaction $\text{NIL}^{\text{Stb16q}} \times \text{IPO9415}$ comparée aux interactions compatibles $\text{NIL}^{\text{Stb16q}} \times \text{CFZ008}$, $\text{NIL}^{\text{stb}} \times \text{CFZ008}$ et $\text{NIL}^{\text{stb}} \times \text{IPO9415}$, bien que cela n'ait été significatif que pour cinq d'entre eux (X85, X295, X352, X520, X607). Parmi eux, deux (X85 et X607) se sont déjà accumulés fortement et significativement (3 à 4 fois plus) dès 4 jpi pour l'interaction $\text{NIL}^{\text{Stb16q}} \times \text{IPO9415}$ comparée aux interactions compatibles. Ces résultats suggèrent que, si les neuf métabolites, accumulés plus fortement chez les NILs infectés comparés aux contrôles, font partis d'une réponse commune à l'infection, cette réponse semble plus intense et/ou plus précoce dans le cas de l'interaction incompatible, particulièrement au regard des composés X85 et X607. L'annotation de ces métabolites n'a permis de n'identifier que leur classe chimique (annotation de classe 3), à l'exception du métabolite X607, qui a pu être annoté de classe 2 (à l'isomère près) et correspond au sinapoylagmatine.

CONCLUSION

L'objectif de cet axe était d'identifier les réponses de défense physiologiques et moléculaires induites par la protéine STB16 et responsables de la résistance. Dans un premier temps, l'observation du comportement stomatique a montré que les stomates de la NIL^{Stb16q} se fermaient de façon précoce et transitoire en réponse à un isolat avirulent de *Z. tritici* tandis que l'ouverture des stomates des NILs *Stb16q* lors d'interactions compatibles n'était pas impactée. Ces résultats sont discutés dans l'article du Chapitre 1. Dans un second temps, les analyses de phytohormones et de métabolomique non ciblée n'ont pas permis une discrimination nette des différentes interactions testées sur l'ensemble de la cinétique étudiée, suggérant que les huit phytohormones détectées ainsi que le métabolome globale des NIL^{stb} et NIL^{Stb16q} ne différaient pas significativement en réponse à *Z. tritici* durant les stades précoces de l'infection (< 8 jpi) à l'échelle de la feuille. Des différences notables dans le métabolome des NIL^{stb} et NIL^{Stb16q} durant les interactions compatibles et l'interaction incompatible ont toutefois été observées à 8 jpi, avec neuf métabolites plus fortement accumulés lors de l'interaction incompatible. Parmi ces neuf métabolites, deux ont été spécifiquement accumulés dès 4 jpi chez la NIL^{Stb16q} inoculée avec l'isolat avirulent, dont l'un est le sinapoylagmatine.

Le sinapoylagmatine est un amide d'acide hydroxycinnamique (« Hydroxycinnamic acid amide », HCAA). Les HCAA sont des dérivés de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Vogt, 2010; Fraser and Chapple, 2011). Au vu de leur classe chimique (Phénylalanine et dérivés), il est probable que les métabolites X85 et X141 intègrent la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ou les voies de biosynthèse dérivées également (Vogt, 2010; Liu et al., 2022a). Le métabolite X598 est un composé C-glycosylé. Or, chez les céréales, les composés les plus couramment C-glycosylés sont les flavonoïdes (Brazier-Hicks et al., 2009), eux aussi intégrant une voie de biosynthèse dérivée de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Vogt, 2010). Enfin, de façon plus spéculative, le métabolite X352, en tant que glycosides d'acyl gras, pourrait être un précurseur dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Vogt, 2010; Fraser and Chapple, 2011; Liu et al., 2022a). Cinq des sept composés différenciellement accumulés lors de l'interaction incompatible pourraient donc appartenir à la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ou des voies dérivées.

Les phénylpropanoïdes et leurs dérivés, incluant les HCAAs et les flavonoïdes, représentent un large groupe de métabolites secondaires largement utilisés par les plantes comme arsenal de défenses. Plusieurs études ont ainsi révélé un rôle important de ces métabolites dans la

résistance contre les agents pathogènes fongiques (Carver et al., 1994a, 1994b; Kruger et al., 2002; Del Mar Rojas-Molina et al., 2007; Boubakri et al., 2013; Karre et al., 2017; Novo et al., 2017; Ranjan et al., 2019; Ube et al., 2019). A titre d'exemple, l'inhibition de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, par inhibition chimique d'enzymes clé de cette voie, conduit à une perte drastique de résistance à la pénétration de la fève contre *Uromyces viciaefabae* (Del Mar Rojas-Molina et al., 2007) et de plusieurs céréales contre les oïdiums (Carver et al., 1994a, 1994b; Kruger et al., 2002). Chez le blé, l'importance des phénylpropanoïdes et de leurs dérivés dans les défenses a également été suggérée à plusieurs reprises (Samborski and Rohringer, 1970; Gunnaiah et al., 2012; Ube et al., 2019; Atta et al., 2020; Liu et al., 2022b; Whitney et al., 2022), et notamment dans le cas d'interactions avec *Z. tritici*. Une étude métabolomique comparative a en effet montré que les voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes, des flavonoïdes et des HCAAs étaient différentiellement surrégulées localement à 4 et 8 jpi dans le cas de l'interaction incompatible entre l'isolat de *Z. tritici* IPO323 et le cultivar de blé Chinese Spring, en comparaison avec l'interaction compatible entre *Z. tritici* IPO323 et le cultivar Obelisk (Seybold et al., 2020b). Dans deux autres études métabolomiques évaluant l'impact de deux éliciteurs de défense sur le pathosystème blé / *Z. tritici*, une forte accumulation d'HCAAs a été observée suite à l'application des éliciteurs. Il a été suggéré que ces HCAAs pourraient participer à la résistance contre *Z. tritici* (de Borba et al., 2021, 2022). De façon intéressante, le sinapoylagmatine a été identifié dans ces trois études comme faisant partie des HCAAs fortement accumulés.

Les phénylpropanoïdes et leurs dérivés ont des rôles variés dans les défenses. Certains agissent comme des molécules de signalisation, d'autres, comme les flavonoïdes ou les stilbènes, agissent comme des phytoalexines ou des phytoanticipines tandis que d'autres encore, comme la lignine, constituent des barrières physiques contre les agents pathogènes (Dixon et al., 2002; Naoumkina et al., 2010; Yadav et al., 2020). Les HCAAs sont eux principalement connus pour leurs rôles antifongiques directs et leurs rôles dans le renforcement des parois cellulaires (Liu et al., 2022a). Les HCAAs ont également été identifiés pour leur contribution à l'immunité stomatique (Liu et al., 2022a). Par exemple, plusieurs HCAAs se sont révélés être des inhibiteurs de l'ouverture stomatique chez *Commelina communis*, et parmi eux, l'acide sinapique, un des précurseurs possible du sinapoylagmatine (Liu et al., 2022a), induit même une forte fermeture stomatique lorsqu'appliqué de façon exogène (Plumbe and Willmer, 1986).

Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que l'accumulation d'HCAAs et particulièrement de sinapoylagmatine, voire d'autres phénylpropanoïdes ou dérivés, pourrait

faire partie des mécanismes de défenses médiés par *Stb16q* contre *Z. tritici*. Réaliser une analyse métabolomique ciblée sur la voie des phénylpropanoïdes et les voies dérivées pourrait s'avérer pertinente pour identifier d'autres métabolites de ces voies potentiellement impliqués dans l'interaction incompatible impliquant *Stb16q* et étudier précisément leurs cinétiques d'accumulation au cours de l'infection. Des analyses fonctionnelles approfondies seraient également nécessaires pour évaluer le rôle des HCAAs, et plus particulièrement du sinapoylagmatine, sur la fermeture stomatique chez le blé ainsi que leur activité antifongique sur *Z. tritici*.

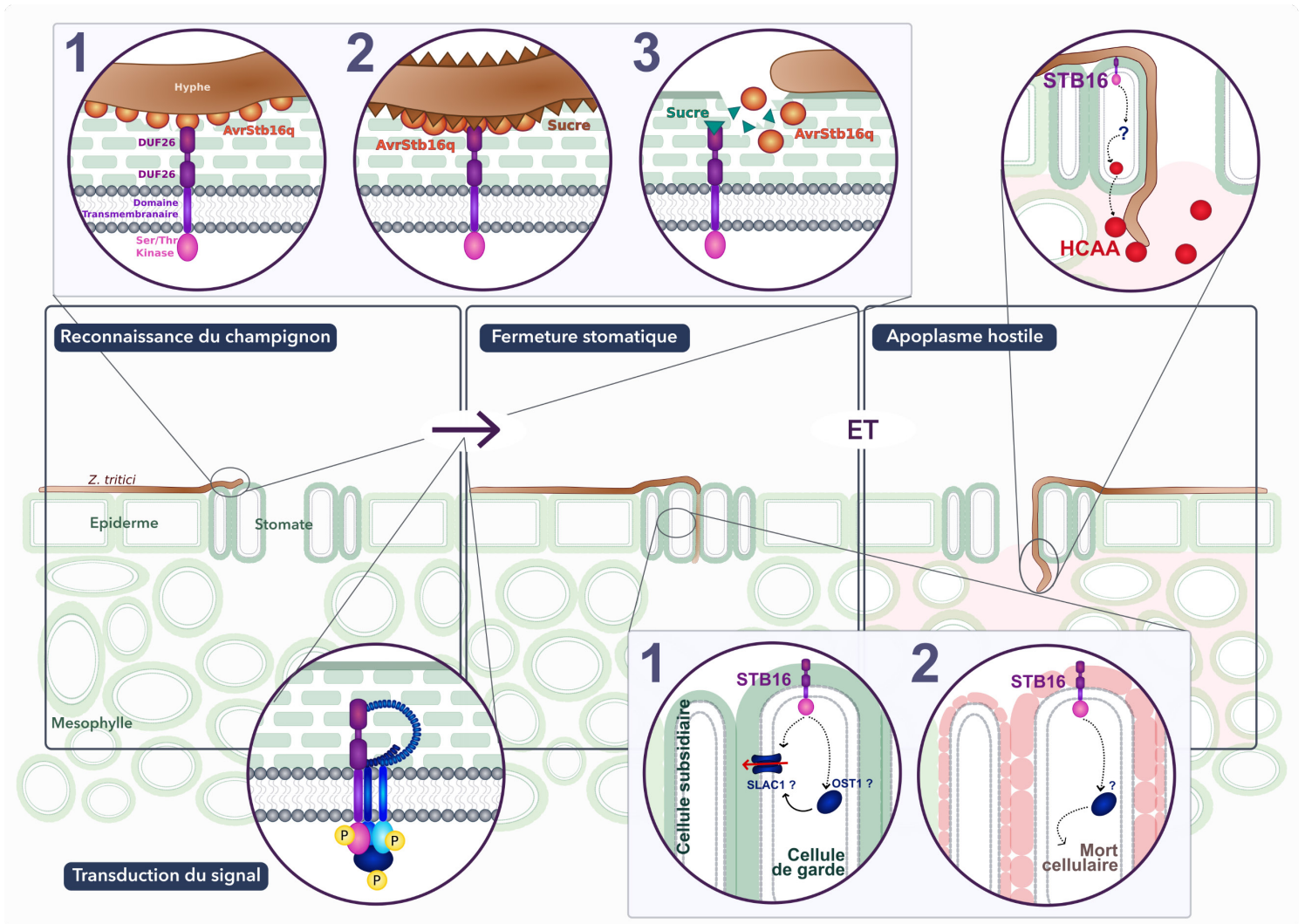


FIGURE 21. MODELE DU MECANISME DE RESISTANCE MEDIE PAR LE GENE *STB16Q*.

La reconnaissance de *Z. tritici* par STB16 se fait au niveau du stomate selon trois scénarios plausibles : 1. STB16 reconnaît par liaison direct un groupement glucidique de l'AvrStb16q présent dans la paroi de *Z. tritici* ou dans une matrice extracellulaire ; 2. AvrStb16q masque un composé glucidique (sucre) de la paroi de *Z. tritici* et STB16 reconnaît le complexe formé par AvrStb16q et le composé glucidique ; 3. STB16 reconnaît un composé glucidique (sucre) issu de la dégradation de la paroi végétale par AvrStb16q. Suite à la reconnaissance de *Z. tritici*, STB16 intègre un complexe immunitaire avec des partenaires membranaires et cytoplasmiques, dans lequel des évènements d'auto- et de transphosphorylation ont lieu et conduisent à l'activation de deux réponses de défenses, la fermeture stomatique et la génération d'un environnement apoplasmique hostile, qui arrêtent *Z. tritici* durant sa pénétration dans le stomate ou dans la cavité sous-stomatique respectivement. Deux mécanismes physiologiques possibles conduisent à la fermeture stomatique : 1. STB16 active directement, ou indirectement *via* des voies de signalisations connues (avec OST1 par exemple), des canaux anioniques (comme SLAC1) situés dans les cellules de garde, ce qui modifie la turgescence des cellules de garde ; 2. STB16 active, par des mécanismes inconnus, la mort cellulaire des cellules de garde. En parallèle, STB16 active, par des mécanismes inconnus, la production d'amide d'acide hydroxycinnamique (HCAA) (comme le sinapoylagmatine) qui ont un effet antifongique direct ou indirect (*via* la production de ROS) sur *Z. tritici*.

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ce travail de Thèse était de caractériser le mécanisme de résistance contrôlé par le gène *Stb16q*, en déterminant plus particulièrement le stade d'arrêt précis de *Z. tritici* au cours de sa pathogénèse (« quand »), les moyens mis en œuvre par la plante (« comment ») et leurs lieux d'action au sein de la plante (« où »). Nous avons ainsi démontré pour la première fois que durant l'interaction incompatible avec un blé portant le gène *Stb16q*, un isolat avirulent de *Z. tritici* était principalement arrêté lors de sa pénétration au niveau du stomate. Ce résultat majeur, combiné à l'ensemble des données acquises durant ces travaux, permet de discuter, dans un premier temps, le mécanisme de résistance médié par *Stb16q* autour d'un modèle. Les travaux conduits au cours de cette Thèse ont également permis l'identification du stade et du lieu d'arrêt de *Z. tritici* lors d'interactions incompatibles avec des blés portant les gènes *Stb5*, *Stb6*, *Stb7* et *Stb9*. Ces résultats permettent, dans un second temps, de discuter la diversité des mécanismes de résistance à la septoriose en proposant une généralisation du modèle de la résistance médiée par *Stb16q* à l'ensemble des résistances médiées par les gènes *Stb*.

VERS UN MODELE DE LA RESISTANCE MEDIEE PAR LE GENE *STB16Q*

Le mécanisme de défense d'une plante conduisant à l'arrêt d'un agent pathogène repose sur trois processus chronologiques, à savoir la reconnaissance de l'agent pathogène, la transduction du signal et la mise en place de réponses de défenses efficaces (Introduction - Section 2). Les données obtenues au cours de ces travaux, mises au regard des études bibliographiques réalisées dans la partie Introductive de ce manuscrit et dans l'article de revue, nous permettent d'appréhender chacun de ces trois processus dans le cadre du mécanisme de résistance d'un blé portant le gène *Stb16q* contre l'agent pathogène *Z. tritici* (FIGURE 21).

LA RECONNAISSANCE DE *Z. TRITICI*

UNE RECONNAISSANCE PRECOCE DE L'AGENT PATHOGENE EST ESSENTIELLE LORS DES INTERACTIONS INCOMPATIBLES

Les travaux conduits au cours de cette Thèse ont démontré que le stade et le lieu d'arrêt majeurs d'un isolat avirulent de *Z. tritici* en interaction avec la NIL^{Stb16q} étaient la pénétration et le stomate (Chapitre 1). Une implication de ce résultat est que la reconnaissance de *Z. tritici* par *Stb16q* a lieu très tôt durant sa pathogénèse, durant les étapes pré-pénétration au niveau des cellules épidermiques ou durant l'étape de pénétration au niveau des stomates.

Plusieurs éléments viennent supporter l'hypothèse d'une reconnaissance précoce qui serait spécifiquement médiée par les stomates. D'une part, les cellules de garde composant les stomates sont des cellules hautement spécialisées, capables d'intégrer une multitude de signaux complexes et de les transformer en réponses adaptées au signal perçu (David et al., 2019). Ces cellules ont ainsi été associées à de nombreuses reprises à l'immunité des plantes, particulièrement contre des agents pathogènes utilisant le stomate comme mode de pénétration. Les cellules de garde sont par exemple impliquées dans la perception des agents pathogènes bactériens au moyen de RLKs, comme FLS2, SIF2 ou LecRK-V.5, toutes trois surexprimées au sein de ces cellules en réponse à l'infection (Desclos-Theveniau et al., 2012; Beck et al., 2014; David et al., 2019; Chan et al., 2020). Un tel processus de reconnaissance précoce localisé au niveau des stomates a été suggéré également lors d'interactions incompatibles dans les pathosystèmes *C. fulvum* / tomate et *L. maculans* / colza. Dans le pathosystème *C. fulvum* / tomate, les cellules de garde d'une plante portant le gène majeur de résistance *Cf-2* sont les premières à présenter des signes de HR en réponse à l'invasion d'un isolat avirulent du champignon (Wit, 1977; Hammond-Kosack, 1994) et les auteurs ont suggéré que des défenses précoces étaient initiées par la reconnaissance du champignon au niveau des cellules de garde (Wit, 1977). Dans le pathosystème *L. maculans* / *B. juncea*, la reconnaissance précoce du champignon est reflétée par une mort cellulaire rapide des cellules de garde, qui est le seul mécanisme de résistance observé lors de l'interaction incompatible (Chen and Howlett, 1996). D'autre part, une particularité des stomates chez les plantes monocotylédones comme le blé est qu'ils sont composés, en plus des cellules de garde, de deux cellules latérales supplémentaires : les cellules subsidiaires (Nunes et al., 2019). Les cellules subsidiaires diffèrent des autres cellules de l'épiderme en termes de morphologies voire d'identités moléculaires (Rudall et al., 2013) et, chez le blé, sont capables de reconnaître et de répondre spécifiquement à l'invasion de *Z. tritici* au moment de sa pénétration dans la feuille (Valente et al., 2022). Enfin, bien que des événements de reconnaissance et de réponses précoces au niveau des cellules épidermiques aient également été décrits dans d'autres pathosystèmes, ils concernent majoritairement les résistances non-hôte et les agents pathogènes filamenteux avec un mode de pénétration directe (Zierold et al., 2005; Hardham et al., 2008; Lipka et al., 2008; Irieda, 2022). En outre, aucune différence de développement de *Z. tritici* entre les NIL *Stb16* n'a été observé avant que le champignon n'atteigne les stomates, suggérant que l'épiderme n'est pas impliqué dans la résistance. Tous ces éléments pris dans leur ensemble suggèrent que le processus de reconnaissance précoce de *Z. tritici* par *Stb16q* a lieu spécifiquement à la surface du stomate, au niveau des cellules de garde et/ou des cellules subsidiaires (FIGURE 21). Déterminer la

localisation et le degré d'expression tissulaire et cellulaire de STB16 permettrait de conforter cette hypothèse.

Lors de l'interaction incompatible entre la NIL^{Stb16q} et l'isolat avirulent IPO9415, le contournement du processus de reconnaissance précoce par infiltration des spores fongiques directement dans l'apoplasme conduit à un contournement partiel de la résistance (Chapitre 1). A l'inverse, dans les pathosystèmes *C. fulvum* / tomate et *L. maculans* / *B. juncea*, la résistance ne se trouve pas compromise par le contournement – par retrait de l'épiderme de feuille dans un cas (Wit, 1977) ou par infiltration de spores fongique dans l'apoplasme dans l'autre (Chen and Howlett, 1996) – du processus de reconnaissance précoce au niveau des stomates. Cela suggère, d'une part, l'existence d'un second processus de reconnaissance apoplasmique et, d'autre part, que les défenses sous-tendant cette reconnaissance apoplasmique sont suffisamment efficaces pour arrêter l'agent pathogène dans sa pathogénèse. Dans le cas de l'interaction NIL^{Stb16q} / IPO9415, l'aspect partiel du contournement est également révélateur de l'existence d'un second processus de reconnaissance apoplasmique. Cependant, le contournement de la résistance indique que les défenses sous-tendant cette reconnaissance apoplasmique – qu'elles soient différentes de celles sous-tendant la reconnaissance précoce ou identiques mais activées plus tardivement au regard de la pathogénèse de *Z. tritici* – ne sont vraisemblablement pas suffisamment efficaces pour arrêter le champignon. De ce fait, une reconnaissance précoce, présumée stomatique, apparaît comme un prérequis essentiel au caractère incompatible de l'interaction entre *Stb16q* et *Z. tritici*.

QUELS SONT LES SCENARIOS PLAUSIBLES POUR LE MECANISME DE RECONNAISSANCE DE *Z. TRITICI* PAR STB16 ?

Un des objectifs de ces travaux de Thèse consistait à élucider le mécanisme de reconnaissance d'un isolat avirulent de *Z. tritici* par STB16, notamment en identifiant le ou les ligands des domaines extracellulaires 2xDUF26 de la protéine (Chapitre 3 – Axe 1). Bien que cet axe de la Thèse se soit heurté à des problèmes techniques nous empêchant de concrétiser cet objectif, l'étude bibliographique réalisée dans l'article de revue « Cysteine-rich receptor-like kinases (CRK), the new trendy and yet enigmatic protein family in plant immunity » a soulevé que le ou les ligands des domaines DUF26 étai(en)t probablement de nature glucidique. D'autre part, l'émergence rapide d'isolats virulents depuis le déploiement sur le territoire de blés cultivés portant le gène *Stb16q*, suggère que ce dernier, à l'instar du gène *Stb6* (Brown et al., 2015; Saintenac et al., 2018) et des gènes *Cf* chez la tomate (Ökmen and de Wit, 2012), est très certainement impliqué dans une relation gène-à-gène avec un facteur d'avirulence, AvrStb16q.

Trois éléments essentiels, à savoir la protéine STB16, le facteur d'avirulence AvrStb16q et un composé glucidique, seraient donc impliqués dans la reconnaissance de *Z. tritici* par STB16.

Deux grands mécanismes de reconnaissance existent chez les plantes : la reconnaissance du « non-soi », par liaison avec des composés constitutifs ou sécrétés des agents pathogènes, et la reconnaissance des perturbations du « soi », par surveillance des composants de la plante ciblés par l'agent pathogène (Introduction – Section 2.1). En s'appuyant sur la diversité des stratégies de reconnaissance des plantes, plusieurs scénarios d'interactions entre ces trois acteurs peuvent être imaginés. Dans les scénarios de reconnaissance du « non-soi » et selon l'hypothèse d'un ligand de type glucidique, STB16 pourrait lier – à l'instar des CRRSP Gnk2 et AFP1 qui lient le mannane des parois fongiques (Miyakawa et al., 2014; Ma et al., 2018) – un composé glucidique de la paroi ou d'une ECM de *Z. tritici*. Les parois et les ECM fongiques sont en effet constituées en grande partie de sucres et de composés glycosylés. Les composants principaux des ECM fongiques sont par exemple des glycoprotéines, et particulièrement des mannoprotéines (Wanke et al., 2020). Les spores et hyphes de *Z. tritici* ont en plus montré une affinité pour des lectines à mannose et à glucose (Duncan and Howard, 2000). Dans le scénario le plus simple de reconnaissance du « non-soi », AvrStb16q serait le ligand direct de STB16, porterait donc un groupement glucidique et serait localisé dans la paroi ou dans une ECM de *Z. tritici* (FIGURE 21, SCENARIO 1). Le deuxième scénario le plus probable, dans le cas d'une reconnaissance du « non-soi », est une interaction tripartite entre les trois éléments. AvrStb16q pourrait masquer le composé glucidique afin de protéger la paroi fongique de l'action d'enzymes de dégradation végétale, comme Avr4 qui lie la chitine de *C. fulvum* pour la protéger des chitinases de tomate (Ökmen and de Wit, 2012). Le complexe formé par AvrStb16q et le composé glucidique serait reconnu par STB16 (FIGURE 21, SCENARIO 2). Dans les scénarios de reconnaissance des perturbations du « soi », le composé glucidique lié par STB16 proviendrait non pas de *Z. tritici* mais de la plante elle-même. On peut alors imaginer un scénario où STB16 surveille l'intégrité de la paroi végétale en reconnaissant des produits issus de la dégradation de la paroi par AvrStb16q (FIGURE 21, SCENARIO 3).

La confirmation de la nature du ou des ligands des domaines DUF26 de STB16, l'identification de la nature d'AvrStb16q et de son rôle dans la pathogénèse, ainsi que la caractérisation de l'interaction (directe ou indirecte) entre ces différentes molécules et STB16 sont autant d'éléments nécessaires pour orienter les futurs travaux vers l'un ou l'autre de ces scénarios.

LES REPONSES MOLECULAIRES ET PHYSIOLOGIQUES GOUVERNEES PAR STB16

Après perception du signal, comme la reconnaissance de *Z. tritici*, STB16 intègre très probablement un complexe immunitaire avec des partenaires membranaires et/ou cytoplasmiques – complexe dans lequel des évènements d’auto- et de transphosphorylation entre des résidus spécifiques ont probablement lieu et conduisent à l’activation des réponses adéquates au signal perçu (FIGURE 21).

QUELS SONT LES REPONSES DE DEFENSES MISES EN PLACE PAR STB16 ?

Les travaux conduits au cours de cette Thèse ont démontré que, suite à la reconnaissance d’un isolat avirulent de *Z. tritici*, STB16 était capable d’induire une fermeture stomatique (Chapitre 3 – Axe 3). Au regard du mode d’entrée exclusif de *Z. tritici* par les stomates, et de l’importance de l’immunité stomatique dans les défenses contre les agents pathogènes utilisant ce mode d’entrée (Introduction – Section 2.2.2.2), il est raisonnable d’imaginer un rôle important de cette réponse dans le blocage majeur des hyphes de *Z. tritici* lors de leurs pénétrations. D’autre part, les travaux conduits au cours de cette Thèse ont également démontré que, lors de l’infiltration d’isolats avirulents de *Z. tritici* directement dans l’apoplasme de la NIL^{Stb16q}, le contournement de la résistance était seulement partiel (Chapitre 1 – Article). Ce résultat suggère que, suite à la reconnaissance d’un isolat avirulent de *Z. tritici*, STB16 est également capable d’induire des défenses apoplasmiques. Il est alors envisageable que des défenses apoplasmiques jouent un rôle dans le blocage des 5 % d’hyphes qui parviennent à pénétrer le stomate. En conséquence, bien que le rôle de ces deux réponses de défense dans la résistance reste à confirmer lors de travaux futurs, il est tentant de spéculer que le mécanisme de résistance médié par *Stb16q* est un mécanisme complexe reposant sur l’addition séquentielle de la réponse de défense stomatique et d’une ou plusieurs réponses de défense apoplasmique(s) (FIGURE 21). Les données obtenues au cours de ces travaux de Thèse, appuyées par la littérature, permettent d’émettre plusieurs hypothèses relatives aux mécanismes moléculaires gouvernant les réponses de défense induites par STB16.

La faible variation dans le pourcentage de stomates fermés (< 15 %) chez la NIL^{Stb16q} en réponse à l’isolat avirulent IPO9415 comparée à la NIL^{Stb16q} inoculée avec l’isolat virulent CFZ008 indique que la réponse stomatique médiée par STB16 est une réponse locale. Par conséquent, et du fait de (i) l’absence de modifications profondes des phytohormones et du métabolome globale à l’échelle de la feuille entre la NIL^{stb} et la NIL^{Stb16q} (Chapitre 3 – Axe 3), (ii) un taux

de stomates fermés qui coïnciderait avec le taux d'hyphes tentant de pénétrer un stomate ([Chapitre 1 – Article](#)), et (iii) des cellules de garde capables de répondre à la perception d'un agent pathogène de manière spécifique et indépendante des autres cellules ([Chen and Howlett, 1996](#); [David et al., 2019](#)), une première hypothèse est que la réponse stomatique médiée par STB16 repose sur un mécanisme moléculaire très localisé mis en place strictement au niveau du stomate impliqué dans la reconnaissance, plutôt que sur un mécanisme moléculaire plus diffus (apoplasmique par exemple).

Deux mécanismes physiologiques peuvent être responsables d'une fermeture localisée des stomates (**FIGURE 21**) : (i) la modification de la turgescence des cellules de garde, qui pourrait par exemple être médiée par des voies de signalisation internes aux stomates similaires à celles employées par d'autres récepteurs de l'immunité, comme le recrutement de OST1 et SLAC1 par FLS2 et CERK1 ([Introduction – Section 2.2.2.2](#)), et (ii) la mort des cellules de garde – comme c'est le cas pour l'interaction incompatible décrite ci-dessus entre *L. maculans* et *B. juncea* ([Chen and Howlett, 1996](#)) – médiée par des voies de signalisation jusqu'à présent non caractérisées dans d'autres pathosystèmes. Les images de stomates obtenues au cours de ces travaux de Thèse par la technique d'empreintes de feuilles de blé ne montrent pas de collapsus évident – indicateur de mort cellulaire – des cellules stomatiques de la NIL^{Stb16q} inoculée avec l'isolat avirulent. Bien que l'état physiologique des stomates soit à confirmer à l'aide d'autres techniques (de coloration par exemple), une seconde hypothèse est donc que le mécanisme physiologique responsable de la fermeture stomatique médiée par STB16 repose sur la modification de la turgescence des cellules de garde. Moduler la turgescence des cellules de garde pour maintenir les stomates dans un état ouvert – par exemple à l'aide d'essais similaires à ceux réalisés avec la fusicoccine ([Chapitre 1 – Article](#)) – pourrait alors être une stratégie à utiliser pour valider l'importance et le rôle de cette fermeture stomatique dans la résistance médiée par STB16.

Les travaux de cette Thèse ont montré qu'un HCAA, le sinapoylagmatine, et huit autres métabolites (dont quatre possiblement impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et dérivés), étaient les seuls métabolites permettant de discriminer le métabolome de l'interaction incompatible NIL^{Stb16q} × IPO9415 des interactions compatibles parmi les 614 composés identifiés ([Chapitre 3 – Axe 3](#)). Or, les HCAA ont des rôles notamment dans le renforcement des parois végétales, dans la régulation de ROS en réponse à des agents pathogènes et des rôles antimicrobiens directs ([Liu et al., 2022a](#)). Une troisième hypothèse est donc que le sinapoylagmatine pourrait avoir un effet antifongique direct, ou du moins contribuer

à la génération d'un environnement apoplasmique hostile à *Z. tritici* (FIGURE 21). Son rôle exact dans les défenses apoplasmiques reste toutefois à confirmer, en inhibant chimiquement sa voie de biosynthèse par exemple.

Curieusement, les HCAA peuvent également avoir un rôle dans la fermeture des stomates (Liu et al., 2022a). Il est donc envisageable que le sinapoylagmatine soit un médiateur de la réponse stomatique médiée par STB16. Au regard du coût énergétique que représente la mise en place d'une réponse de défense (Huot et al., 2014), il serait dans l'intérêt de la plante de mettre en place deux ou plusieurs réponses de défenses complémentaires à partir d'un unique mécanisme moléculaire. En conséquence, il pourrait être tentant de spéculer sur un rôle central et double du sinapoylagmatine dans les réponses de défenses médiées par STB16 et plus globalement sur l'existence d'un unique mécanisme moléculaire qui gouvernerait l'ensemble des réponses de défenses observées.

D'AUTRES ROLES POUR STB16 ?

Les CRKs, et plus largement les RLKs, en plus de leurs rôles dans l'immunité, sont également impliquées dans divers processus biologiques comme la croissance et le développement, l'homéostasie ou la réponse aux stress abiotiques (Gish and Clark, 2011; Tanaka et al., 2012; Zhang et al., 2013a; Bourdais et al., 2015; Burdiak et al., 2015; Lu et al., 2016; Hunter et al., 2019; Arellano-Villagómez et al., 2021). Une même CRK peut ainsi avoir un rôle multiple dans plusieurs de ces processus, comme c'est le cas de CRK2 qui participe à la fois à la résistance contre *P. syringae* (Kimura et al., 2020), à la tolérance au stress salin (Hunter et al., 2019) et à la croissance (Bourdais et al., 2015) chez *A. thaliana*. Curieusement, les données obtenues au cours de cette Thèse pourraient suggérer une différence de régulation de l'ouverture stomatique basale entre les NILs *Stb16q* dans certaines conditions, avec globalement moins de stomates fermés hors infection sur les feuilles de la NIL^{Stb16q} comparées à celles de la NIL^{stb} (Chapitre 1 – Article – Figure 3.C). Dans l'ensemble, ces éléments questionnent donc l'existence d'un rôle de STB16 en dehors de la résistance et cas échéant, la façon dont sont orchestrés les différents mécanismes médiés par cette protéine.

LES GENES *STB* DANS LA RESISTANCE CONTRE *Z. TRITICI* : UN MEME MECANISME POUR PLUSIEURS LEVIERS D'ACTIVATION ?

UN MECANISME DE RESISTANCE GENERALISE ?

Les travaux conduits au cours de cette Thèse ont mis en avant des similitudes fortes entre les interactions incompatibles avec les gènes *Stb5*, *Stb6*, *Stb7*, *Stb9* et *Stb16q* avec (i) deux stades d'arrêt de *Z. tritici* démontrés, l'un majoritaire à la pénétration et l'autre dans l'apoplasme et (ii) un contournement partiel de la résistance lors du contournement des étapes précoces de la pathogénèse par la technique d'infiltration de spores (Chapitre 1, Chapitre 2). Le même raisonnement que celui exposé pour *Stb16q* dans la partie précédente de cette discussion générale peut donc être conduit pour les autres gènes *Stb* étudiés. L'importance du stomate dans la résistance, avec une reconnaissance précoce de *Z. tritici* au niveau du stomate et une réponse stomatique spécifique, peut alors être supposée également dans le cadre de la résistance gouvernée par ces autres gènes *Stb*. Cette hypothèse est appuyée, dans le cas du gène *Stb7*, par une expression précoce du facteur d'avirulence correspondant (Avr3D7) déclenchée juste avant le contact de l'hyphe avec le stomate (International Symposium on Cereal Leaf Blights 2022, Gammarth, Tunisia), ce qui pourrait ainsi expliquer pourquoi la résistance se met en place principalement à ce niveau. D'autre part, similairement aux résultats obtenus pour *Stb16q*, l'étude métabolomique de l'interaction incompatible entre Chinese Spring, portant *Stb6*, et l'isolat IPO323 de *Z. tritici*, a révélé, entre autres, une surrégulation des HCAAs dont le sinapoylagmatine (Seybold et al., 2020b). Enfin, il est à noter que, dans le pathosystème *C. fulvum* / tomate, deux gènes *Cf*, *Cf-4* et *Cf-9*, sont activés par deux facteurs d'avirulence différents mais gouvernent tous deux une HR en interagissant avec les mêmes partenaires cytoplasmiques (Ökmen and de Wit, 2012). Dans l'ensemble et bien qu'aucun mécanisme de résistance médié par les gènes *Stb* n'ait encore été complètement caractérisé, l'hypothèse selon laquelle les protéines STB (ou au moins certaines d'entre elles) reconnaissent *Z. tritici* au niveau du stomate à partir de différents stimuli (étant donné leurs domaines extracellulaires de natures différentes) et gouvernent les mêmes réponses de défense peut donc être proposée.

QUELS FACTEURS IMPACTENT L'EFFICACITE DU MECANISME DE RESISTANCE ?

Les travaux présentés dans le Chapitre 2 ont démontré d'une part que l'efficacité de blocage de *Z. tritici* à la pénétration variait entre les différents gènes *Stb* étudiés (de 60 à 97%). D'autre part, ces travaux ont également démontré qu'un même gène *Stb* pouvait médier une résistance

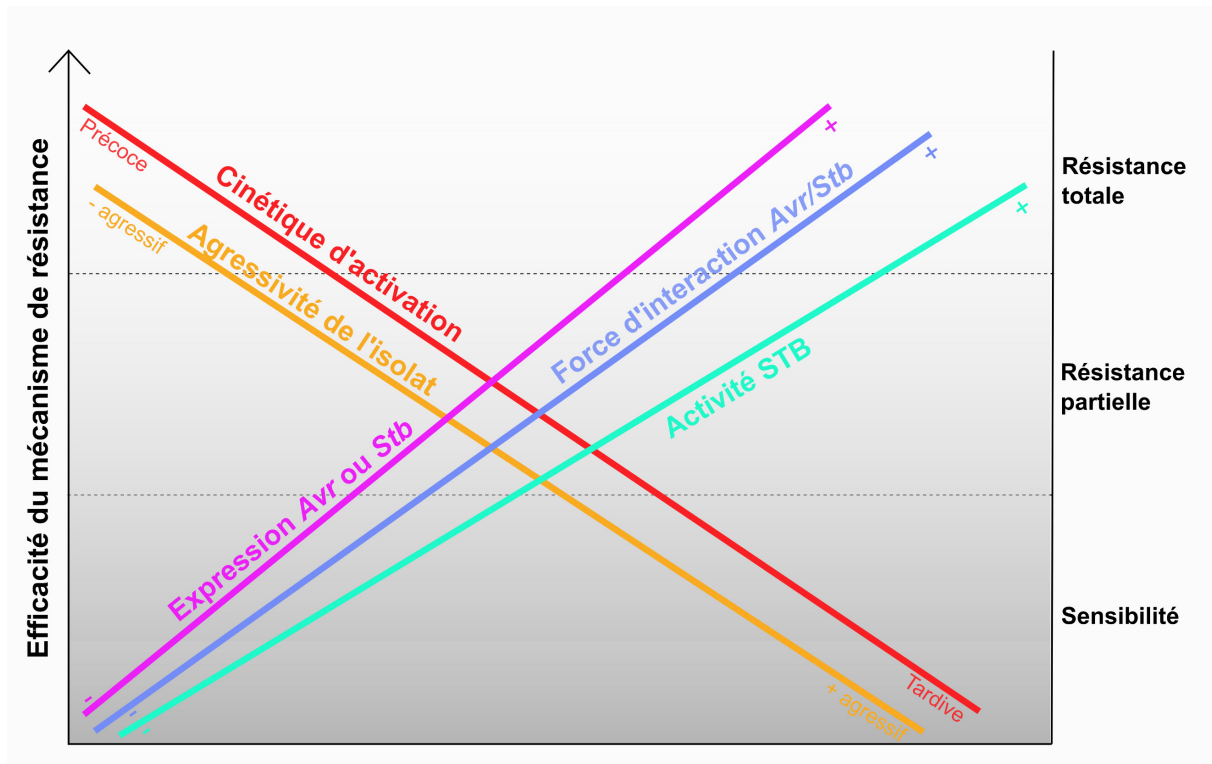


FIGURE 22. FACTEURS IMPACTANT L'EFFICACITE DU MECANISME DE RESISTANCE GOUVERNES PAR LES GENES *STB*.

Le niveau d'expression plus ou moins intense des différents gènes *Stb* ou des différents gènes d'avrulence *AvrStb* (rose), l'agressivité plus ou moins forte des isolats de *Z. tritici* face au blocage à la pénétration (orange), une interaction plus ou moins précoce entre une protéine STB et un facteur d'avrulence *AvrStb* (rouge), la force d'interaction plus ou moins élevée entre la protéine codée par une version allélique donnée d'un gène *Stb* et la protéine codée par une version allélique donnée d'un gène d'avrulence *AvrStb* (bleu), et des protéines STB plus ou moins actives intrinsèquement (vert) sont autant de facteurs possiblement modulateurs de l'efficacité du mécanisme de résistance gouverné par les gènes *Stb* et donc du degré de résistance (sensibilité, résistance partielle, résistance totale) d'un blé portant un gène *Stb* donné face à un isolat de *Z. tritici* donné.

phénotypiquement qualitative ou une résistance phénotypiquement quantitative selon l'isolat de *Z. tritici* utilisé. C'est le cas du gène *Stb5* qui, lorsqu'en interaction avec l'isolat CFZ008, conduit à une résistance totale mais lorsqu'en interaction avec les isolats IPO92006 et IPO94269 conduit à une résistance seulement partielle (Chapitre 2). Selon le postulat d'un mécanisme conservé entre les gènes *Stb*, ces résultats indiquent que l'efficacité du mécanisme de résistance peut varier en fonction du gène *Stb* et/ou de l'isolat de *Z. tritici* impliqués dans l'interaction.

Les variations observées peuvent refléter (i) une différence dans le niveau d'expression des différents gènes *Stb* ou des différents facteurs d'avirulence, comme démontré pour l'interaction entre le gène *Pik* du riz et le facteur d'avirulence Avr-Pik de *M. oryzae* (Kanzaki et al., 2012), (ii) une différence d'agressivité des isolats de *Z. tritici* face au blocage à la pénétration, et/ou (iii) une différence dans la force ou la cinétique d'activation du mécanisme de résistance, c'est-à-dire dans l'efficacité des processus de reconnaissance et de transduction du signal médiés par les différentes protéines STB (FIGURE 22). Concernant ce dernier point, il est en effet concevable que l'activité de certaines protéines STB, qui sont de natures différentes pour au moins deux d'entre elles, soit intrinsèquement plus forte que d'autres et conduise donc à une activation plus forte du mécanisme. L'affinité de l'interaction entre les différentes protéines STB et les facteurs d'avirulence correspondant, ou de l'interaction entre les protéines STB et leurs partenaires cytoplasmiques, pourrait également conduire à une activation plus ou moins intense du mécanisme. Il a par exemple été démontré par des analyses de mutation que plus l'affinité d'Avr2 de *C. fulvum* pour sa cible végétale Rcr3 surveillée par la protéine Cf-2 était forte, plus la HR médiée par Cf-2 était intense (Van't Klooster et al., 2011). Il est alors facile d'imaginer que différentes versions alléliques d'un facteur d'avirulence AvrStb ou d'une protéine STB auraient des affinités contrastées pour une protéine STB donnée ou pour un facteur d'avirulence AvrStb donné respectivement, ce qui pourrait induire un mécanisme d'intensité variable plus ou moins apte à arrêter *Z. tritici*. Enfin, étant donné l'importance d'une reconnaissance précoce pour la résistance, un facteur d'avirulence sécrété, et donc reconnu, plus ou moins précocement pourrait également conduire à une variation dans l'efficacité du mécanisme de résistance. On peut imaginer par exemple qu'un facteur d'avirulence sécrété par *Z. tritici* en amont du stomate soit reconnu et induise une fermeture stomatique avant même que l'hyphe n'atteigne le stomate – ce qui pourrait empêcher quasiment tous les événements de pénétration – tandis qu'un facteur d'avirulence sécrété par *Z. tritici* lors de la pénétration du stomate induirait une fermeture stomatique au moment où l'hyphe est déjà dans le stomate – ce

qui empêcherait une proportion plus faible des événements de pénétration selon le degré d'avancement de l'hyphe dans le stomate.

Les cinétiques et intensités d'expression des facteurs d'avirulence, des gènes *Stb* et de leurs différents variants alléliques, la force et la cinétique des interactions entre facteur d'avirulence AvrStb et protéines STB et les activités intrinsèques aux protéines STB sont donc autant de paramètres à étudier pour mieux comprendre ce qui régit l'efficacité du(des) mécanisme(s) de résistance à la septoriose et son(leur) contournement.

CONCLUSION

L'élaboration de nouvelles stratégies de lutte efficaces et durables contre la septoriose nécessite une meilleure compréhension des interactions entre le blé et *Z. tritici*, et particulièrement des événements physiologiques et moléculaires sous-tendant la résistance contre cet agent pathogène. Les travaux réalisés au cours de cette Thèse ont permis de poser les bases de la caractérisation fonctionnelle d'un mécanisme de résistance à la septoriose médié par un gène majeur *Stb*, *Stb16q*, (i) en identifiant son lieu d'action (« où »), à savoir le stomate et l'apoplasme, (ii) en identifiant le moment durant lequel il agit au cours de la pathogénèse du champignon (« quand »), à savoir la pénétration principalement et la colonisation et (iii) en initiant l'exploration des moyens mis en œuvre pour arrêter le champignon, avec l'identification d'au moins deux réponses de défenses, qui sont une réponse stomatique et des défenses apoplasmiques (« comment »), dont le rôle exact dans la résistance et les mécanismes sous-jacent restent à caractériser. Ces résultats, appuyés par l'étude bibliographique menée au cours de cette Thèse, ont conduit à la proposition d'un modèle de la résistance médiée par le gène majeur *Stb16q*. D'autre part, les études phénotypiques et cytologiques conduites au cours de cette Thèse ont révélé une identité dans les lieux et les stades d'arrêt de *Z. tritici* lors d'interactions incompatibles mettant en jeu quatre autres gènes *Stb*, suggérant que les mécanismes de résistance à STB pourraient être conservés entre les différentes sources de résistance génétiquement qualitative.

Si vérifiés, ces modèles et hypothèses apporteraient une nouvelle perspective à la façon dont sont conçues les stratégies de lutte contre la septoriose. En effet, une confirmation de ces modèles et hypothèses impliquerait que (i) le blocage à la pénétration, potentiellement par fermeture des stomates, est un mécanisme efficace pour arrêter *Z. tritici* quel que soit le gène *Stb* mis en jeu, (ii) les facteurs d'avirulence n'interviennent pas dans les réponses de défenses communes elles-mêmes mais seulement lors de leurs activations et (iii) l'efficacité du mécanisme de résistance commun peut être modulé par plusieurs facteurs incluant le niveau d'expression des gènes *Stb* et des variations dans le mécanisme de reconnaissance de l'agent pathogène. Ces résultats et leurs implications pourraient constituer des aides futures à la sélection variétale, par exemple en orientant la sélection vers des traits agronomiques limitant l'étape de pénétration (variétés à haut rendement mais avec une densité stomatique moindre, dont les stomates sont plus ou moins réactifs, exprimant plus fortement des gènes *Stb*...) ou en orientant la sélection vers le pyramidage de gènes *Stb* en combinaison avec des QTLs contrôlant

des mécanismes de défense complémentaires (liés à un blocage aux étapes pré-pénétration ou à l'étape de colonisation). En plus de constituer des aides futures à la sélection variétale, ces résultats et implications pourraient également permettre, à terme, de s'orienter vers des stratégies exploitant le mécanisme de blocage à la pénétration et/ou visant à contrôler le processus de reconnaissance, en concevant par exemple un récepteur capable à la fois de reconnaître précocement un composé structural ou pathogénique indispensable à *Z. tritici* (donc universel parmi les différents isolats et susceptibles de ne pas ou peu évoluer) et à la fois d'induire fortement le mécanisme de blocage à la pénétration.

En conclusion, pris dans leur ensemble, les travaux réalisés au cours de cette Thèse ont mis en avant le rôle central du stomate dans le devenir de l'interaction entre les deux protagonistes du pathosystème blé / *Z. tritici*. Le stomate constitue en effet non seulement le lieu d'arrêt majeur de *Z. tritici* lors des interactions incompatibles, mais représente aussi très probablement la structure majeure de reconnaissance du champignon en plus d'être probablement à l'origine du mécanisme physiologique sous-tendant la résistance. En tant que structure d'échange de gaz et d'eau, le stomate est un moteur essentiel pour d'autres processus fondamentaux de la plante, comme la photosynthèse, la respiration et la transpiration, et représente ainsi également un élément clé du rendement et de la résistance aux stress hydriques. La régulation de l'ouverture et de la fermeture stomatique constitue donc un enjeu critique pour la plante qui doit maintenir un équilibre subtil entre sa fitness et sa résistance à des stress à la fois biotiques et abiotiques. De ce fait, la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires gouvernant le fonctionnement du stomate et l'intégration des multiples signaux environnementaux représente sans nul doute l'une des orientations primordiales à donner aux futurs travaux de recherche relatifs à la résistance aux stress multiples, comme la septoriose et le stress hydrique, pour l'amélioration du blé.

Certificate Of Analysis - Custom Recombinant Protein
Project #: ATGX-12160- 2XDUF26

Recombinant Protein Production:

Protein name: 2XDUF26
Lot #:12160-052420-A01
Production Host: *Insect*
Molecular Weight: 28.17kDa

Expected protein to be produced*:

>SIP-6His-TEV-2XDUF26 - 256 AAs MW=28.17kDa

MESHMLLFLFSLATGLFGAVHGDPLGQLCGNSGNYTSNSTYQANLRLLSSTLPKKAASNTNLFATATVGDVDPDMVHALALCR
GDFNASVCQSCVAIAFEDAQQLCAYNKEAALYYDPCMLKFSNKNLATDTDKVVLLIYNTQNF'TTNADITQRLLF'TLINSTA
QSAANSRRFTTSRLDVGSSPTLYCLMQCTPDLTADDCMACFQTVLSVTLQYLGGRGTGGRVLGVRCNMRYEMWPFENLYFQG
GSHHHHHHSG

Features :

SIP Secretion Peptide Signal : (1:22)

2XDUF26: (23:239)

TEV sequence : (240:246)

His-tag with linker : (247:256)

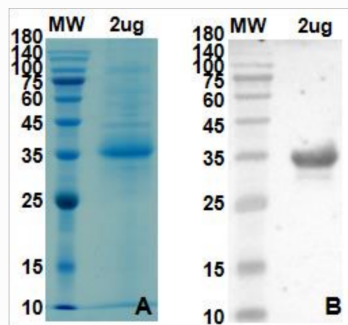
**Current delivered protein may differ according to expression strategy (periplasmic expression, secretion...) and downstream processing: affinity purification, Tag-cleavage, etc.*

Final buffer: PBS, pH 7.5

Purity: 85%

Concentration: 0.28 mg/ml

Protein Final QC:



Final sample QC. Coomassie blue staining
A: Reduced SDS-PAGE analysis. B: Western blot analysis

Final delivered samples:

Protein name	Number of vials	Concentration	Quantity	Form
2XDUF26	5vials	0.28mg/ml	1.6ml/vial	Frozen

FIGURE SUPPLEMENTAIRE 1. RAPPORT DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION DES DOMAINES 2XDUF26 RECOMBINANTS EN CELLULES D'INSECTE.

ANNEXES AU CHAPITRE 3

AXE 1 – LA RECONNAISSANCE DE *Z. TRITICI*

MATERIELS ET METHODES

PRODUCTION DES DOMAINES 2xDUF26 EN SYSTEME EUCARYOTE INSECTE

La synthèse du gène codant pour la protéine recombinante 2xDUF26_TevHis, optimisé pour l'expression en cellules d'insecte, ainsi que son clonage, son expression en cellules d'insecte et sa purification, ont été réalisés par le prestataire de service ProtéoGénix (FIGURE SUPPLEMENTAIRE 1)

TESTS D'INTERACTION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE AU MANNOSE

La résine d'affinité de mannose-agarose M6400 (Sigma) a été lavée à l'eau puis suspendue dans un volume de tampon « d'interaction » (100 μ M de CaCl₂, 20 mM de Tris pH = 7,5, 100 mM de NaCl). Dans des tubes 1,5 mL, 60 μ L de mélange résine/tampon d'interaction ont été ajoutés à 10 μ g de 2xDUF26 recombinant ou de lectine à mannose BC2LA (contrôle positif, fournie par Annabelle Varrot) puis le tout a été incubé sur agitateur rotatif 1 h à 4°C. Les tubes ont été centrifugés 3 min à 5 000 rpm, repris dans 300 μ L de tampon d'interaction, placés sur agitateur rotatif 3 min à température ambiante et centrifugés à nouveau 3 min à 5 000 rpm. L'étape de lavage a été répétée une autre fois et les échantillons ont été repris dans 150 μ L de tampon d'interaction. Les tubes ont été placés 5 min à 95°C pour éluer les protéines fixées sur la résine et centrifugés 3 min à 5 000 rpm. Le surnageant a été analysé par SDS-PAGE.

TESTS D'INTERACTION AVEC LA TECHNIQUE BLI

Préparation des échantillons test :

- Des solutions à 4 mg/mL des sucres suivants ont été réalisées dans du PBS 1X: Galactane, Galactomannane, β -D-mannane, Laminarine, Yeast β -D-glucane, xyloglucane-fucose, rhamnogalacturonane, cellopentatose, 1,4- β -D mannohexaose, chitotetraose, Man- α -1-3-Man- α -1-6-Man.
- Des suspensions de spores de CFZ008 et d'IPO9415 à 1.10⁶ spores/mL ont été préparées selon le mode opératoire publié (Chapitre 1) (Battache et al., 2022).
- Des extraits totaux des NIL^{stb} et NIL^{Stb16q} inocuées avec l'isolat IPO9415 ont été réalisés comme suit. Une feuille inocuée par NIL a été récoltée à 2, 4 et 8 jpi et broyée dans de l'azote liquide (4x30 s à 30 Hz à l'aide du TissueLyser II, Qiagen). Un « pool »

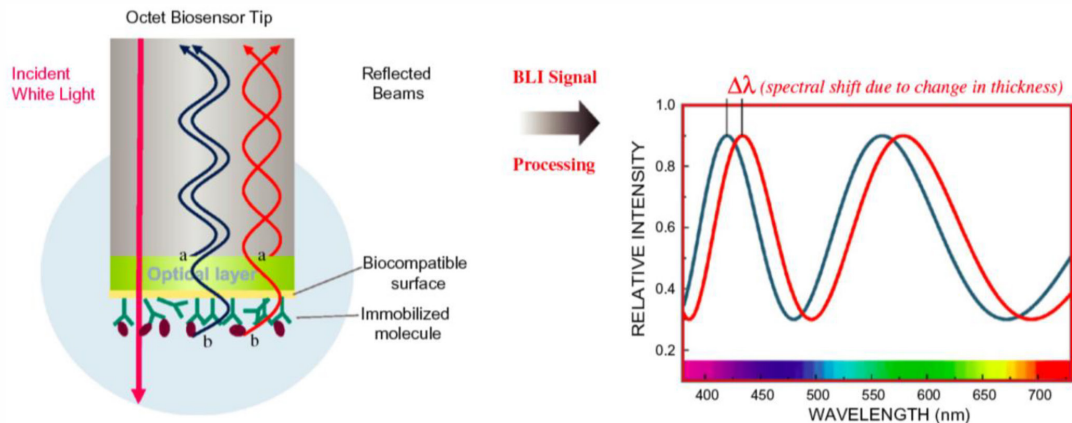
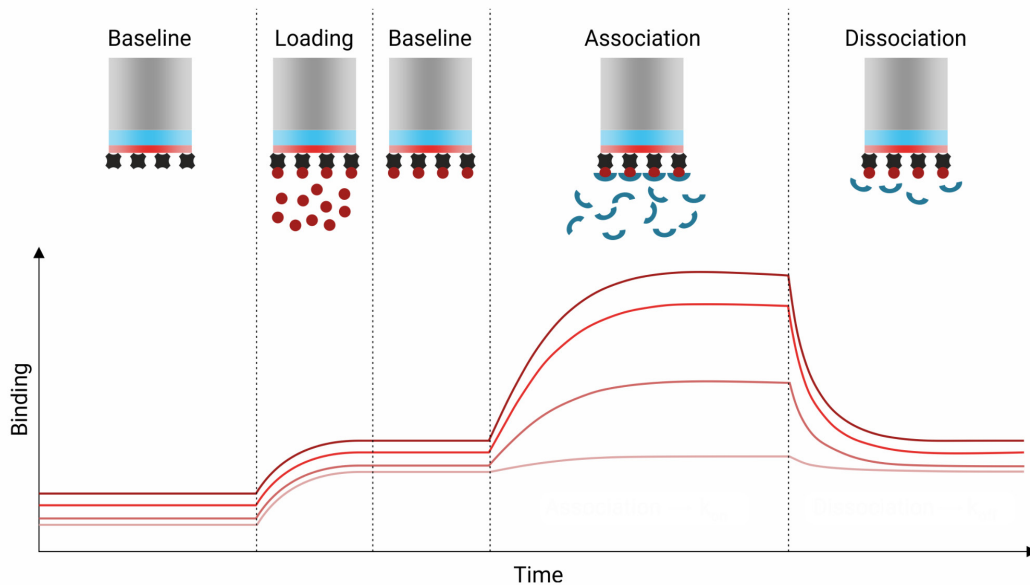
A**B**

FIGURE SUPPLEMENTAIRE 2. FONCTIONNEMENT DE LA TECHNIQUE DE BIOLAYER INTERFEROMETRY (BLI).

(A) Principes de base de la technique BLI. Une lumière incidente est réfléchiée par deux surfaces : une surface de référence interne et une surface sur laquelle ont été immobilisées des protéines d'intérêt. Tout changement dans le nombre de molécules liées à l'extrémité du capteur provoque un changement dans le motif d'interférence (décalage de longueur d'onde) qui peut être mesuré en temps réel.

Figure et légende issues de Do et al. (2008), <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.04.009>.

(B) Courbes réponses typiques obtenues par mesure en temps réel des changements dans le motif d'interférence. Le décalage de longueur d'onde étant une mesure directe du changement d'épaisseur de la surface d'immobilisation des protéines, chaque association et dissociation de molécules à la surface du capteur entraîne une augmentation ou une diminution respectivement de sa valeur (« Binding », nm).

Figure adaptée du site 2Bind.com. <https://2bind.com/bli/>.

pour chaque NIL, contenant chacun un point de cinétique 2, 4 et 8 jpi, a été suspendu dans 600 μ L de PBS 1X.

- Des échantillons d'apoplasme des NIL^{stb} et NIL^{Stb16q} inoculées avec l'isolat IPO9415 ont été réalisés comme suit. Pour chaque NIL, dix feuilles inoculées ont été récoltées à 2, 4 et 8 jpi dans des tubes falcon 50 mL contenant une compresse de gaz humidifiée afin d'éviter leur dessiccation. Leur apoplasme a été extrait à l'aide d'une chambre à pression 600D Pressure Chamber Instrument (PMS Instrument Company) puis « poolés » par NIL en combinant les points de cinétique (environ 150 μ L obtenus pour chaque NIL).
- Des extraits de parois cellulaires des NIL^{stb} et NIL^{Stb16q} inoculées avec l'isolat IPO9415 ont été réalisés comme suit. Pour chaque NIL, deux feuilles inoculées ont été récoltées à 2, 4 et 8 jpi, broyées dans de l'azote liquide (4x30 s à 30 Hz) et « poolées » par NIL en combinant les points de cinétique. Les parois cellulaires contenues dans les deux pools obtenus ont ensuite été extraites selon un protocole publié (Pettolino et al., 2012). Les extraits de paroi ont été dilués dans 1,2 mL de PBS 1X.

Technique de BioLayer Interferometry (BLI): Des capteurs streptavidine Octet® SA Biosensors ont été lavés 10 min dans du PBS 1X afin de dissoudre le sucrose les protégeant. La technique BLI (**FIGURE SUPPLEMENTAIRE 2**) a ensuite été employée avec un système Octet RED96 (FortéBio) couplé au logiciel de traitement de données FortéBio data analysis 9.0 selon le mode opératoire suivant. Les capteurs ont été plongés successivement dans 200 μ L de :

1. Une solution 1 de PBS 1X (60 s) : constitue la « baseline 1 »
2. La solution contenant la protéine recombinante préalablement biotinylée par l'équipe GBMS (150 s) : cette étape correspond à la fixation de la protéine sur le capteur (« Loading »). Du PBS 1X a été utilisé en tant que contrôle négatif.
3. La solution 1 de PBS 1X (60 -120 s) : cette étape correspond à une étape de lavage / équilibrage.
4. Une solution 2 de PBS 1X (60 s) : cette étape correspond à une étape de blanc (« baseline 2 »).
5. Un échantillon test contenant un ligand candidat (300 s) : cette étape correspond à une étape d'association.
6. La solution 2 de PBS 1X (300 s) : cette étape correspond à une étape de dissociation permettant la régénération du biocapteur.

Si aucune interaction n'a été détectée avec un échantillon test donné, les mêmes capteurs ont été réutilisés pour l'échantillon suivant et seules les étapes 4, 5 et 6 ont été réalisées.

AXE 2 – LA TRANSDUCTION DU SIGNAL

MATERIELS ET METHODES

CLONAGE DU DOMAINE CYTOPLASMIQUE DE STB16 EN SYSTEME PROCARYOTE

La séquence codant pour le domaine cytoplasmique de la protéine STB16 a été amplifiée par PCR avec le MasterMix Phusion Hot Start II High-Fidelity (ThermoFisher) à partir d'un vecteur pDONR221-Stb16 contenant le CDS du gène *Stb16q* (construit antérieurement au laboratoire par Florence Cambon), en utilisant 10 µM d'amorces KinStb16-attB

(KinStb16-attB1-F1 :

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCGAAGAAAAGGAAAGGCAAACACT -3'

KinStb16-attB2-R1 :

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATCTGCCATCTGGCTCTTCAG -3') et le cycle d'amplification : 30 s à 98°C, [10 s à 98°C, 30 s à 63°C, 1 min 30 à 72°C] x35 et 5 min à 72°C. Le produit PCR a été purifié à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel). Un clonage BP Gateway a été réalisé dans du tampon TE (pH 8,0) avec 77 ng de produit PCR, 300 ng de vecteur Gateway™ pDONR™221, 4 µL de BP Clonase Enzyme Mix (ThermoFisher) et 2 µL de Proteinase K solution (ThermoFisher) pour obtenir un vecteur pDONR221-KinStb16. Le vecteur pDONR221-KinStb16 a été cloné par électroporation dans des *E. coli* TOP10 (Life Technologie) et une miniprep a été réalisée avec le kit « GenElute Plasmid Miniprep » (Sigma-Aldrich). Le vecteur pDONR221-KinStb16 a été purifié avec le kit « NucleoSpin Gel and PCR clean up » (Macherey-Nagel™) et un clonage LR Gateway a été réalisé dans du tampon TE (pH 8,0) avec 1 µL de pDONR221-KinStb16 purifié (100-300 ng), 280 ng de pDEST-HisMBP (fourni par Dr Kostya Kanyuka), 4 µL de LR Clonase Enzyme Mix (ThermoFisher) et 2 µL de Proteinase K solution (ThermoFisher) pour obtenir un vecteur pDEST-HisMBP-KinStb16. Le pDEST-HisMBP-KinStb16 a été cloné par choc osmotique dans des *E. coli* Rosetta™ (DE3) chimiocompétentes (Novagen).

PRODUCTION DU DOMAINE CYTOPLASMIQUE DE STB16 EN SYSTEME PROCARYOTE

Une pré-culture de bactéries *E. coli* Rosetta™ (DE3) contenant le plasmide pDEST-HisMBP-KinStb16 a été réalisée en ensemencant une colonie isolée dans 5 mL de milieu LB additionnés de chloramphénicol (concentration finale : 100 mg/L) et d'ampicilline (concentration finale :

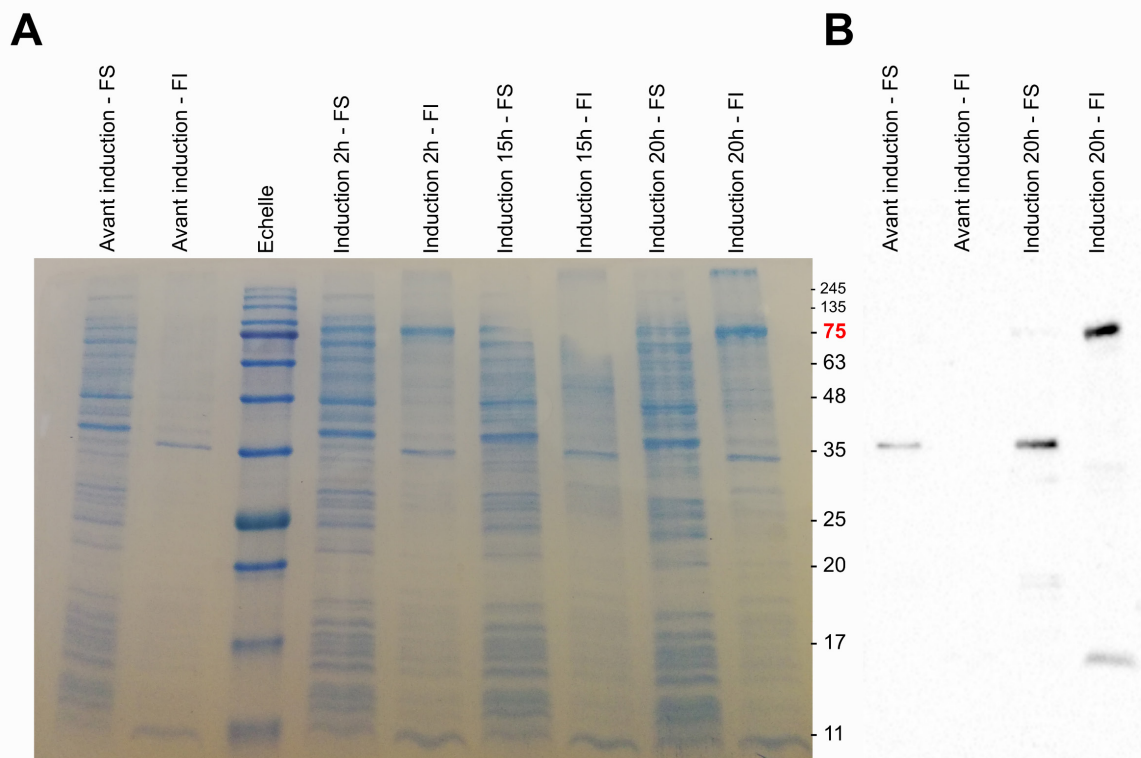


FIGURE SUPPLEMENTAIRE 3. PRODUCTION DE LA PROTEINE HISMBP-KINSTB16 EN SYSTEME PROCARYOTE.

(A) Analyse SDS-PAGE de l'extraction protéique des échantillons prélevés avant induction de l'expression de la protéine recombinante et 2 h, 15 h et 20 h après induction. **(B)** Western blot anti-histidine de l'extraction protéique des échantillons prélevés avant induction ou 20 h après induction. « FS » et « FI » correspondent respectivement aux Fractions Solubles et Fractions Insolubles obtenues après extraction protéique.

100 mg/L). La pré-culture a été incubée 16 h, à 37°C, sous une agitation à 200 rpm. Une culture bactérienne a ensuite été réalisée en ensemencant 100 mL de LB, additionnés des mêmes antibiotiques, avec 1 mL de pré-culture. La culture a été incubée à 37°C, sous agitation à 220 rpm. Lorsque la DO₆₀₀ atteint 0,5, l'induction de l'expression de la protéine fusion KinStb16-His-MBP a été initiée à 18°C, sous agitation à 220 rpm, en ajoutant 475 µL d'IPTG 100 mM (concentration finale : 0,5 mM). Deux millilitres de culture ont été prélevés avant induction et 2 h, 15 h et 20h après induction pour extraction protéique. Pour l'extraction protéique, les différents échantillons de culture prélevés ont été centrifugés 3 min à 12 000 rpm puis lavés dans 1 mL de PBS 1X froid avant d'être à nouveau centrifugés 10 min à 12 000 rpm. Les culots ont été repris dans 400 µL de tampon d'extraction (une tablette de cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail (Roche) diluée dans 10 mL de BugBuster® Protein Extraction Reagent (Sigma-Aldrich)) puis incubés sur agitateur rotatif 20 min à température ambiante avant d'être centrifugés 20 min à 4°C, à 16 000 g. Les culots obtenus ont été repris dans 100 µL de tampon d'extraction. Une analyse SDS-PAGE et un western blot anti-His ont été réalisés à partir des surnageants et culots obtenus à l'issue de l'extraction protéique afin de vérifier la présence de la protéine recombinante KinStb16-His-MBP dans les différents échantillons prélevés au cours de la production.

IDENTIFICATION DES SITES PHOSPHORYLES

La bande de taille correspondant à la protéine recombinante KinStb16-His-MBP issue de l'extraction protéique effectuée 20 h après induction a été découpée à partir du gel SDS-PAGE et envoyée à la Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO) pour analyse des modifications post-traductionnelles par spectrométrie de masse MS/MS. Les données ont été analysées, filtrées et groupées à l'aide du logiciel X!Tandem Pipeline (version 0.4.22) (Langella et al., 2017), en utilisant un fichier FASTA interne à la plateforme PAPPSO pour les séquences protéiques de contaminants, et les filtres suivants : Mode = « combine » ; Maximum peptide Evaluated = 0,001 ; Minimum number of peptides per protein = 1 ; Overall Samples = « FAUX » ; Maximum protein Evaluated = 0,001.

RESULTATS DE LA PRODUCTION DU DOMAINE CYTOPLASMIQUE DE STB16 EN SYSTEME PROCARYOTE

L'analyse SDS-PAGE et le western blot anti-His réalisés à l'issue de l'extraction protéique des différents échantillons prélevés au cours de la production du domaine cytoplasmique recombinant de STB16, de taille attendue de 84 kDa, ont confirmé une absence de la protéine

recombinante avant induction et sa présence dans les fractions insolubles 2 h, 15 h et 20h après induction (**FIGURE SUPPLEMENTAIRE 3**).

AXE 3 – LES REPONSES DE DEFENSES

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS BIOLOGIQUES, CONDITIONS DE CULTURE ET INOCULATION

Les expérimentations de cet axe ont été conduites avec les NIL^{stb} et NIL^{Stb16q} et les isolats IPO9415 et CFZ008 décrits dans le Chapitre 1. Les mêmes modes opératoires que ceux du Chapitre 1 en termes de conditions de culture végétale et fongique, de système de feuilles attachées et de procédures d'inoculation ont également été employés.

ANALYSE DE L'OUVERTURE STOMATIQUE

Les procédures expérimentales pour l'analyse de l'ouverture stomatique ont été intégralement décrites dans le Chapitre 1.

EXTRACTION DES PHYTOHORMONES ET DES METABOLITES SECONDAIRES

Pour les analyses de phytohormones et de métabolomique non ciblée, 8 cm de feuilles des NIL^{stb} et NIL^{Stb16q} inoculées avec un contrôle ou les isolats IPO9415 et CFZ008 ont été prélevés individuellement à 2, 4 et 8 jours post-inoculation et congelés dans de l'azote liquide. Cent milligrammes (± 5 mg) d'échantillons ont été broyés avec une bille en acier inoxydable de 4 mm de diamètre dans un vibro-broyeur MM400 (Retsch®) 2 \times 30 secondes à 30 Hz. Le broyat obtenu a été dissout dans 1 mL d'acétonitrile froid (50% v/v) et homogénéisé dans des tubes matrice de lyse D FastPrepTM (MP BiomedicalsTM) à l'aide d'un FastPrep-24TM Classic (MP BiomedicalsTM). Huit microlitres d'un mix de standards internes marqués contenant 2 μ M d'ABA D6, GA1 D2, SA D6, AIA C13 et Trans-Zeatine D4 (Olchemim) ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes ont été vortexés puis centrifugés 3 min à 4°C, à 14 000 rpm. Le surnageant a été transféré dans des cartouches SPE (Oasis HLB 1 cc, WatersTM) préalablement lavées et équilibrées. Les composés d'intérêt ont été élués en ajoutant 1 mL d'acétonitrile froid (30%) aux colonnes SPE. Les échantillons obtenus ont été concentrés à l'aide d'un concentrateur sous vide SpeedVac. Quarante microlitres d'acétonitrile froid (30%) ont été ajoutés dans chaque tube qui ont été placés dans un bain à ultrason pendant 5 min.

ANALYSE DES PHYTOHORMONES ET DES METABOLITES SECONDAIRES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Les échantillons obtenus à la suite de l'extraction ont été analysés par la plateforme MetaboHub – MetaToul – AgromiX du LRSV par spectrométrie de masse LC-MS selon la méthode suivante. La spectrométrie de masse a été réalisée à l'aide d'un système d'HPLC et UHPLC UltiMate 3000 (ThermoFisher), d'un spectromètre de masse AB Qtrap® 5500 (Sciex) et d'une colonne HPLC Hypersil GOLD aQ (100 x 2.1 mm, 1.9 microns, Thermo Scientific™). La température et le volume d'injection étaient de 5°C et 5 µL). Les paramètres d'élution consistaient en un débit de 0,3 mL / min avec de l'eau acidifiée (acide formique à 0,05%) comme solvant A et de l'acétonitrile acidifiée (acide formique à 0,05%) comme solvant B en utilisant le gradient suivant : 5% B (0 – 1 min), 5 à 96% B (1 – 8 min), 96% B (8 – 9 min), 90 à 5% B (9 – 9.2 min), 5 % B (9.2 – 12 min).

ANALYSE DES DONNEES ISSUES DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Les spectres de masse obtenus ont été analysés par Guillaume Marti de la plateforme MetaboHub – MetaToul – AgromiX du LRSV selon la méthode suivante. Pour les phytohormones, la méthode SRM a été développée pour chaque standard afin d'effectuer la détection des phytohormones et le calcul de la concentration à l'aide d'une courbe d'étalonnage externe. Lorsque disponible, le standard interne marqué a été utilisé pour corriger l'intégration de pics en utilisant le ratio du standard interne. Les jeux de données sur les phytohormones et sur la métabolomique non ciblée ont été normalisés au TIC et la variance unitaire a été mise à l'échelle avant l'analyse de données multivariée. Le processus statistique a été effectué par Guillaume Marti à l'aide du package mixomics du logiciel R (v. 4.1) (Kim-Anh Le Cao, Florian Rohart, Ignacio Gonzalez, Sebastien Dejean with key contributors Benoit Gautier, Francois Bartolo, contributions from Pierre Monget, Jeff Coquery, FangZou Yao and Benoit Liquet. (2016). mixOmics: Omics Data Integration Project. R package version 6.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=mixOmics>). Les données cinétiques de la métabolomique non ciblée ont été transformées en extrayant la pente de chaque composé détecté au cours de la cinétique d'infection. La matrice de pente a été utilisée comme input pour l'analyse discriminante des moindres carrés partiels éparses (sPLS-DA) visant à extraire les composés les plus contribuant à la séparation des groupes. La Heat Map a été générée à partir du modèle sPLS-DA. Les graphiques et les calculs d'anova ont été réalisés avec le logiciel R.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adhikari, T. B., Balaji, B., Breeden, J., and Goodwin, S. B. (2007). Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71, 55–68. doi: 10.1016/j.pmpp.2007.10.004.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier.
- Ahmad, S., Veyrat, N., Gordon-Weeks, R., Zhang, Y., Martin, J., Smart, L., et al. (2011). Benzoxazinoid Metabolites Regulate Innate Immunity against Aphids and Fungi in Maize. *Plant Physiology* 157, 317–327. doi: 10.1104/pp.111.180224.
- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* 17, 73–90. doi: 10.1016/j.tplants.2011.11.002.
- Allen, E. A. (1991). Appressorium Formation in Response to Topographical Signals by 27 Rust Species. *Phytopathology* 81, 323. doi: 10.1094/Phyto-81-323.
- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., and Nepal, M. P. (2018). Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Genes (Basel)* 9, 339. doi: 10.3390/genes9070339.
- Aouini, L. (2018). Durum wheat and septoria tritici blotch: genes and prospects for breeding. doi: 10.18174/443719.
- Arellano-Villagómez, F. C., Guevara-Olvera, L., Zuñiga-Mayo, V. M., E. Cerbantez-Bueno, V., Verdugo-Perales, M., R. Medina, H., et al. (2021). Arabidopsis cysteine-rich receptor-like protein kinase *CRK33* affects stomatal density and drought tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 16, 1905335. doi: 10.1080/15592324.2021.1905335.
- Arnaud, D., and Hwang, I. (2015). A Sophisticated Network of Signaling Pathways Regulates Stomatal Defenses to Bacterial Pathogens. *Molecular Plant* 8, 566–581. doi: 10.1016/j.molp.2014.10.012.
- Arvalis (2006). Blé non alimentaire : vers l'avènement de la bioraffinerie. *Perspectives Agricoles*, 28–32.
- Assaad, F. F., Qiu, J.-L., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., et al. (2004). The PEN1 Syntaxin Defines a Novel Cellular Compartment upon Fungal Attack and Is Required for the Timely Assembly of Papillae. *MBoC* 15, 5118–5129. doi: 10.1091/mbc.e04-02-0140.
- Atta, B. M., Saleem, M., Ali, H., Bilal, M., and Fayyaz, M. (2020). Application of Fluorescence Spectroscopy in Wheat Crop: Early Disease Detection and Associated Molecular Changes. *J Fluoresc* 30, 801–810. doi: 10.1007/s10895-020-02561-8.
- Balakireva, A. V., and Zamyatnin, A. A. (2018). Indispensable Role of Proteases in Plant Innate Immunity. *Int J Mol Sci* 19, 629. doi: 10.3390/ijms19020629.
- Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol Plant Pathol* 20, 1163–1178. doi: 10.1111/mp.12821.

- Battache, M., Lebrun, M.-H., Sakai, K., Soudière, O., Cambon, F., Langin, T., et al. (2022). Blocked at the Stomatal Gate, a Key Step of Wheat Stb16q-Mediated Resistance to *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Plant Science* 13. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.921074> [Accessed July 29, 2022].
- Beck, M., Wyrsh, I., Strutt, J., Wimalasekera, R., Webb, A., Boller, T., et al. (2014). Expression patterns of FLAGELLIN SENSING 2 map to bacterial entry sites in plant shoots and roots. *J Exp Bot* 65, 6487–6498. doi: 10.1093/jxb/eru366.
- Benbow, H. R., Brennan, C. J., Zhou, B., Christodoulou, T., Berry, S., Uauy, C., et al. (2020). Insights into the resistance of a synthetically-derived wheat to *Septoria tritici* blotch disease: less is more. *BMC Plant Biology* 20, 407. doi: 10.1186/s12870-020-02612-z.
- Bender, K. W., Couto, D., Kadota, Y., Macho, A. P., Sklenar, J., Derbyshire, P., et al. (2021). Activation loop phosphorylation of a non-RD receptor kinase initiates plant innate immune signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2108242118. doi: 10.1073/pnas.2108242118.
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y., and King, J. (2009). Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling & Behavior* 4, 158–159. doi: 10.4161/psb.4.2.7688.
- Boddy, L. (2016). “Chapter 8 - Pathogens of Autotrophs,” in *The Fungi (Third Edition)*, eds. S. C. Watkinson, L. Boddy, and N. P. Money (Boston: Academic Press), 245–292. doi: 10.1016/B978-0-12-382034-1.00008-6.
- Boher, B., Brown, I., Nicole, M., Kpemoua, K., Verdier, V., Bonas, U., et al. (1996). “Histology and Cytochemistry of Interactions between Plants and Xanthomonads,” in *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions Developments in Plant Pathology.*, eds. M. Nicole and V. Gianinazzi-Pearson (Dordrecht: Springer Netherlands), 193–210. doi: 10.1007/978-94-009-0189-6_11.
- Boller, T., and 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.
- Borhan, M. H., Van de Wouw, A. P., and Larkan, N. J. (2022). Molecular Interactions Between *Leptosphaeria maculans* and Brassica Species. *Annual Review of Phytopathology* 60, 237–257. doi: 10.1146/annurev-phyto-021621-120602.
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M. A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., et al. (2013). Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology* 13, 31. doi: 10.1186/1471-2229-13-31.
- Bourdais, G., Burdiak, P., Gauthier, A., Nitsch, L., Salojärvi, J., Rayapuram, C., et al. (2015). Large-Scale Phenomics Identifies Primary and Fine-Tuning Roles for CRKs in Responses Related to Oxidative Stress. *PLoS Genet* 11, e1005373. doi: 10.1371/journal.pgen.1005373.
- Brand, A., and Gow, N. A. (2009). Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Curr Opin Microbiol* 12, 350–357. doi: 10.1016/j.mib.2009.05.007.

- Braun, D. M., and Walker, J. C. (1996). Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 70–73. doi: 10.1016/S0968-0004(96)80185-X.
- Braun, E. J., and Howard, R. J. (1994). Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces. *Protoplasma* 181, 202–212. doi: 10.1007/BF01666396.
- Brazier-Hicks, M., Evans, K. M., Gershater, M. C., Puschmann, H., Steel, P. G., and Edwards, R. (2009). The C-Glycosylation of Flavonoids in Cereals*♦. *Journal of Biological Chemistry* 284, 17926–17934. doi: 10.1074/jbc.M109.009258.
- Brennan, C. J., Benbow, H. R., Mullins, E., and Doohan, F. M. (2019). A review of the known unknowns in the early stages of septoria tritici blotch disease of wheat. *Plant Pathol* 68, 1427–1438. doi: 10.1111/ppa.13077.
- Brown, J. K. M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., and Saintenac, C. (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* 79, 33–41. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.017.
- Brunner, P. C., Torriani, S. F. F., Croll, D., Stukenbrock, E. H., and McDonald, B. A. (2013). Coevolution and Life Cycle Specialization of Plant Cell Wall Degrading Enzymes in a Hemibiotrophic Pathogen. *Molecular Biology and Evolution* 30, 1337–1347. doi: 10.1093/molbev/mst041.
- Buckley, T. N. (2019). How do stomata respond to water status? *New Phytologist* 224, 21–36. doi: 10.1111/nph.15899.
- Burdett, H., Bentham, A. R., Williams, S. J., Dodds, P. N., Anderson, P. A., Banfield, M. J., et al. (2019). The Plant “Resistosome”: Structural Insights into Immune Signaling. *Cell Host & Microbe* 26, 193–201. doi: 10.1016/j.chom.2019.07.020.
- Burdiak, P., Rusaczonek, A., Witoń, D., Głow, D., and Karpiński, S. (2015). Cysteine-rich receptor-like kinase CRK5 as a regulator of growth, development, and ultraviolet radiation responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 66, 3325–3337. doi: 10.1093/jxb/erv143.
- Caddell, D. F., Wei, T., Sharma, S., Oh, M.-H., Park, C.-J., Canlas, P., et al. (2018). Four tyrosine residues of the rice immune receptor XA21 are not required for interaction with the co-receptor OsSERK2 or resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PeerJ* 6, e6074. doi: 10.7717/peerj.6074.
- Cannesan, M. A., Durand, C., Burel, C., Gangneux, C., Lerouge, P., Ishii, T., et al. (2012). Effect of Arabinogalactan Proteins from the Root Caps of Pea and *Brassica napus* on *Aphanomyces euteiches* Zoospore Chemotaxis and Germination. *Plant Physiology* 159, 1658–1670. doi: 10.1104/pp.112.198507.
- Cao, Y., Aceti, D. J., Sabat, G., Song, J., Makino, S., Fox, B. G., et al. (2013). Mutations in FLS2 Ser-938 Dissect Signaling Activation in FLS2-Mediated *Arabidopsis* Immunity. *PLOS Pathogens* 9, e1003313. doi: 10.1371/journal.ppat.1003313.

- Carlile, M. J. (1995). "The Success of the Hypha and Mycelium," in *The Growing Fungus*, eds. N. A. R. Gow and G. M. Gadd (Dordrecht: Springer Netherlands), 3–19. doi: 10.1007/978-0-585-27576-5_1.
- Carver, T. L. W., Zeyen, R. J., Bushnell, W. R., and Robbins, M. P. (1994a). Inhibition of phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D.C.). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44, 261–272. doi: 10.1016/S0885-5765(05)80029-3.
- Carver, T. L. W., Zeyen, R. J., Robbins, M. P., Vance, C. P., and Boyles, D. A. (1994b). Suppression of host cinnamyl alcohol dehydrogenase and phenylalanine ammonia lyase increases oat epidermal cell susceptibility to powdery mildew penetration. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44, 243–259. doi: 10.1016/S0885-5765(05)80028-1.
- Chakraborty, S., Moeder, W., and Yoshioka, K. (2017). "Plant Immunity," in *Reference Module in Life Sciences* (Elsevier), B9780128096338120000. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.12154-5.
- Chan, C., Panzeri, D., Okuma, E., Töldsepp, K., Wang, Y.-Y., Louh, G.-Y., et al. (2020). STRESS INDUCED FACTOR 2 Regulates Arabidopsis Stomatal Immunity through Phosphorylation of the Anion Channel SLAC1. *Plant Cell* 32, 2216–2236. doi: 10.1105/tpc.19.00578.
- Chartrain, L., Berry, S. T., and Brown, J. K. M. (2005a). Resistance of Wheat Line Kavkaz-K4500 L.6.A.4 to Septoria Tritici Blotch Controlled by Isolate-Specific Resistance Genes. *Phytopathology*® 95, 664–671. doi: 10.1094/PHYTO-95-0664.
- Chartrain, L., Brading, P. A., and Brown, J. K. M. (2005b). Presence of the Stb6 gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in cultivars used in wheat-breeding programmes worldwide. *Plant Pathology* 54, 134–143. doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01164.x.
- Chauhan, J. S., Rao, A., and Raghava, G. P. S. (2013). In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. *PLOS ONE* 8, e67008. doi: 10.1371/journal.pone.0067008.
- Chen, C.-Y., and Howlett, B. J. (1996). Rapid necrosis of guard cells is associated with the arrest of fungal growth in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) inoculated with avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48, 73–81. doi: 10.1006/pmpp.1996.0007.
- Chen, X., Chern, M., Canlas, P. E., Jiang, C., Ruan, D., Cao, P., et al. (2010). A Conserved Threonine Residue in the Juxtamembrane Domain of the XA21 Pattern Recognition Receptor Is Critical for Kinase Autophosphorylation and XA21-mediated Immunity. *J. Biol. Chem.* 285, 10454–10463. doi: 10.1074/jbc.M109.093427.
- Chowdhury, J., Henderson, M., Schweizer, P., Burton, R. A., Fincher, G. B., and Little, A. (2014). Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *New Phytologist* 204, 650–660. doi: 10.1111/nph.12974.

- Chowdhury, J., Lück, S., Rajaraman, J., Douchkov, D., Shirley, N. J., Schwerdt, J. G., et al. (2017). Altered Expression of Genes Implicated in Xylan Biosynthesis Affects Penetration Resistance against Powdery Mildew. *Frontiers in Plant Science* 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00445> [Accessed August 30, 2022].
- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12, 307–328. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x.
- Cohen, L., and Eyal, Z. (1993). The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathology* 42, 737–743. doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01560.x.
- Collins, T. J., Moerschbacher, B. M., and Read, N. D. (2001). Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58, 259–266. doi: 10.1006/pmpp.2001.0335.
- Cook, D. E., Mesarich, C. H., and Thomma, B. P. H. J. (2015). Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 541–563. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120114.
- Cousin, A., Mehrabi, R., Guilleroux, M., Dufresne, M., Van Der Lee, T., Waalwijk, C., et al. (2006). The MAP kinase-encoding gene *MgFus3* of the non-appressorium phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* is required for penetration and *in vitro* pycnidia formation. *Molecular Plant Pathology* 7, 269–278. doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00337.x.
- Curtis, B. C. (2002). Wheat in the world. Available at: <https://www.fao.org/3/y4011e/y4011e04.htm#bm04> [Accessed March 7, 2022].
- d'Amour, C. B., Wenz, L., Kalkuhl, M., Steckel, J. C., and Creutzig, F. (2016). Teleconnected food supply shocks. *Environ. Res. Lett.* 11, 035007. doi: 10.1088/1748-9326/11/3/035007.
- Danhorn, T., and Fuqua, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 61, 401–422. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093316.
- David, L., Harmon, A. C., and Chen, S. (2019). Plant immune responses - from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. *Plant Signal Behav* 14, e1588667. doi: 10.1080/15592324.2019.1588667.
- de Borba, M. C., Velho, A. C., de Freitas, M. B., Holvoet, M., Maia-Grondard, A., Baltenweck, R., et al. (2022). A Laminarin-Based Formulation Protects Wheat Against Zymoseptoria tritici via Direct Antifungal Activity and Elicitation of Host Defense-Related Genes. *Plant Disease* 106, 1408–1418. doi: 10.1094/PDIS-08-21-1675-RE.
- de Borba, M. C., Velho, A. C., Maia-Grondard, A., Baltenweck, R., Magnin-Robert, M., Randoux, B., et al. (2021). The Algal Polysaccharide Ulvan Induces Resistance in Wheat Against Zymoseptoria tritici Without Major Alteration of Leaf Metabolome. *Frontiers in Plant Science* 12. Available at:

- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.703712> [Accessed September 24, 2022].
- de Oliveira, M. V. V., Xu, G., Li, B., de Souza Vespoli, L., Meng, X., Chen, X., et al. (2016). Specific control of Arabidopsis BAK1/SERK4-regulated cell death by protein glycosylation. *Nature Plants* 2, 15218. doi: 10.1038/nplants.2015.218.
- De Wit, P. J. G. M. (2000). “The Cladosporium Fulvum–Tomato Interaction,” in *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, eds. A. J. Slusarenko, R. S. S. Fraser, and L. C. van Loon (Dordrecht: Springer Netherlands), 53–75. doi: 10.1007/978-94-011-3937-3_3.
- DeFalco, T. A., and Zipfel, C. (2021). Molecular mechanisms of early plant pattern-triggered immune signaling. *Molecular Cell* 81, 3449–3467. doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.029.
- Deising, H., Nicholson, R., Haug, M., Howard, R., and Mendgen, K. (1992). Adhesion Pad Formation and the Involvement of Cutinase and Esterases in the Attachment of Uredospores to the Host Cuticle. *Plant Cell* 4, 1101–1111.
- Del Mar Rojas-Molina, M., Rubiales, D., Prats, E., and Sillero, J. C. (2007). Effects of Phenylpropanoid and Energetic Metabolism Inhibition on Faba Bean Resistance Mechanisms to Rust. *Phytopathology* 97, 60–65. doi: 10.1094/PHYTO-97-0060.
- Desclos-Theveniau, M., Arnaud, D., Huang, T.-Y., Lin, G. J.-C., Chen, W.-Y., Lin, Y.-C., et al. (2012). The Arabidopsis Lectin Receptor Kinase LecRK-V.5 Represses Stomatal Immunity Induced by Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. *PLOS Pathogens* 8, e1002513. doi: 10.1371/journal.ppat.1002513.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounloham, M., Boucher, C., et al. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 8024–8029. doi: 10.1073/pnas.1230660100.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M. S. S., and Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3, 371–390. doi: 10.1046/j.1364-3703.2002.00131.x.
- D’Odorico, P., Carr, J. A., Laio, F., Ridolfi, L., and Vandoni, S. (2014). Feeding humanity through global food trade. *Earth’s Future* 2, 458–469. doi: 10.1002/2014EF000250.
- Doehlemann, G., and Hemetsberger, C. (2013). Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist* 198, 1001–1016. doi: 10.1111/nph.12277.
- Doorn, J. van (1994). Partial Characterization of Fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*. *MPMI* 7, 334. doi: 10.1094/MPMI-7-0334.
- Driouich, A., Follet-Gueye, M.-L., Vicré-Gibouin, M., and Hawes, M. (2013). Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. *Current Opinion in Plant Biology* 16, 489–495. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.010.

- Dubey, N., and Singh, K. (2018). "Role of NBS-LRR Proteins in Plant Defense," in *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*, eds. A. Singh and I. K. Singh (Singapore: Springer), 115–138. doi: 10.1007/978-981-10-7371-7_5.
- Duncan, K. E., and Howard, R. J. (2000). Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research* 104, 1074–1082. doi: 10.1017/S0953756299002294.
- Edwards, M. C., and Bowling, D. J. F. (1986). The growth of rust germ tubes towards stomata in relation to pH gradients. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29, 185–196. doi: 10.1016/S0048-4059(86)80020-0.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., et al. (2013). Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in Arabidopsis. *Plant Physiology* 161, 1433–1444. doi: 10.1104/pp.112.211011.
- Epstein, L., and Nicholson, R. L. (1997). "Adhesion of Spores and Hyphae to Plant Surfaces," in *Plant Relationships: Part A The Mycota.*, eds. G. C. Carroll and P. Tudzynski (Berlin, Heidelberg: Springer), 11–25. doi: 10.1007/978-3-662-10370-8_2.
- Facts & Figures on Food and Biodiversity | IDRC - International Development Research Centre Available at: <https://www.idrc.ca/en/research-in-action/facts-figures-food-and-biodiversity> [Accessed March 7, 2022].
- Fantozzi, E., Kilaru, S., Gurr, S. J., and Steinberg, G. (2021). Asynchronous development of *Zymoseptoria tritici* infection in wheat. *Fungal Genetics and Biology* 146, 103504. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103504.
- FAOSTAT - Crops and livestock products Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [Accessed March 7, 2022].
- FAOSTAT - Food Balances (2010-) Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS> [Accessed March 7, 2022].
- Fatima, U., and Senthil-Kumar, M. (2015). Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science* 6. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00750> [Accessed August 23, 2022].
- Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., et al. (2012). A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* 485, 114–118. doi: 10.1038/nature10962.
- Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275–296. doi: 10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- Fones, H., and Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* 79, 3–7. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.004.

- Fones, H. N., Eyles, C. J., Kay, W., Cowper, J., and Gurr, S. J. (2017). A role for random, humidity-dependent epiphytic growth prior to invasion of wheat by *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* 106, 51–60. doi: 10.1016/j.fgb.2017.07.002.
- Fraser, C. M., and Chapple, C. (2011). The Phenylpropanoid Pathway in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 9, e0152. doi: 10.1199/tab.0152.
- Gabriëls, S. H. E. J., Vossen, J. H., Ekengren, S. K., Ooijen, G. van, Abd-El-Halim, A. M., Berg, G. C. M. van den, et al. (2007). An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra- and intracellular resistance proteins. *The Plant Journal* 50, 14–28. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03027.x.
- Ghaffary, S. M. T., Chawade, A., and Singh, P. K. (2018). Practical breeding strategies to improve resistance to *Septoria tritici* blotch of wheat. *Euphytica* 214, 122. doi: 10.1007/s10681-018-2205-4.
- Gish, L. A., and Clark, S. E. (2011). The RLK/Pelle family of kinases: The RLK/Pelle family of kinases. *The Plant Journal* 66, 117–127. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04518.x.
- Gong, B.-Q., Guo, J., Zhang, N., Yao, X., Wang, H.-B., and Li, J.-F. (2019). Cross-Microbial Protection via Priming a Conserved Immune Co-Receptor through Juxtamembrane Phosphorylation in Plants. *Cell Host & Microbe* 26, 810-822.e7. doi: 10.1016/j.chom.2019.10.010.
- Goodwin, S. B., Ben M'Barek, S., Dhillon, B., Wittenberg, A. H. J., Crane, C. F., Hane, J. K., et al. (2011). Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genet* 7, e1002070. doi: 10.1371/journal.pgen.1002070.
- Grimmer, M. K., John Foulkes, M., and Paveley, N. D. (2012). Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *Journal of Experimental Botany* 63, 4321–4331. doi: 10.1093/jxb/ers143.
- Grote, U., Fasse, A., Nguyen, T. T., and Erenstein, O. (2021). Food Security and the Dynamics of Wheat and Maize Value Chains in Africa and Asia. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2020.617009> [Accessed March 7, 2022].
- Guimarães, R. L., and Stotz, H. U. (2004). Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Deregulates Guard Cells during Infection. *Plant Physiol* 136, 3703–3711. doi: 10.1104/pp.104.049650.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S., and Somers, D. J. (2012). Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* 7, e40695. doi: 10.1371/journal.pone.0040695.
- Guo, F., Wu, T., Shen, F., Xu, G., Qi, H., and Zhang, Z. (2021). The cysteine-rich receptor-like kinase TaCRK3 contributes to defense against *Rhizoctonia cerealis* in wheat. *Journal of Experimental Botany*, erab328. doi: 10.1093/jxb/erab328.

- Gutiérrez-Moya, E., Adenso-Díaz, B., and Lozano, S. (2020). Analysis and vulnerability of the international wheat trade network. *Food Secur*, 1–16. doi: 10.1007/s12571-020-01117-9.
- Hammond, K. E., Lewis, B. G., and Musa, T. M. (1985). A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* 34, 557–565. doi: 10.1111/j.1365-3059.1985.tb01407.x.
- Hammond-Kosack, K. E. (1994). Incomplete Dominance of Tomato *Cf* Genes for Resistance to *Cladosporium fulvum*. *MPMI* 7, 58. doi: 10.1094/MPMI-7-0058.
- Han, Z., Sun, Y., and Chai, J. (2014). Structural insight into the activation of plant receptor kinases. *Current Opinion in Plant Biology* 20, 55–63. doi: 10.1016/j.pbi.2014.04.008.
- Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification1. *The FASEB Journal* 9, 576–596. doi: 10.1096/fasebj.9.8.7768349.
- Hardham, A. R., Takemoto, D., and White, R. G. (2008). Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of Arabidopsis epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biology* 8, 63. doi: 10.1186/1471-2229-8-63.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 249–273. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.091014.
- Haueisen, J., Möller, M., Eschenbrenner, C. J., Grandaubert, J., Seybold, H., Adamiak, H., et al. (2019). Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecology and Evolution* 9, 275–294. doi: 10.1002/ece3.4724.
- Häweker, H., Rips, S., Koiwa, H., Salomon, S., Saijo, Y., Chinchilla, D., et al. (2010). Pattern Recognition Receptors Require N-Glycosylation to Mediate Plant Immunity2. *Journal of Biological Chemistry* 285, 4629–4636. doi: 10.1074/jbc.M109.063073.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W., and Deising, H. B. (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168, 51–62. doi: 10.1016/j.jplph.2010.06.014.
- Hou, S., Liu, Z., Shen, H., and Wu, D. (2019). Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Frontiers in Plant Science* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00646> [Accessed May 2, 2022].
- Howlett, B. J. (2004). Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26, 245–252. doi: 10.1080/07060660409507141.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101–127. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094325.

- Hunter, K., Kimura, S., Rokka, A., Tran, H. C., Toyota, M., Kukkonen, J. P., et al. (2019). CRK2 Enhances Salt Tolerance by Regulating Callose Deposition in Connection with PLD α 1. *Plant Physiol.* 180, 2004–2021. doi: 10.1104/pp.19.00560.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., and He, S. Y. (2014). Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Molecular Plant* 7, 1267–1287. doi: 10.1093/mp/ssu049.
- Irieda, H. (2022). Emerging Roles of Motile Epidermal Chloroplasts in Plant Immunity. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 4043. doi: 10.3390/ijms23074043.
- Jashni, M. K., Mehrabi, R., Collemare, J., Mesarich, C. H., and de Wit, P. J. G. M. (2015). The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* 6. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00584> [Accessed September 3, 2022].
- Jaswal, R., Kiran, K., Rajarammohan, S., Dubey, H., Singh, P. K., Sharma, Y., et al. (2020). Effector Biology of Biotrophic Plant Fungal Pathogens: Current Advances and Future Prospects. *Microbiological Research* 241, 126567. doi: 10.1016/j.micres.2020.126567.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 19, 4004–4014. doi: 10.1093/emboj/19.15.4004.
- Jiang, Y., Han, B., Zhang, H., Mariappan, K. G., Bigeard, J., Colcombet, J., et al. (2019). MAP 4K4 associates with BIK 1 to regulate plant innate immunity. *EMBO Rep* 20. doi: 10.15252/embr.201947965.
- Jing, H., Lovell, D., Gutteridge, R., Jenk, D., Korniyukhin, D., Mitrofanova, O. P., et al. (2008). Phenotypic and genetic analysis of the *Triticum monococcum* – *Mycosphaerella graminicola* interaction. *New Phytologist* 179, 1121–1132. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02526.x.
- Joosten, M., and de Wit, P. (1999). THE TOMATO – *LADOSPORIUM FULVUM* INTERACTION: A Versatile Experimental System to Study Plant-Pathogen Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 335–367. doi: 10.1146/annurev.phyto.37.1.335.
- Jose, J., Ghantasala, S., and Roy Choudhury, S. (2020). Arabidopsis Transmembrane Receptor-Like Kinases (RLKs): A Bridge between Extracellular Signal and Intracellular Regulatory Machinery. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 4000. doi: 10.3390/ijms21114000.
- Kanyuka, K., and Rudd, J. J. (2019). Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. *Curr Opin Plant Biol* 50, 1–8. doi: 10.1016/j.pbi.2019.02.005.
- Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., et al. (2012). Arms race co-evolution of Magnaporthe oryzae AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *The Plant Journal* 72, 894–907. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05110.x.

- Karre, S., Kumar, A., Dhokane, D., and Kushalappa, A. C. (2017). Metabolo-transcriptome profiling of barley reveals induction of chitin elicitor receptor kinase gene (HvCERK1) conferring resistance against *Fusarium graminearum*. *Plant Mol Biol* 93, 247–267. doi: 10.1007/s11103-016-0559-3.
- Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 2793–2807. doi: 10.1098/rstb.2010.0149.
- Kema, G. (1996). Histology of the Pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in Wheat. *Phytopathology* 86, 777. doi: 10.1094/Phyto-86-777.
- Kema, G. H. J., van der Lee, T. A. J., Mendes, O., Verstappen, E. C. P., Lankhorst, R. K., Sandbrink, H., et al. (2008). Large-Scale Gene Discovery in the Septoria Tritici Blotch Fungus *Mycosphaerella graminicola* with a Focus on In Planta Expression. *MPMI* 21, 1249–1260. doi: 10.1094/MPMI-21-9-1249.
- Keon, J., Antoniow, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J. L., Baker, J. M., et al. (2007). Transcriptional Adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to Programmed Cell Death (PCD) of Its Susceptible Wheat Host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 178–193. doi: 10.1094/MPMI-20-2-0178.
- Kettles, G. J., and Kanyuka, K. (2016). Dissecting the Molecular Interactions between Wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Plant Sci.* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00508.
- Kildea, S., Byrne, J. j, Cucak, M., and Hutton, F. (2020). First report of virulence to the septoria tritici blotch resistance gene *Stb16q* in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *New Disease Reports* 41, 13–13. doi: 10.5197/j.2044-0588.2020.041.013.
- Kim, H., Ridenour, J. B., Dunkle, L. D., and Bluhm, B. H. (2011). Regulation of Stomatal Tropism and Infection by Light in *Cercospora zeaе-maydis*: Evidence for Coordinated Host/Pathogen Responses to Photoperiod? *PLOS Pathogens* 7, e1002113. doi: 10.1371/journal.ppat.1002113.
- Kimura, S., Hunter, K., Vaahtera, L., Tran, H. C., Citterico, M., Vaattovaara, A., et al. (2020). CRK2 and C-terminal Phosphorylation of NADPH Oxidase RBOHD Regulate Reactive Oxygen Species Production in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.19.00525.
- Kimura, S., Waszczak, C., Hunter, K., and Wrzaczek, M. (2017). Bound by Fate: The Role of Reactive Oxygen Species in Receptor-Like Kinase Signaling. *Plant Cell* 29, 638–654. doi: 10.1105/tpc.16.00947.
- Kochman, J. K., and Brown, J. F. (1976). Host and environmental effects on the penetration of oats by *Puccinia graminis avenae* and *Puccinia coronata avenae*. *Ann Applied Biology* 82, 251–258. doi: 10.1111/j.1744-7348.1976.tb00560.x.
- Koeck, M., Hardham, A. R., and Dodds, P. N. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell Microbiol* 13, 1849–1857. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01665.x.

- Kourelis, J., and van der Hoorn, R. A. L. (2018). Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *The Plant Cell* 30, 285–299. doi: 10.1105/tpc.17.00579.
- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., et al. (2009). Internalization of *Salmonella enterica* in Leaves Is Induced by Light and Involves Chemotaxis and Penetration through Open Stomata. *Appl Environ Microbiol* 75, 6076–6086. doi: 10.1128/AEM.01084-09.
- Kruger, W. M., Carver, T. L. W., and Zeyen, R. J. (2002). Effects of inhibiting phenolic biosynthesis on penetration resistance of barley isolines containing seven powdery mildew resistance genes or alleles. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61, 41–51. doi: 10.1006/pmpp.2002.0415.
- Künstler, A., Bacsó, R., Gullner, G., Hafez, Y. M., and Király, L. (2016). Staying alive – is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 93, 75–84. doi: 10.1016/j.pmpp.2016.01.003.
- Lal, N. K., Nagalakshmi, U., Hurlburt, N. K., Flores, R., Bak, A., Sone, P., et al. (2018). The Receptor-like Cytoplasmic Kinase BIK1 Localizes to the Nucleus and Regulates Defense Hormone Expression during Plant Innate Immunity. *Cell Host & Microbe* 23, 485–497.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.010.
- Laluk, K., and Mengiste, T. (2010). Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? *Arabidopsis Book* 8, e0136. doi: 10.1199/tab.0136.
- Lamb, C., and Dixon, R. A. (1997). THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48, 251–275. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.251.
- Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., and Zivy, M. (2017). X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *J Proteome Res* 16, 494–503. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00632.
- Langlands-Perry, C., Cuenin, M., Bergez, C., Krima, S. B., Gélisse, S., Sourdille, P., et al. (2022). Resistance of the Wheat Cultivar ‘Renan’ to Septoria Leaf Blotch Explained by a Combination of Strain Specific and Strain Non-Specific QTL Mapped on an Ultra-Dense Genetic Map. *Genes* 13, 100. doi: 10.3390/genes13010100.
- Lazarovits, G., and Higgins, V. J. (1976). Histological comparison of *Cladosporium fulvum* race 1 on immune, resistant, and susceptible tomato varieties. *Can. J. Bot.* 54, 224–234. doi: 10.1139/b76-022.
- Lazazzara, V., Bueschl, C., Parich, A., Pertot, I., Schuhmacher, R., and Perazzolli, M. (2018). Downy mildew symptoms on grapevines can be reduced by volatile organic compounds of resistant genotypes. *Sci Rep* 8, 1618. doi: 10.1038/s41598-018-19776-2.
- Lee, W.-S., Rudd, J. J., Hammond-Kosack, K. E., and Kanyuka, K. (2014). *Mycosphaerella graminicola* LysM Effector-Mediated Stealth Pathogenesis Subverts Recognition

- Through Both CERK1 and CEBiP Homologues in Wheat. *MPMI* 27, 236–243. doi: 10.1094/MPMI-07-13-0201-R.
- Leonard, S., Hommais, F., Nasser, W., and Reverchon, S. (2017). Plant–phytopathogen interactions: bacterial responses to environmental and plant stimuli. *Environmental Microbiology* 19, 1689–1716. doi: 10.1111/1462-2920.13611.
- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., et al. (2014). The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host & Microbe* 15, 329–338. doi: 10.1016/j.chom.2014.02.009.
- Liebrand, T. W. H., van den Berg, G. C. M., Zhang, Z., Smit, P., Cordewener, J. H. G., America, A. H. P., et al. (2013). Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 10010–10015. doi: 10.1073/pnas.1220015110.
- Lindow, S. E., and Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69, 1875–1883. doi: 10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003.
- Lipka, U., Fuchs, R., and Lipka, V. (2008). Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 404–411. doi: 10.1016/j.pbi.2008.04.004.
- Liu, J., Elmore, J. M., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Staskawicz, B. J., and Coaker, G. (2009). RIN4 Functions with Plasma Membrane H⁺-ATPases to Regulate Stomatal Apertures during Pathogen Attack. *PLOS Biology* 7, e1000139. doi: 10.1371/journal.pbio.1000139.
- Liu, J., Elmore, J. M., Lin, Z.-J. D., and Coaker, G. (2011). A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host Microbe* 9, 137–146. doi: 10.1016/j.chom.2011.01.010.
- Liu, J., Liu, B., Chen, S., Gong, B.-Q., Chen, L., Zhou, Q., et al. (2018). A Tyrosine Phosphorylation Cycle Regulates Fungal Activation of a Plant Receptor Ser/Thr Kinase. *Cell Host & Microbe* 23, 241–253.e6. doi: 10.1016/j.chom.2017.12.005.
- Liu, J. Q., and Harder, D. E. (1996). Components of resistance in barley to stem rust: pre- and post-penetration development in seedling and adult plant leaves. *Can. J. Bot.* 74, 1305–1312. doi: 10.1139/b96-158.
- Liu, S., Jiang, J., Ma, Z., Xiao, M., Yang, L., Tian, B., et al. (2022a). The Role of Hydroxycinnamic Acid Amide Pathway in Plant Immunity. *Frontiers in Plant Science* 13. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2022.922119> [Accessed June 24, 2022].
- Liu, S., Xie, L., Su, J., Tian, B., Fang, A., Yu, Y., et al. (2022b). Integrated Metabolo-transcriptomics Reveals the Defense Response of Homogentisic Acid in Wheat against *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *J. Agric. Food Chem.* 70, 3719–3729. doi: 10.1021/acs.jafc.2c00231.

- Liu, Z., Hou, S., Rodrigues, O., Wang, P., Luo, D., Munemasa, S., et al. (2022c). Phyto cytokine signalling reopens stomata in plant immunity and water loss. *Nature* 605, 332–339. doi: 10.1038/s41586-022-04684-3.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 496–501. doi: 10.1073/pnas.0909705107.
- Lu, K., Liang, S., Wu, Z., Bi, C., Yu, Y.-T., Wang, X.-F., et al. (2016). Overexpression of an Arabidopsis cysteine-rich receptor-like protein kinase, CRK5, enhances abscisic acid sensitivity and confers drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 67, 5009–5027. doi: 10.1093/jxb/erw266.
- Luo, X., Wu, W., Liang, Y., Xu, N., Wang, Z., Zou, H., et al. (2020). Tyrosine phosphorylation of the lectin receptor-like kinase LORE regulates plant immunity. *EMBO J* 39. doi: 10.15252/embj.2019102856.
- Lyimo, H. J. F., Pratt, R. C., and Mnyuku, R. S. O. W. (2013). Infection process in resistant and susceptible maize (*Zea mays* L.) genotypes to *Cercospora zeae-maydis* (type II). *Plant Protect. Sci.* 49, 11–18. doi: 10.17221/57/2011-PPS.
- Ma, L.-S., Wang, L., Trippel, C., Mendoza-Mendoza, A., Ullmann, S., Moretti, M., et al. (2018). The *Ustilago maydis* repetitive effector Rsp3 blocks the antifungal activity of mannose-binding maize proteins. *Nature Communications* 9. doi: 10.1038/s41467-018-04149-0.
- Macho, A. P. (2016). Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytologist* 210, 51–57. doi: 10.1111/nph.13605.
- Macho, A. P., Schwessinger, B., Ntoukakis, V., Brutus, A., Segonzac, C., Roy, S., et al. (2014). A Bacterial Tyrosine Phosphatase Inhibits Plant Pattern Recognition Receptor Activation. *Science* 343, 1509–1512. doi: 10.1126/science.1248849.
- Macho, A. P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell* 54, 263–272. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.028.
- Malinovsky, F. G., Fangel, J. U., and Willats, W. G. T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science* 5. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00178> [Accessed May 18, 2022].
- Mapuranga, J., Zhang, N., Zhang, L., Chang, J., and Yang, W. (2022). Infection Strategies and Pathogenicity of Biotrophic Plant Fungal Pathogens. *Frontiers in Microbiology* 13. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.799396> [Accessed August 17, 2022].
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., et al. (2011). Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat. *Plant Physiology* 156, 756–769. doi: 10.1104/pp.111.176347.

- Mason, N. M., Jayne, T. S., and Shiferaw, B. A. eds. (2012). *Wheat Consumption in Sub-Saharan Africa: Trends, Drivers, and Policy Implications*. doi: 10.22004/ag.econ.146936.
- Matilla, M. A., and Krell, T. (2018). The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS Microbiology Reviews* 42, fux052. doi: 10.1093/femsre/fux052.
- Melotto, M., and Kunkel, B. N. (2013). “Virulence Strategies of Plant Pathogenic Bacteria,” in *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*, eds. E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (Berlin, Heidelberg: Springer), 61–82. doi: 10.1007/978-3-642-30141-4_62.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S. Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* 126, 969–980. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.054.
- Mendgen, K., Hahn, M., and Deising, H. (1996). MORPHOGENESIS AND MECHANISMS OF PENETRATION BY PLANT PATHOGENIC FUNGI. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 367–386. doi: 10.1146/annurev.phyto.34.1.367.
- Meng, S., Torto-Alalibo, T., Chibucos, M. C., Tyler, B. M., and Dean, R. A. (2009). Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms. *BMC Microbiology* 9, S7. doi: 10.1186/1471-2180-9-S1-S7.
- Mhedbi-Hajri, N., Darrasse, A., Pigné, S., Durand, K., Fouteau, S., Barbe, V., et al. (2011). Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evol Biol* 11, 67. doi: 10.1186/1471-2148-11-67.
- Miernyk, J. A. (1999). Protein Folding in the Plant Cell. *Plant Physiology* 121, 695–703. doi: 10.1104/pp.121.3.695.
- Misaghi, I. J. (1982). “Attraction to and Penetration of Plants by Pathogens,” in *Physiology and Biochemistry of Plant-Pathogen Interactions* (Boston, MA: Springer US), 5–15. doi: 10.1007/978-1-4684-1149-2_2.
- Mitra, S. K., Chen, R., Dhandaydham, M., Wang, X., Blackburn, R. K., Kota, U., et al. (2015). An autophosphorylation site database for leucine-rich repeat receptor-like kinases in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 82, 1042–1060. doi: 10.1111/tpj.12863.
- Miyakawa, T., Hatano, K. -i., Miyauchi, Y., Suwa, Y. -i., Sawano, Y., and Tanokura, M. (2014). A Secreted Protein with Plant-Specific Cysteine-Rich Motif Functions as a Mannose-Binding Lectin That Exhibits Antifungal Activity. *PLANT PHYSIOLOGY* 166, 766–778. doi: 10.1104/pp.114.242636.
- Mochizuki, S., Minami, E., and Nishizawa, Y. (2015). Live-cell imaging of rice cytological changes reveals the importance of host vacuole maintenance for biotrophic invasion by blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *MicrobiologyOpen* 4, 952–966. doi: 10.1002/mbo3.304.
- Mondal, S. N., and Timmer, L. W. (2003). Relationship of Epiphytic Growth of *Mycosphaerella citri* to Greasy Spot Development on Citrus and to Disease Control with Fenbuconazole. *Plant Disease* 87, 186–192. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.2.186.

- Montilla-Bascón, G., Rubiales, D., Altabella, T., and Prats, E. (2016). Free polyamine and polyamine regulation during pre-penetration and penetration resistance events in oat against crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*). *Plant Pathology* 65, 392–401. doi: 10.1111/ppa.12423.
- Mühlenbeck, H., Bender, K. W., and Zipfel, C. (2021). Importance of tyrosine phosphorylation for transmembrane signaling in plants. *Biochem J* 478, 2759–2774. doi: 10.1042/BCJ20210202.
- Muthamilarasan, M., and Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *J Biosci* 38, 433–449. doi: 10.1007/s12038-013-9302-2.
- Nadarasah, G., and Stavrinides, J. (2011). Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 35, 555–575. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00264.x.
- Naoumkina, M. A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Dai, X., Zhao, P. X., and Dixon, R. A. (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology* 11, 829–846. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00648.x.
- Nelson, G. C., Rosegrant, M. W., Palazzo, A., Gray, I., Ingersoll, C., Robertson, R., et al. (2010). *Food Security, Farming, and Climate Change to 2050: Scenarios, Results, Policy Options*. Intl Food Policy Res Inst.
- Neri, F., Mari, M., Brigati, S., and Bertolini, P. (2007). Fungicidal Activity of Plant Volatile Compounds for Controlling *Monilinia laxa* in Stone Fruit. *Plant Disease* 91, 30–35. doi: 10.1094/PD-91-0030.
- Nicholson, R. L., and Epstein, L. (1991). “Adhesion of Fungi to the Plant Surface,” in *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*, eds. G. T. Cole and H. C. Hoch (Boston, MA: Springer US), 3–23. doi: 10.1007/978-1-4899-2635-7_1.
- Niks, R. E., Qi, X., and Marcel, T. C. (2015). Quantitative Resistance to Biotrophic Filamentous Plant Pathogens: Concepts, Misconceptions, and Mechanisms. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 445–470. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-115928.
- Novo, M., Silvar, C., Merino, F., Martínez-Cortés, T., Lu, F., Ralph, J., et al. (2017). Deciphering the role of the phenylpropanoid metabolism in the tolerance of *Capsicum annum* L. to *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Science* 258, 12–20. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.01.014.
- Nunes, T. D. G., Zhang, D., and Raissig, M. T. (2019). Form, development and function of grass stomata. *Plant J*, tpj.14552. doi: 10.1111/tpj.14552.
- O’Driscoll, A., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J., and Mullins, E. (2014). The wheat–*Septoria* conflict: a new front opening up? *Trends in Plant Science* 19, 602–610. doi: 10.1016/j.tplants.2014.04.011.
- Oh, M.-H., Clouse, S., and Huber, S. (2012). Tyrosine Phosphorylation of the BRI1 Receptor Kinase Occurs via a Post-Translational Modification and is Activated by the Juxtamembrane Domain. *Frontiers in Plant Science* 3. Available at:

- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2012.00175> [Accessed August 9, 2022].
- Oh, M.-H., Ray, W. K., Huber, S. C., Asara, J. M., Gage, D. A., and Clouse, S. D. (2000). Recombinant Brassinosteroid Insensitive 1 Receptor-Like Kinase Autophosphorylates on Serine and Threonine Residues and Phosphorylates a Conserved Peptide Motif in Vitro. *Plant Physiol.* 124, 751–766. doi: 10.1104/pp.124.2.751.
- Oh, M.-H., Wang, X., Kota, U., Goshe, M. B., Clouse, S. D., and Huber, S. C. (2009). Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 658–663. doi: 10.1073/pnas.0810249106.
- Ökmen, B., and de Wit, P. J. G. M. (2012). “Cladosporium fulvum–Tomato Pathosystem: Fungal Infection Strategy and Plant Responses,” in *Molecular Plant Immunity* (John Wiley & Sons, Ltd), 211–224. doi: 10.1002/9781118481431.ch10.
- Ors, M. E., Randoux, B., Selim, S., Siah, A., Couleaud, G., Maumené, C., et al. (2018). Cultivar-dependent partial resistance and associated defence mechanisms in wheat against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 67, 561–572. doi: 10.1111/ppa.12760.
- Orton, E. S., Deller, S., and Brown, J. K. M. (2011). *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control. *Molecular Plant Pathology* 12, 413–424. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00688.x.
- Orton, E. S., Rudd, J. J., and Brown, J. K. M. (2017). Early molecular signatures of responses of wheat to *Zymoseptoria tritici* in compatible and incompatible interactions. *Plant Pathol* 66, 450–459. doi: 10.1111/ppa.12633.
- Palma-Guerrero, J., Torriani, S. F. F., Zala, M., Carter, D., Courbot, M., Rudd, J. J., et al. (2016). Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Molecular Plant Pathology* 17, 845–859. doi: 10.1111/mpp.12333.
- Pasechnik, T. D., Lapikova, V. P., and Aver'yanov, A. A. (1997). Inhibition of pre-penetration development of blast fungus during the infection of resistant rice cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 103, 747–750. doi: 10.1023/A:1008650104357.
- Perraki, A., DeFalco, T. A., Derbyshire, P., Avila, J., Séré, D., Sklenar, J., et al. (2018). Phosphocode-dependent functional dichotomy of a common co-receptor in plant signalling. *Nature* 561, 248–252. doi: 10.1038/s41586-018-0471-x.
- Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B., and Bacic, A. (2012). Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nat Protoc* 7, 1590–1607. doi: 10.1038/nprot.2012.081.
- Petutschnig, E. K., Jones, A. M. E., Serazetdinova, L., Lipka, U., and Lipka, V. (2010). The Lysin Motif Receptor-like Kinase (LYM-RLK) CERK1 Is a Major Chitin-binding Protein in Arabidopsis thaliana and Subject to Chitin-induced Phosphorylation*♦. *Journal of Biological Chemistry* 285, 28902–28911. doi: 10.1074/jbc.M110.116657.

- Peyraud, R., Dubiella, U., Barbacci, A., Genin, S., Raffaele, S., and Roby, D. (2017). Advances on plant–pathogen interactions from molecular toward systems biology perspectives. *The Plant Journal* 90, 720–737. doi: 10.1111/tpj.13429.
- Pfeilmeier, S., Caly, D. L., and Malone, J. G. (2016). Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective. *Mol Plant Pathol* 17, 1298–1313. doi: 10.1111/mpp.12427.
- Pitsili, E., Phukan, U. J., and Coll, N. S. (2020). Cell Death in Plant Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12, a036483. doi: 10.1101/cshperspect.a036483.
- Plumbe, A. M., and Willmer, C. M. (1986). Phytoalexins, Water-Stress and Stomata. *New Phytologist* 103, 17–22. doi: 10.1111/j.1469-8137.1986.tb00592.x.
- Précigout, P.-A., Claessen, D., Makowski, D., and Robert, C. (2020). Does the Latent Period of Leaf Fungal Pathogens Reflect Their Trophic Type? A Meta-Analysis of Biotrophs, Hemibiotrophs, and Necrotrophs. *Phytopathology*® 110, 345–361. doi: 10.1094/PHYTO-04-19-0144-R.
- Pujol, V., Robles, J., Wang, P., Taylor, J., Zhang, P., Huang, L., et al. (2016). Cellular and molecular characterization of a stem rust resistance locus on wheat chromosome 7AL. *BMC Res Notes* 9, 502. doi: 10.1186/s13104-016-2320-z.
- Quintana-Rodriguez, E., Morales-Vargas, A. T., Molina-Torres, J., Ádame-Alvarez, R. M., Acosta-Gallegos, J. A., and Heil, M. (2015). Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *J Ecol* 103, 250–260. doi: 10.1111/1365-2745.12340.
- Rangel, L. I., Spanner, R. E., Ebert, M. K., Pethybridge, S. J., Stukenbrock, E. H., de Jonge, R., et al. (2020). *Cercospora beticola*: The intoxicating lifestyle of the leaf spot pathogen of sugar beet. *Molecular Plant Pathology* 21, 1020–1041. doi: 10.1111/mpp.12962.
- Ranjan, A., Westrick, N. M., Jain, S., Piotrowski, J. S., Ranjan, M., Kessens, R., et al. (2019). Resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean involves a reprogramming of the phenylpropanoid pathway and up-regulation of antifungal activity targeting ergosterol biosynthesis. *Plant Biotechnol J* 17, 1567–1581. doi: 10.1111/pbi.13082.
- Rathaiah, Y. (1977). Stomatal Tropism of *Cercospora beticola* in Sugarbeet. *Phytopathology* 77, 358. doi: 10.1094/Phyto-67-358.
- Ray, S., Anderson, J. M., Urmeev, F. I., and Goodwin, S. B. (2003). Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol* 53, 701–714. doi: 10.1023/B:PLAN.0000019120.74610.52.
- Reignault, P., and Sancholle, M. (2005). Plant–pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? *Comptes Rendus Biologies* 328, 821–833. doi: 10.1016/j.crvi.2005.07.002.
- Riaz, A., KockAppelgren, P., Hehir, J. G., Kang, J., Meade, F., Cockram, J., et al. (2020). Genetic Analysis Using a Multi-Parent Wheat Population Identifies Novel Sources of *Septoria Tritici* Blotch Resistance. *Genes* 11, 887. doi: 10.3390/genes11080887.

- Ricciardi, V., Marciandò, D., Sargolzaei, M., Maddalena, G., Maghradze, D., Tirelli, A., et al. (2021). From plant resistance response to the discovery of antimicrobial compounds: The role of volatile organic compounds (VOCs) in grapevine downy mildew infection. *Plant Physiology and Biochemistry* 160, 294–305. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.01.035.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T. (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev.* 20, 537–542. doi: 10.1101/gad.366506.
- Rodrigues, O., and Shan, L. (2022). Stomata in a state of emergency: H₂O₂ is the target locked. *Trends in Plant Science* 27, 274–286. doi: 10.1016/j.tplants.2021.10.002.
- Rohel, E. A., Payne, A. C., Fraaije, B. A., and Hollomon, D. W. (2001). Exploring Infection of Wheat and Carbohydrate Metabolism in *Mycosphaerella graminicola* Transformants with Differentially Regulated Green Fluorescent Protein Expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 156–163. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.2.156.
- Romantschuk, M. (1992). Attachment of Plant Pathogenic Bacteria to Plant Surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 30, 225–243. doi: 10.1146/annurev.py.30.090192.001301.
- Romantschuk, M., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Roine, E., and Suoniemi, A. (1993). Pilus-mediated adsorption of *Pseudomonas syringae* to the surface of host and non-host plant leaves. *Journal of General Microbiology* 139, 2251–2260. doi: 10.1099/00221287-139-9-2251.
- Romantschuk, M., Roine, E., Ojanen, T., Van Doorn, J., Louhelainen, J., Nurmiaho-Lassila, E.-L., et al. (1994). “Fimbria (pilus) mediated attachment of *Pseudomonas syringae*, *Erwinia rhapontici* and *Xanthomonas campestris* to plant surfaces,” in *Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Developments in Plant Pathology.*, eds. C. I. Kado and J. H. Crosa (Dordrecht: Springer Netherlands), 67–77. doi: 10.1007/978-94-011-0746-4_5.
- Roussin-Léveillé, C., Lajeunesse, G., St-Amand, M., Veerapen, V. P., Silva-Martins, G., Nomura, K., et al. (2022). Evolutionarily conserved bacterial effectors hijack abscisic acid signaling to induce an aqueous environment in the apoplast. *Cell Host & Microbe* 30, 489-501.e4. doi: 10.1016/j.chom.2022.02.006.
- Rouxel, T., and Balesdent, M. H. (2005). The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology* 6, 225–241. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00282.x.
- Rudall, P. J., Hilton, J., and Bateman, R. M. (2013). Several developmental and morphogenetic factors govern the evolution of stomatal patterning in land plants. *New Phytologist* 200, 598–614. doi: 10.1111/nph.12406.
- Rudd, J. J. (2015). Previous bottlenecks and future solutions to dissecting the *Zymoseptoria tritici* –wheat host-pathogen interaction. *Fungal Genetics and Biology* 79, 24–28. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.005.
- Saintenac, C., Cambon, F., Aouini, L., Verstappen, E., Ghaffary, S. M. T., Poucet, T., et al. (2021). A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance

- against *Septoria tritici* blotch. *Nat Commun* 12, 433. doi: 10.1038/s41467-020-20685-0.
- Saintenac, C., Lee, W.-S., Cambon, F., Rudd, J. J., King, R. C., Marande, W., et al. (2018). Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nat. Genet.* 50, 368–374. doi: 10.1038/s41588-018-0051-x.
- Samborski, D. J., and Rohringer, R. (1970). Abnormal metabolites of wheat: Occurrence, isolation and biogenesis of 2-hydroxyputrescine amides. *Phytochemistry* 9, 1939–1945. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85343-1.
- Sánchez-Vallet, A., McDonald, M. C., Solomon, P. S., and McDonald, B. A. (2015). Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology* 79, 29–32. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.001.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., and Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol* 3, 430–439. doi: 10.1038/s41559-018-0793-y.
- Schellenberger, R., Touchard, M., Clément, C., Baillieul, F., Cordelier, S., Crouzet, J., et al. (2019). Apoplastic invasion patterns triggering plant immunity: plasma membrane sensing at the frontline. *Mol Plant Pathol* 20, 1602–1616. doi: 10.1111/mpp.12857.
- Seybold, H., Demetrowitsch, T. J., Hassani, M. A., Szymczak, S., Reim, E., Haueisen, J., et al. (2020a). A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nat Commun* 11, 1910. doi: 10.1038/s41467-020-15633-x.
- Seybold, H., Demetrowitsch, T. J., Hassani, M. A., Szymczak, S., Reim, E., Haueisen, J., et al. (2020b). A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nat Commun* 11, 1910. doi: 10.1038/s41467-020-15633-x.
- Shao, D., Smith, D. L., Kabbage, M., and Roth, M. G. (2021). Effectors of Plant Necrotrophic Fungi. *Frontiers in Plant Science* 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2021.687713> [Accessed April 29, 2022].
- Shental-Bechor, D., and Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 8256–8261. doi: 10.1073/pnas.0801340105.
- Shetty, N. P., Jensen, J. D., Knudsen, A., Finnie, C., Geshi, N., Blennow, A., et al. (2009). Effects of -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60, 4287–4300. doi: 10.1093/jxb/erp269.
- Shetty, N. P., Kristensen, B. K., Newman, M.-A., Møller, K., Gregersen, P. L., and Jørgensen, H. J. L. (2003). Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 333–346. doi: 10.1016/S0885-5765(03)00079-1.

- Shetty, N. P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G. H. J., Collinge, D. B., et al. (2007). Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist* 174, 637–647. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02026.x.
- Shi, X., and Jarvis, D. L. (2007). Protein N-Glycosylation in the Baculovirus-Insect Cell System. *Curr Drug Targets* 8, 1116–1125.
- Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H.-J., Duveiller, E., Reynolds, M., and Muricho, G. (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Sec.* 5, 291–317. doi: 10.1007/s12571-013-0263-y.
- Shin, M., Umezawa, C., and Shin, T. (2014). “NATURAL ANTI-MICROBIAL SYSTEMS | Antimicrobial Compounds in Plants,” in *Encyclopedia of Food Microbiology* (Elsevier), 920–929. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00239-1.
- Shiu, S.-H., and Bleecker, A. B. (2001). Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. *Science Signaling* 2001, re22–re22. doi: 10.1126/stke.2001.113.re22.
- Siah, A., Deweer, C., Duyme, F., Sanssené, J., Durand, R., Halama, P., et al. (2010). Correlation of in planta endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*: Xylanase and septoria tritici blotch. *Plant Pathology* 59, 661–670. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02303.x.
- Singh, A., and Singh, I. K. eds. (2018). *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Singapore: Springer doi: 10.1007/978-981-10-7371-7.
- Singh, Y., Nair, A. M., and Verma, P. K. (2021). Surviving the odds: From perception to survival of fungal phytopathogens under host-generated oxidative burst. *Plant Communications* 2, 100142. doi: 10.1016/j.xplc.2021.100142.
- Snetselaar, K. M., and Mims, C. W. (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research* 98, 347–355. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80463-2.
- Solanki, S., Ameen, G., Borowicz, P., and Brueggeman, R. S. (2019). Shedding Light on Penetration of Cereal Host Stomata by Wheat Stem Rust Using Improved Methodology. *Sci Rep* 9, 7939. doi: 10.1038/s41598-019-44280-6.
- Spoel, S. H., and Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol* 12, 89–100. doi: 10.1038/nri3141.
- Steinberg, G. (2015). Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology* 79, 17–23. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.002.
- Stephens, C., Hammond-Kosack, K. E., and Kanyuka, K. (2022). WAKsing plant immunity, waning diseases. *Journal of Experimental Botany* 73, 22–37. doi: 10.1093/jxb/erab422.

- Stotz, H. U., Mitroussia, G. K., de Wit, P. J. G. M., and Fitt, B. D. L. (2014). Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* 19, 491–500. doi: 10.1016/j.tplants.2014.04.009.
- Strasser, R. (2016). Plant protein glycosylation. *Glycobiology* 26, 926–939. doi: 10.1093/glycob/cww023.
- Stubbs, R. W., and Plotnikova, J. M. (1972). Uredospore germination and germ tube penetration of *Puccinia striiformis* in seedling leaves of resistant and susceptible wheat varieties. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 78, 258–264. doi: 10.1007/BF01976434.
- Sudisha, J., Sharathchandra, R. G., Amruthesh, K. N., Kumar, A., and Shetty, H. S. (2012). “Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response,” in *Plant Defence: Biological Control*, eds. J. M. Mérillon and K. G. Ramawat (Dordrecht: Springer Netherlands), 379–403. doi: 10.1007/978-94-007-1933-0_17.
- Suffert, F., Sache, I., and Lannou, C. (2011). Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* 60, 166–177. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02369.x.
- Suzuki, M., Shibuya, M., Shimada, H., Motoyama, N., Nakashima, M., Takahashi, S., et al. (2016). Autophosphorylation of Specific Threonine and Tyrosine Residues in Arabidopsis CERK1 is Essential for the Activation of Chitin-Induced Immune Signaling. *Plant and Cell Physiology* 57, 2312–2322. doi: 10.1093/pcp/pcw150.
- Tabib Ghaffary, S. M., Faris, J. D., Friesen, T. L., Visser, R. G. F., van der Lee, T. A. J., Robert, O., et al. (2012). New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 124, 125–142. doi: 10.1007/s00122-011-1692-7.
- Talbot, N. J. (2003). On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology* 57, 177–202. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090957.
- Tanaka, H., Osakabe, Y., Katsura, S., Mizuno, S., Maruyama, K., Kusakabe, K., et al. (2012). Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in Arabidopsis: Receptor-like kinases in ABA signaling. *The Plant Journal* 70, 599–613. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04901.x.
- Tang, D., Wang, G., and Zhou, J.-M. (2017). Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *The Plant Cell* 29, 618–637. doi: 10.1105/tpc.16.00891.
- Taylor, I., Wang, Y., Seitz, K., Baer, J., Bennewitz, S., Mooney, B. P., et al. (2016). Analysis of Phosphorylation of the Receptor-Like Protein Kinase HAESA during Arabidopsis Floral Abscission. *PLoS One* 11, e0147203. doi: 10.1371/journal.pone.0147203.
- Tester, M., and Langridge, P. (2010). Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. *Science* 327, 818–822. doi: 10.1126/science.1183700.

- Thomas, E. L., and Van der Hoorn, R. A. L. (2018). Ten Prominent Host Proteases in Plant-Pathogen Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 639. doi: 10.3390/ijms19020639.
- Thomma, B. P. H. J., Van Esse, H. P., Crous, P. W., and De Wit, P. J. G. M. (2005). *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Mol Plant Pathol* 6, 379–393. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00292.x.
- Torriani, S. F. F., Melichar, J. P. E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., and Courbot, M. (2015). *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology* 79, 8–12. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.010.
- Tucker, S. L., and Talbot, N. J. (2001). Surface Attachment and Pre-Penetration Stage Development by Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39, 385–417. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.385.
- Turner, N. C., and Graniti, A. (1969). Fusicoccin: a Fungal Toxin that opens Stomata. *Nature* 223, 1070–1071. doi: 10.1038/2231070a0.
- Ube, N., Harada, D., Katsuyama, Y., Osaki-Oka, K., Tonooka, T., Ueno, K., et al. (2019). Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry* 167, 112098. doi: 10.1016/j.phytochem.2019.112098.
- Underwood, W. (2012). The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science* 3. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2012.00085> [Accessed May 18, 2022].
- Vagdorf, N., Nielsen, N. H., Edriss, V., Andersen, J. R., Orabi, J., Jørgensen, L. N., et al. (2017). Genomewide association study reveals novel quantitative trait loci associated with resistance towards *Septoria tritici* blotch in North European winter wheat. *Plant Breeding* 136, 474–482. doi: 10.1111/pbr.12490.
- Valente, F., Mansfield, J., Herring, D., Romana, G., Rodrigues, C., Metz, J., et al. (2022). Wheat cells show positional responses to invasive *Zymoseptoria tritici*. 2022.07.15.499463. doi: 10.1101/2022.07.15.499463.
- van der Burgh, A. M., and Joosten, M. H. A. J. (2019). Plant Immunity: Thinking Outside and Inside the Box. *Trends in Plant Science* 24, 587–601. doi: 10.1016/j.tplants.2019.04.009.
- van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135–162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- Van't Klooster, J. W., Van Der Kamp, M. W., Vervoort, J., Beekwilder, J., Boeren, S., Joosten, M. H. a. J., et al. (2011). Affinity of Avr2 for tomato cysteine protease Rcr3 correlates with the Avr2-triggered Cf-2-mediated hypersensitive response. *Molecular Plant Pathology* 12, 21–30. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00647.x.

- Veneault-Fourrey, C., Laugé, R., and Langin, T. (2005). Nonpathogenic Strains of *Colletotrichum lindemuthianum* Trigger Progressive Bean Defense Responses during Appressorium-Mediated Penetration. *Appl Environ Microbiol* 71, 4761–4770. doi: 10.1128/AEM.71.8.4761-4770.2005.
- Videira, S. I. R., Groenewald, J. Z., Nakashima, C., Braun, U., Barreto, R. W., de Wit, P. J. G. M., et al. (2017). Mycosphaerellaceae – Chaos or clarity? *Studies in Mycology* 87, 257–421. doi: 10.1016/j.simyco.2017.09.003.
- Voegelé, R. T. (2006). *Uromyces fabae*: development, metabolism, and interactions with its host *Vicia faba*. *FEMS Microbiology Letters* 259, 165–173. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00248.x.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* 3, 2–20. doi: 10.1093/mp/ssp106.
- Wang, J., Grubb, L. E., Wang, J., Liang, X., Li, L., Gao, C., et al. (2018). A Regulatory Module Controlling Homeostasis of a Plant Immune Kinase. *Molecular Cell* 69, 493–504.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.026.
- Wang, P., Wang, H., Gai, J., Tian, X., Zhang, X., Lv, Y., et al. (2017). Evolution of protein N-glycosylation process in Golgi apparatus which shapes diversity of protein N-glycan structures in plants, animals and fungi. *Sci Rep* 7, 40301. doi: 10.1038/srep40301.
- Wang, X., Goshe, M. B., Soderblom, E. J., Phinney, B. S., Kuchar, J. A., Li, J., et al. (2005). Identification and Functional Analysis of in Vivo Phosphorylation Sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 Receptor Kinase. *Plant Cell* 17, 1685–1703. doi: 10.1105/tpc.105.031393.
- Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M. B., et al. (2008). Sequential Transphosphorylation of the BRI1/BAK1 Receptor Kinase Complex Impacts Early Events in Brassinosteroid Signaling. *Developmental Cell* 15, 220–235. doi: 10.1016/j.devcel.2008.06.011.
- Wang, Y., Wang, Y., and Wang, Y. (2020). Apoplastic Proteases: Powerful Weapons against Pathogen Infection in Plants. *Plant Communications* 1, 100085. doi: 10.1016/j.xplc.2020.100085.
- Wang, Z., and Gou, X. (2021). The First Line of Defense: Receptor-like Protein Kinase-Mediated Stomatal Immunity. *IJMS* 23, 343. doi: 10.3390/ijms23010343.
- Wanke, A., Malisic, M., Wawra, S., and Zuccaro, A. (2020). Unraveling the sugar code: the role of microbial extracellular glycans in plant–microbe interactions. *J Exp Bot* 72, 15–35. doi: 10.1093/jxb/eraa414.
- Wen, F., White, G. J., VanEtten, H. D., Xiong, Z., and Hawes, M. C. (2009). Extracellular DNA Is Required for Root Tip Resistance to Fungal Infection. *Plant Physiology* 151, 820–829. doi: 10.1104/pp.109.142067.
- Westrick, N. M., Smith, D. L., and Kabbage, M. (2021). Disarming the Host: Detoxification of Plant Defense Compounds During Fungal Necrotrophy. *Front Plant Sci* 12, 651716. doi: 10.3389/fpls.2021.651716.

- Whiteside, J. O. (1972). Histopathology of Citrus Greasy Spot and Identification of the Causal Fungus. *Phytopathology* 62, 260. doi: 10.1094/Phyto-62-260.
- Whitney, K., Gracia-Gomez, G., Anderson, J. A., and Simsek, S. (2022). Time Course Metabolite Profiling of Fusarium Head Blight-Infected Hard Red Spring Wheat Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time of Flight/MS. *J. Agric. Food Chem.* 70, 4152–4163. doi: 10.1021/acs.jafc.1c08374.
- Wilson, I. B. H. (2002). Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Current Opinion in Structural Biology* 12, 569–577. doi: 10.1016/S0959-440X(02)00367-6.
- Wirthmueller, L., Maqbool, A., and Banfield, M. J. (2013). On the front line: structural insights into plant–pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 11, 761–776. doi: 10.1038/nrmicro3118.
- Wit, P. J. G. M. (1977). A light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83, 109–122. doi: 10.1007/BF01981556.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322, 681–692.
- Wu, D., Liu, Y., Xu, F., and Zhang, Y. (2018). Differential requirement of BAK1 C-terminal tail in development and immunity. *Journal of Integrative Plant Biology* 60, 270–275. doi: 10.1111/jipb.12623.
- Wu, J., and Liu, Y. (2022). Stomata–pathogen interactions: over a century of research. *Trends in Plant Science* 0. doi: 10.1016/j.tplants.2022.07.004.
- Wu, T., Guo, F., Xu, G., Yu, J., Zhang, L., Wei, X., et al. (2021). The Receptor-like Kinase TaCRK-7A Inhibits *Fusarium pseudograminearum* Growth and Mediates Resistance to *Fusarium* Crown Rot in Wheat. *Biology* 10, 1122. doi: 10.3390/biology10111122.
- Wu, X., Oh, M.-H., Kim, H., Schwartz, D., Imai, B., Yau, P., et al. (2012). Transphosphorylation of *E. coli* Proteins during Production of Recombinant Protein Kinases Provides a Robust System to Characterize Kinase Specificity. *Frontiers in Plant Science* 3. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2012.00262> [Accessed August 10, 2022].
- Wynn, W. K. (1976). Appressorium Formation over Stomates by the Bean Rust Fungus: Response to a Surface Contact Stimulus. *Phytopathology* 66, 136. doi: 10.1094/Phyto-66-136.
- Wynn, W. K. (1981). Tropic and Toxic Responses of Pathogens to Plants. *Annual Review of Phytopathology* 19, 237–255. doi: 10.1146/annurev.py.19.090181.001321.
- Xu, W.-H., Wang, Y.-S., Liu, G.-Z., Chen, X., Tinjuangjun, P., Pi, L.-Y., et al. (2006). The autophosphorylated Ser686, Thr688, and Ser689 residues in the intracellular juxtamembrane domain of XA21 are implicated in stability control of rice receptor-like kinase. *The Plant Journal* 45, 740–751. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02638.x.

- Yadav, V., Wang, Z., Wei, C., Amo, A., Ahmed, B., Yang, X., et al. (2020). Phenylpropanoid Pathway Engineering: An Emerging Approach towards Plant Defense. *Pathogens* 9, 312. doi: 10.3390/pathogens9040312.
- Yadeta, K. A., Elmore, J. M., Creer, A. Y., Feng, B., Franco, J. Y., Rufian, J. S., et al. (2017). A Cysteine-Rich Protein Kinase Associates with a Membrane Immune Complex and the Cysteine Residues Are Required for Cell Death. *Plant Physiol.* 173, 771–787. doi: 10.1104/pp.16.01404.
- Yang, F., Li, W., Derbyshire, M., Larsen, M. R., Rudd, J. J., and Palmisano, G. (2015). Unraveling incompatibility between wheat and the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* through apoplastic proteomics. *BMC Genomics* 16. doi: 10.1186/s12864-015-1549-6.
- Yang, F., Li, W., and Jørgensen, H. J. L. (2013a). Transcriptional Reprogramming of Wheat and the Hemibiotrophic Pathogen *Septoria tritici* during Two Phases of the Compatible Interaction. *PLOS ONE* 8, e81606. doi: 10.1371/journal.pone.0081606.
- Yang, F., Melo-Braga, M. N., Larsen, M. R., Jørgensen, H. J. L., and Palmisano, G. (2013b). Battle through Signaling between Wheat and the Fungal Pathogen *Septoria tritici* Revealed by Proteomics and Phosphoproteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 12, 2497–2508. doi: 10.1074/mcp.M113.027532.
- Yang, L.-N., Liu, H., Wang, Y.-P., Seematti, J., Grenville-Briggs, L. J., Wang, Z., et al. (2021). Pathogen-Mediated Stomatal Opening: A Previously Overlooked Pathogenicity Strategy in the Oomycete Pathogen *Phytophthora infestans*. *Front. Plant Sci.* 12, 668797. doi: 10.3389/fpls.2021.668797.
- Yang, N., McDonald, M. C., Solomon, P. S., and Milgate, A. W. (2018). Genetic mapping of *Stb19*, a new resistance gene to *Zymoseptoria tritici* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 131, 2765–2773. doi: 10.1007/s00122-018-3189-0.
- Ye, W., Munemasa, S., Shinya, T., Wu, W., Ma, T., Lu, J., et al. (2020). Stomatal immunity against fungal invasion comprises not only chitin-induced stomatal closure but also chitosan-induced guard cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 20932–20942. doi: 10.1073/pnas.1922319117.
- Yirgou, D., and Caldwell, R. M. (1963). Stomatal Penetration of Wheat Seedlings by Stem and Leaf Rust: Effect of Light and Carbon Dioxide. *Science* 141, 272–273. doi: 10.1126/science.141.3577.272.
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., et al. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol Rev* 40, 182–207. doi: 10.1093/femsre/fuv045.
- Zhang, D., Tian, C., Yin, K., Wang, W., and Qiu, J.-L. (2019). Postinvasive Bacterial Resistance Conferred by Open Stomata in Rice. *MPMI* 32, 255–266. doi: 10.1094/MPMI-06-18-0162-R.
- Zhang, J., Coaker, G., Zhou, J.-M., and Dong, X. (2020). Plant Immune Mechanisms: From Reductionistic to Holistic Points of View. *Molecular Plant* 13, 1358–1378. doi: 10.1016/j.molp.2020.09.007.

- Zhang, M., Chiang, Y.-H., Toruño, T. Y., Lee, D., Ma, M., Liang, X., et al. (2018). The MAP4 Kinase SIK1 Ensures Robust Extracellular ROS Burst and Antibacterial Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* 24, 379-391.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.08.007.
- Zhang, X., Yang, G., Shi, R., Han, X., Qi, L., Wang, R., et al. (2013a). Arabidopsis cysteine-rich receptor-like kinase 45 functions in the responses to abscisic acid and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 67, 189–198. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.03.013.
- Zhang, Y., Lubberstedt, T., and Xu, M. (2013b). The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. *Journal of Genetics and Genomics* 40, 23–35. doi: 10.1016/j.jgg.2012.11.003.
- Zierold, U., Scholz, U., and Schweizer, P. (2005). Transcriptome analysis of mlo-mediated resistance in the epidermis of barley. *Molecular Plant Pathology* 6, 139–151. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00271.x.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology* 35, 345–351. doi: 10.1016/j.it.2014.05.004.