

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**LA QUANTIFICATION DE METABOLITES SECONDAIRES FLUORESCENTS LORS DE L'INTERACTION BLE-
ZYMOPSEPTORIA TRITICI OUVRE LA PERSPECTIVE D'UN CAPTEUR DEDIE POUR UNE LUTTE DE
PRECISION**

D. GOUACHE⁽¹⁾, S. CHAOUCH⁽²⁾, L. FLORIN⁽³⁾, G. MASDOUMIER⁽³⁾, G. BARRILLIET⁽⁴⁾, C. GARCIA⁽¹⁾, E. SAILLIOT⁽¹⁾,
J.-C. DESWARTE⁽¹⁾, R. VALADE⁽⁵⁾, M. DUFRESNE⁽²⁾, J.-M. SENG⁽²⁾, J.-L. AYRAL⁽³⁾, P. SAINDRENAN⁽²⁾

⁽¹⁾ Arvalis – Institut du végétal, rue de Noetzelin, Bât 630, 91405 Orsay - d.gouache@arvalisinstitutduvegetal.fr

⁽²⁾ Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay – UMR Université Paris Sud - INRA 1403 - CNRS 9213, Bâtiment 630, 91405 Orsay Cedex

⁽³⁾ Force-A – Centre Universitaire Paris-Sud, bâtiment 503, 91893 ORSAY cedex

⁽⁴⁾ Arvalis – Institut du végétal, station expérimentale, 91720 Boigneville

⁽⁵⁾ Arvalis – Institut du végétal, Laboratoire de pathologie végétale, Campus AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon

RESUME

La septoriose provoquée par le champignon phytopathogène *Zymoseptoria tritici* est la 1ère maladie contributrice aux traitements fongicides sur blé. Le raisonnement de son traitement au plus proche des besoins peut apporter des économies significatives de produit sans perte de performance. Pour cela, la quantification du champignon pendant sa phase asymptomatique est un point clef. Nous faisons l'hypothèse que des métabolites secondaires fluorescents produits par la plante en réponse à l'infection, pourraient être quantifiés par un capteur ad hoc. Nous avons mis en place un protocole d'analyse métabolomique et transcriptomique et identifié plusieurs voies métaboliques induites. En particulier, trois métabolites issus de la voie du tryptophane sont produits, et émettent une fluorescence dans l'ultra-violet (UV-UV). Au champ, la production de ces métabolites s'avère prédictive du développement des symptômes, et modifie le spectre UV-UV des feuilles. Des expérimentations complémentaires sont à effectuer pour préciser les longueurs d'onde d'émission les plus prédictives et établir le degré de spécificité et de robustesse de ce signal fluorescent.

Mots-clés : blé, *Zymoseptoria tritici*, diagnostic précoce, fluorescence, métabolomique.

ABSTRACT

QUANTIFYING AUTOFLUORESCENT SECONDARY METABOLITES DURING THE WHEAT-ZYMOPSEPTORIA TRITICI INTERACTION OPENS PERSPECTIVES FOR OF A SENSOR SYSTEM FOR PRECISION SPRAYING

Septoria tritici blotch (STB) caused by the fungus *Zymoseptoria tritici* is the most important disease in wheat in France. Adjusting sprayings to the requirements of the crop can lead to significant reductions in fungicide use. Presymptomatic quantification of the pathogen could be key to achieve this. We hypothesized that the production of fluorescent secondary metabolites by the infected wheat crop could be used to quantify the pathogen, via an *ad hoc* sensor. We set up a metabolomic and transcriptomic screening of the wheat-septoria interaction and identified multiple upregulated metabolic pathways. Three metabolites from the tryptophan pathway are produced during infection, and emit UV-UV fluorescence. In the field, these metabolites are predictive of ulterior symptom dynamics, and modify the UV-UV spectrum of wheat leaves. Additional experiments will be necessary to determine which emission wavelengths are the most predictive, and to assess how specific and robust this fluorescence is.

Keywords: wheat, *Zymoseptoria tritici*, early diagnostics, fluorescence, metabolomics.

INTRODUCTION

La septoriose, provoquée par le champignon *Zymoseptoria tritici* (anciennement *Mycosphaerella graminicola* anamorphe *Septoria tritici*), est actuellement la maladie la plus dommageable sur le blé en France. Le potentiel épidémique élevé de cette maladie (inoculum rarement limitant), le brassage génétique (sexualité) couplé à une reproduction clonale importante, l'absence de variétés totalement résistantes, font que la septoriose est aujourd'hui la principale maladie du blé cultivé, en France mais aussi dans le monde. Les traitements fongicides sur blé représentent aujourd'hui l'un des seuls moyens de lutte efficace. Sa nuisibilité moyenne interannuelle est de 15 qx/ha, et peut monter jusqu'à 50 qx/ha dans les situations les plus exposées (Jorgensen et al., 2008), ce qui la place comme la plus grande contributrice aux traitements fongicides sur blé : 58 % de la dépense moyenne en fongicides est dirigée vers les maladies foliaires, en particulier la septoriose en France (Maumené, pers. com.) chiffre qui atteint 70% à l'échelle de l'Europe (O'Driscoll et al., 2014). Or, le plan Ecophyto a fixé comme feuille de route la réduction de l'usage de produits de protection des plantes de 50 %, si possible. Cela impliquera la généralisation de stratégies de protection des cultures dites « intégrées » : celles-ci s'appuient entre autres sur un raisonnement des applications de produits au plus près des besoins réels des parcelles. Ce besoin d'optimisation est d'autant plus prégnant sur septoriose que les fongicides phares disponibles connaissent une diminution de leur efficacité (Maufras 2006 ; Fraaije et al., 2012). Aujourd'hui, les producteurs français disposent pour ce faire d'outils d'aide à la décision basés sur des prédictions agroclimatiques du développement simultané de la plante hôte et de l'épidémie (SeptoLIS®, Gouache & Couleaud 2009 ; Gouache et al., 2013). Ce type d'outil peut contribuer significativement à une réduction de l'emploi des traitements. Gouache & Couleaud (2009) ont en effet montré que l'optimisation du positionnement des traitements via SeptoLIS permettait d'atteindre une performance équivalente à un accroissement de dose de 25%. Par ailleurs, en 2010, année à faible pression, SeptoLIS a permis d'identifier de manière fiable les situations dans lesquelles une impasse sur le 1^{er} traitement pouvait être réalisée (Arvalis, 2010). Les règles de décision utilisées s'appuient sur la prévision des quantités de symptômes en incubation (i.e. non-visibles). La plus-value de cet outil d'aide à la décision réside dans la caractérisation de la phase présymptomatique, particulièrement longue (2 à 4 semaines, Lovell et al. 2004, Viljanen-Rollinson et al. 2005 ; Sanchez-Vallet et al., 2015), les produits étant bien plus efficaces lorsqu'ils sont appliqués durant cette phase. Ce type de modèle, qui ne peut tenir d'effets locaux de micro-climat, de variabilité des populations (Morais, 2015), d'inoculum (Suffert et al., 2011, Suffert & Sache, 2011), possède évidemment une erreur intrinsèque limitant sa précision à la parcelle. Une mesure directe du niveau de pression de l'épidémie de septoriose dans une parcelle permettrait de réduire cette incertitude : Audsley et al. (2005) ont effectivement proposé un schéma probabiliste permettant d'intégrer des observations à leur modèle agroclimatique. Mais cette approche reste limitée par le fait que l'observation est visuelle, et ne prend donc pas en compte des infections encore latentes ayant eu lieu dans les 2 à 4 semaines avant l'observation. Gouache et al. (2009 ; 2011) ont montré qu'une quantification par biologie moléculaire (PCR quantitative, PCRq) permet de prédire avec succès le développement ultérieur de la maladie sur un étage foliaire donné. Ils proposent ainsi de combiner modèle de progression épidémique et quantification présymptomatique pour affiner les prédictions à la parcelle, par des techniques d'assimilation de données (Naud et al. 2009 ; Audsley et al, 2005).

La quantification par voie moléculaire a cependant des limites opérationnelles, liées au temps de réponse (traitement des échantillons) trop longs et aux problèmes d'échantillonnage. Les techniques de détection basées sur les signatures optiques permettraient de lever ces contraintes. Arvalis comme Force-A ont développé depuis de longues années un savoir-faire pour l'utilisation de capteurs optiques afin de caractériser l'état physiologique (nutrition azotée) des couverts végétaux. Récemment, des techniques optiques basées sur la fluorescence sont mises en œuvre avec succès pour diagnostiquer, avant apparition des symptômes, les attaques de mildiou de la vigne (Poutaraud et al, 2007, Agati et al. 2008). En effet, les réactions des plantes aux maladies se caractérisent

souvent par la synthèse de métabolites secondaires (MS) possédant des propriétés de fluorescence (Chong et al., 2002). La compréhension du fonctionnement de l'interaction blé-*Zymoseptoria* a beaucoup progressé ces dernières années, dégagant plusieurs pistes qui permettraient de trouver une signature optique de la septoriose en incubation. La première phase de l'infection se caractérise par un développement très lent du mycélium, qui ne semble que très peu perturber la plante (Sanchez-Vallet, 2015 ; Steinberg, 2015). Toutefois, nombre d'auteurs évoquent la présence de composés autofluorescents indéterminés lors de l'infection (Kema et al. 1996 ; Cohen et Eyal 1993, Pnini-Cohen et al. 1997). Plus récemment, Shetty et al. (2009) ont mis en évidence des dépôts de callose, au niveau des zones d'infection (stomates et chambre sous stomatique). Ensuite, le champignon déclenche une cascade de réactions chez la plante, aboutissant à des morts cellulaires qui lui permettent de rentrer dans une phase de croissance forte, conduisant à la production de spores qui amplifient l'épidémie (Keon et al 2007 ; Hammond-Kosack et Rudd 2008 ; Rudd, 2015). Au moment du démarrage de ce projet, des auteurs supposaient l'implication d'une toxine dans les phases précoces de l'interaction, comme déclencheur de cette cascade : plusieurs de ces effecteurs ont depuis été isolés et sont en cours de caractérisation (Gohari et al., 2015 ; M'barek et al., 2015). Ces toxines pourraient déclencher des réactions similaires à la toxine ToxA, de nature protéique, isolée sur blé infecté par *Pyrenophora tritici-repentis* et *Parastagonospora nodorum*, qui induit une action sur les chloroplastes (symptôme histologique connu de *Z. tritici*), entraînant des symptômes nécrotiques lumière-dépendants (Manning et al 2009) et une reprogrammation du transcriptome et plus particulièrement celui orienté vers la production de MS (Pandelova et al. 2009). Les études transcriptomiques et métabolomiques publiées depuis le démarrage du projet confirment une régulation à la hausse du métabolisme primaire lors du changement de mode de vie du champignon vers la nécrotrophie (Rudd et al., 2015), donc peu avant l'apparition des symptômes.

Le projet MiCODetect (Mise au point d'un Capteur Optique de Détection présymptomatique de la septoriose) a eu pour but de déterminer les éléments de cahier des charges qui permettraient l'élaboration d'un outil de détection. Il s'est donc agi principalement d'identifier une signature présymptomatique détectable par fluorescence de l'infection dans les stades précoces. Ce travail a procédé en plusieurs étapes :

- 1) Identification de métabolites fluorescents produits le plus précocement lors de d'infection par la septoriose en conditions contrôlées d'infection.
- 2) Validation au champ de la production de métabolites fluorescents et de leur caractère prédictif de l'évolution des symptômes.
- 3) Evaluation du potentiel d'une mesure fluorimétrique pour identifier une infection par la septoriose et prédire l'évolution des symptômes.

Nous présenterons successivement les méthodes et résultats de chacune de ces étapes, en en tirant les conclusions essentielles. Nous discuterons ensuite la totalité des travaux réalisés, en nous attachant en particulier aux travaux restant à mettre en œuvre pour aboutir à un prototype de capteur.

1. IDENTIFICATION DE METABOLITES FLUORESCENTS PRODUITS EN PHASE PRECOCE D'INFECTION PAR LA SEPTORIOSE

1.1 MATERIEL & METHODES

Nous avons réalisé des cinétiques d'infection de jeunes plantes de la variété Alixan, inoculée avec la souche de référence IPO323 (Goodwin et al., 2011), virulente sur cette variété. Les inoculations ont été réalisées au pinceau avec une solution à 10^8 spores/mL sur une zone délimitée de la feuille complètement ligulée la plus jeune, selon le protocole développé par Suffert et al. (2013). Pour chaque expérimentation, 6 plantes ont été inoculées avec la solution de spores, et 6 témoins ont été inoculés à l'eau. Les plantes ont ensuite été ensachées pendant 4 j pour obtenir une humidité

saturante. Après cette incubation, les plantes ont été déplacées en serre et observées à 5, 10, 14 et 17 j après inoculation (jai). Après plusieurs expérimentations préliminaires, ce protocole stabilisé a permis d'obtenir des cinétiques reproductibles, avec apparition de premières chloroses à 14 jai en moyenne et nécroses à 17 jai (Figure 1). L'expérimentation a été répétée à 8 reprises pour fournir du matériel végétal permettant de réaliser les analyses métabolomiques.

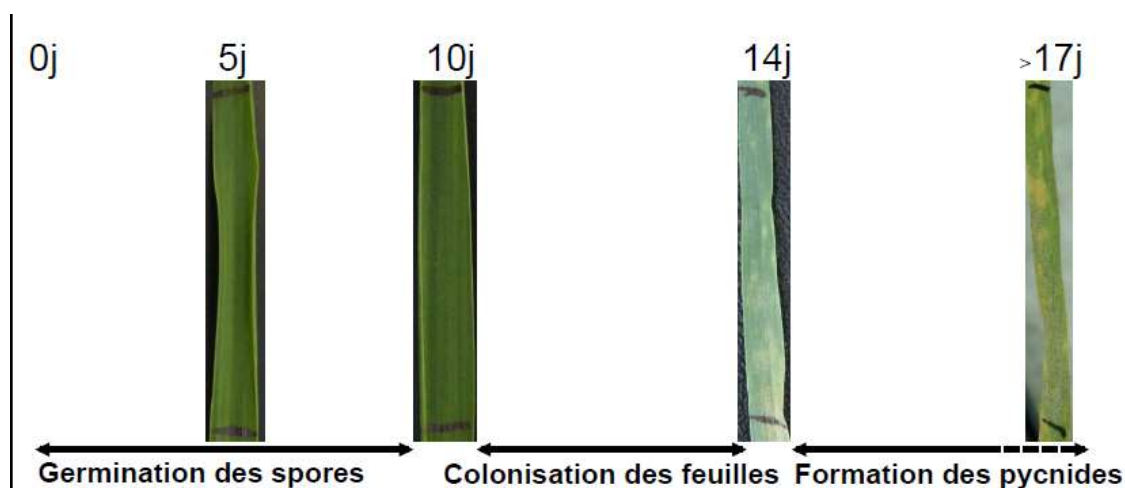


Figure 1 : cinétique typique d'infection des feuilles par la septoriose ; typical symptom dynamics of *Zymoseptoria* infected leaves

Les MS solubles et pariétaux ont été extraits et analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à spectrométrie de fluorescence dans l'ultraviolet (LC-Fluo). Les résultats préliminaires ayant indiqué une absence de différences sur les métabolites non-solubles (pariétaux), nos analyses se sont focalisées sur les métabolites solubles. Ces analyses ont ensuite été complétées par de la spectrométrie de masse (LC-MS-MS) afin d'identifier les composés fluorescents discriminant le plus entre les plantes inoculées et les plantes témoins.

Des données de transcriptomiques disponibles par ailleurs (Deller et al., 2011 ; projet ANR TWIST) ont également été mises à disposition du projet (Lebrun, pers. com.). Brièvement, ces données ont été obtenues par hybridation d'ARNs sur la Wheat GeneChip d'Affymetrix, ayant fourni des informations sur l'expression de 12249 gènes, sur une interaction génotype sensible – souche virulente (Cadenza – IPO90006) mise en œuvre dans des conditions expérimentales très similaire aux nôtres, en comparaison à des inoculations à l'eau.

Enfin, nous avons élaboré des amorces permettant de suivre par RT-PCRq, l'expression des gènes candidats des voies métaboliques impliquées dans la production des métabolites fluorescents ciblés. L'expression de ces gènes a été mesurée lors de plusieurs cinétiques d'infection.

1.2 RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 2 présente les chromatogrammes typiques mettant en évidence les 3 composés fluorescents marqueurs de l'infection par la septoriose. Des signaux discriminants sont détectés à partir de 14 jai (+/- 2). Ainsi, le signal 8 est absent chez la plante témoin, alors que les signaux 3 et 7 présents chez les plantes témoins, s'accumulent fortement chez les plantes infectées et sont détectables dès 14 jai (faiblement à 10 jai). Les spectres d'émission de fluorescence de ces métabolites marqueurs de l'interaction qui sont les plus discriminants, indiquent une émission maximale entre 300 nm < λ < 400 nm (données non-présentées, cf. aussi Figure 5 plus loin).

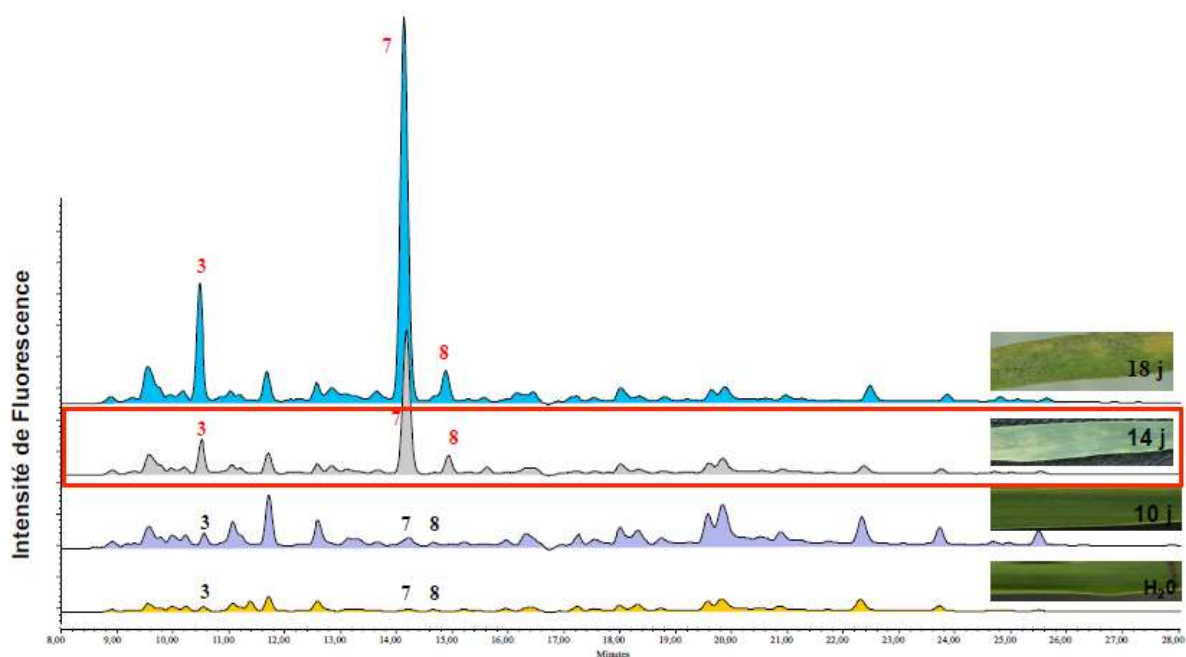


Figure 2 : chromatogrammes montrant l'accumulation de 3 métabolites fluorescents à 10, 14 et 18 jours après inoculation, en comparaison au témoin inoculé avec de l'eau 14 j après inoculation. ; typical chromatograms showing the accumulation of 3 fluorescent metabolites at 10, 14 and 18 days post inoculation, in comparison with a mock inoculated sample 14 days post inoculation

Les analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS-MS) indiquent que les MS prépondérants et discriminants sont respectivement la sérotonine (3), le tryptophane (7) et la tryptamine (8), métabolites appartenant à la voie des indoles. Une analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC/MS) ciblée sur les acides aminés, les sucres et les acides gras, a permis de révéler une induction importante de tryptophane et de sucres variés, au cours de l'infection par *Z. tritici*. D'autres composés fluorescents (en cours d'analyses complémentaires) appartiennent aux polyamines conjuguées (caféoyl-putrescine). Les composés de type hordatines A et B (antifongiques et potentiellement fluorescents chez le blé) n'ont pas été détectés dans l'interaction blé-*Z. tritici*. De nombreux flavonoïdes ont été également identifiés, mais ne participent pas à la discrimination entre plantes inoculées par de l'eau ou par *Z. tritici*.

L'analyse transcriptomique montre également des réponses différentielles entre des plantes malades et saines, mais surtout que des gènes de la plante impliqués dans la biosynthèse de molécules fluorescentes, sont induits au cours du développement de la maladie et ce, dès 10 jai. On observe une forte activation de la voie des phénylpropanoïdes (ex: gènes codant pour la phénylalanine ammonia lyase, PAL, ou pour la cinnamate-4-hydroxylase, C4H). La voie des dérivés indoliques est fortement sur-exprimée, ainsi que la voie conduisant aux phénolamides (Chaouch et al., 2015). En particulier, nous avons suivi par RT-PCRq dans nos propres échantillons, l'expression des gènes de la voie des indoles, qui produit les composés fluorescents marqueurs de l'infection (gènes codant pour l'antranyl synthase, AS1, AS2, la tryptophane synthase, TBS, la tryptophane décarboxylase, TDC). Ces résultats confortent nos analyses métaboliques.

Nos résultats indiquent qu'un ensemble de métabolites secondaires, caractéristiques de réactions de défense de la plante, sont effectivement induits par la septoriose. En fin de période de latence, avant l'apparition des premières chloroses, les voies métaboliques impliquées sont activées, suivi, quelques jours plus tard, d'une production accrue et d'une accumulation de ces métabolites, qui constituent donc une signature du basculement de l'interaction plante-pathogène vers la phase de nécrotrophie. Trois MS en particulier ont été mis en avant, pour leurs propriétés de fluorescence qui pourraient

permettre un suivi par mesure optique. Les caractéristiques d'autofluorescence intrinsèques de ces 3 molécules permettent de préconiser les longueurs d'onde à cibler pour un futur capteur : une excitation à 270-280 nm, et une mesure d'émission dans la gamme 300-350 nm sont à privilégier.

2. VALIDATION AU CHAMP DE LA NATURE PREDICTIVE DE LA SIGNATURE METABOLIQUE

2.1 MATERIEL & METHODES

Nous avons implanté une expérimentation au champ sur le site de Villiers-le-bâcle (91 ; Lat-Long-Alt : 48.73-2.11-175). L'expérimentation a consisté en 6 micro-parcelles de 20 m², subdivisées en 3 sous parcelles permettant de répéter chaque observation 3 fois, de la variété de référence du projet (Alixan). Ces parcelles ont permis de mettre en place un dispositif expérimental croisant les facteurs suivants :

- Maladie : 3 niveaux
 - o Non-traité fongicide, inoculé : cette modalité est donc attendue comme étant la plus touchée par la maladie, du fait de l'inoculation (à 3 dates) par la souche de référence du projet.
 - o Non-traité fongicide, non-inoculée : on s'attend à un niveau intermédiaire de maladie, qui progressera naturellement selon les conditions climatiques et l'inoculum endogène du site.
 - o Traité fongicide, non-inoculé : cette modalité est attendue comme ayant très peu de maladie grâce à la protection par les fongicides. Elle constitue le témoin sans maladie.
- Ombrage : 2 niveaux. Ce facteur expérimental a été introduit car la production de plusieurs substances fluorescentes chez les plantes en général et le blé en particulier sont liées aux niveaux de luminosité auxquels celles-ci sont exposées. Les 2 niveaux d'ombrage ont été obtenus grâce à la pose d'un mini-tunnel au-dessus de la moitié des parcelles du dispositif, dans la période précédant les prises de mesure. Au final, ceci ne s'est pas avéré pertinent pour la signature fluorescente de la septoriose, car la voie métabolique impliquée n'est pas régulée par la lumière. En conséquence, les mesures ont soit été réalisées uniquement sur la modalité non-ombrée, soit les mesures ont été prises sur les 2 modalités mais ont été considérées comme des répétitions supplémentaires.

Les 3 inoculations ont été réalisées au pulvérisateur expérimental, au cours de la période d'extension de la dernière feuille du blé : les 22/05/2013, 29/05/2013 et 04/06/2013. Des prélèvements et observations ont ensuite été réalisés sur chaque unité expérimentale, à 13 dates (Tableau 1). Un suivi visuel de la proportion de surface portant des symptômes a été réalisé à chaque date, sur 10 feuilles F1 (feuilles drapeau), 10 feuilles F2 (feuilles en dessous de la feuille drapeau) et 10 feuilles F3. Des analyses complémentaires de dosage de MS et de quantification par PCRq de la biomasse de *Z. tritici* ont été réalisées sur les feuilles F1 : parmi les 10 observées, 3 ont été prélevées pour analyse métabolomique, et 7 pour analyse PCRq.

Dates prélèvement/observation		Observation visuelle	PCRq	Dosage métabolites
1	21 Mai	X	X	
2	29 Mai	X	X	
3	04 Juin	X	X	X
4	11 Juin	X	X	

5	14 Juin	X	X	X
6	18 Juin	X	X	X
7	21 Juin	X	X	
8	24 Juin	X	X	
9	28 Juin	X	X	X
10	02 Juillet	X	X	X
11	05 Juillet	X	X	X
12	08 Juillet	X	X	
13	12 juillet	X		

Tableau 1 : Résumé des différentes observations et mesures effectuées ; summary of different observations and mesures

2.1.1. Analyse PCRq

Les échantillons de 7 feuilles sont broyés finement au broyeur à billes et 50 mg de matière broyée est ensuite utilisée pour extraire l'ADN global (plante et champignon) à l'aide du DNeasy Plant Mini KIT de Qiagen®. Les amorces utilisées pour la quantification ciblent le gène nucléaire mono-copie de la mannitol déshydrogénase. Les résultats sont exprimés en pg ADN fongique/ng ADN blé, après transformation logarithmique.

2.1.2. Analyses métabolomiques

Les feuilles prélevées sont placées au champ dans des tubes contenant de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C. Les échantillons sont broyés et lyophilisés, et 30 mg de poudre sont utilisés pour réaliser des extractions au méthanol à 80%. Le rendement d'extraction est évalué grâce à l'ajout d'une quantité connue d'acide salicylique radiomarké aux 30 mg. Les échantillons sont repris dans 500 µL de tampon de charge composé de 90 % du mélange eau/TFA (0,05 %) et de 10 % d'Acétonitrile (CH₃CN). 50 µL sont injectés dans l'HPLC. La colonne utilisée est une colonne C18 en phase inverse ; 5 µm ; 4,6 x 250 mm (Symmetry, Waters). Les solvants d'élution sont le tampon A [eau/TFA (0,05 %)] et le tampon B (CH₃CN). Les résultats sont exprimés en unités d'émission de fluorescence.

2.1.3. Analyse des données

La démarche d'analyse de données poursuivie est la même que celle proposée par Gouache et al. (2009, 2011). Elle est réalisée uniquement sur les parcelles non-traitées. La dernière date de mesure a été exclue du fait de l'avancement des stades de la culture induisant un risque de confusion entre les symptômes de septoriose et la sénescence naturelle.

- Données de symptômes visuels : ajustement d'une courbe aux cinétiques de symptômes visuels en fonction du temps exprimé en sommes de température moyenne base 0°C, pour chaque unité expérimentale ; utilisation de chaque courbe pour calculer, pour chaque unité expérimentale, le temps thermique pour lequel les symptômes atteignent 10%. Cette date (exprimée en temps thermique) est considérée comme un indicateur fiable de « l'apparition/explosion des symptômes ».
- La date de chaque mesure par PCRq ou analyse métabolomique pour chaque unité expérimentale est ré-exprimée en temps thermique depuis l'apparition des symptômes :

on a donc pour chaque date de mesure PCRq/métabolomique également une mesure du temps restant jusqu'à (ou du temps écoulé depuis) l'apparition des symptômes

- Pour chaque date de prélèvement et chaque unité expérimentale, le temps restant jusqu'à (ou écoulé depuis) l'apparition des symptômes est exprimé en fonction de la mesure de PCRq ou le dosage de MS : pour la PCRq, on attend une relation linéaire, robuste entre années, conduites de culture, variétés, souches et méthodes d'inoculation. (Gouache et al., 2009, 2011)

2.2 RESULTATS ET DISCUSSION

L'ensemble des données acquises sont représentées Figure 3.

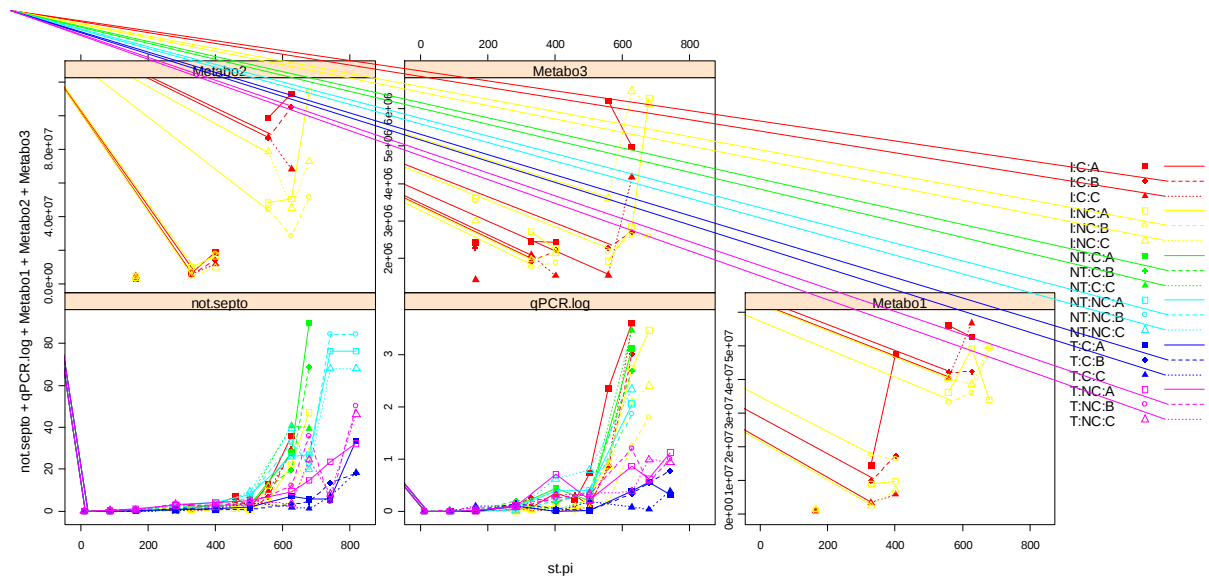
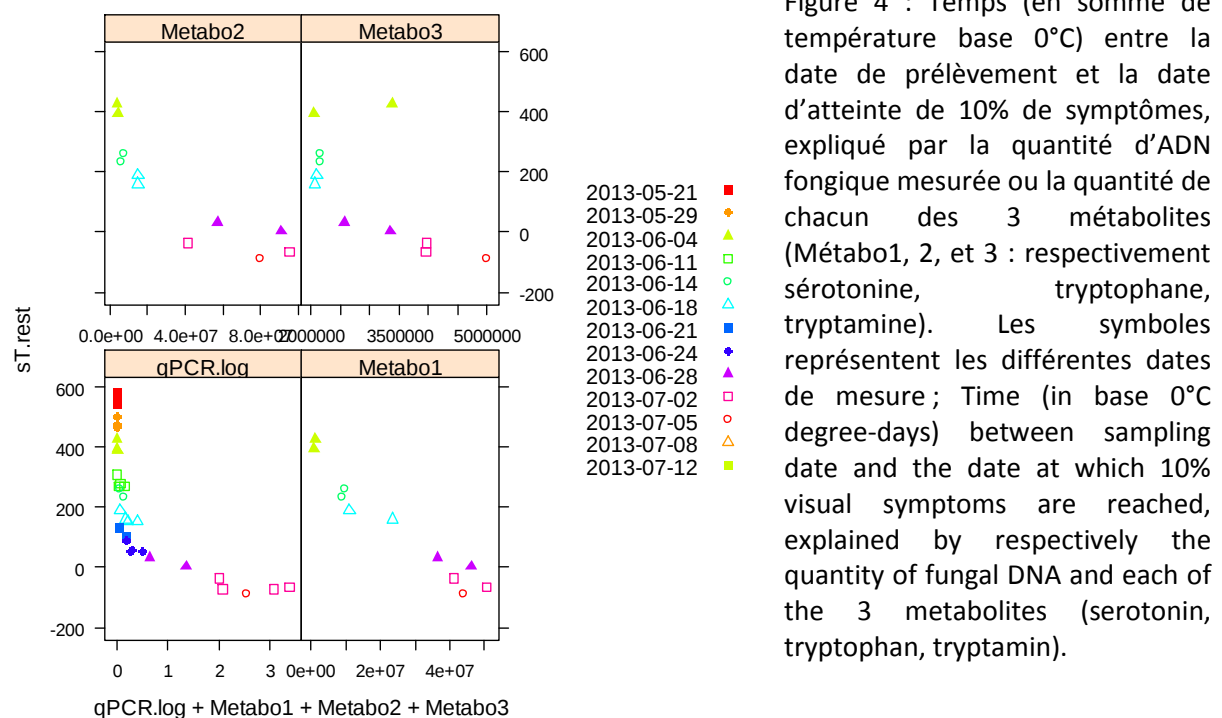


Figure 3 : Mesures de maladie en fonction du temps en somme de température base 0°C depuis la 1ère inoculation. 'not.septo' : symptômes visuels (% de surface atteinte) ; qPCR.log : quantité d'ADN (pg ADN fongique/ng ADN blé) log transformée ; Métabo1, 2, et 3 : quantification par fluorescence émise par les 3 MS ciblés (respectivement sérotonine, tryptophane, tryptamine ; unités de fluorescence). I, NT, T représentent les 3 niveaux du facteur « maladie » : inoculé, non-traité, traité respectivement. C, NC représentent les 2 niveaux de la modalité « ombrage » : couvert, non-couvert respectivement. A, B, C représentent les 3 répétitions ; Disease measurement as a function of time expressed as base 0°C cumulated mean daily temperature. 'not.septo' : visual symptoms (% de surface) ; qPCR.log : log transformed DNA quantity (pg fungal DNA/ng wheat DNA); Métabo1, 2, et 3 : quantification of the fluorescence emitted by each secondary metabolite (respectively serotonin, tryptophan, tryptamin ; fluorescence units). I, NT, T represent the 3 levels of the « disease » treatment: inoculated, untreated, treated respectively. C, NC represent the 2 levels of the « shading » treatment: shaded and unshaded respectively. A, B, C represent the 3 repetitions.

L'effet de l'inoculation sur la progression de la maladie n'est pas flagrant. Toutefois, on a une progression de l'épidémie qui est visible (nettement plus forte que sur le témoin traité) et cohérente entre l'ensemble des différentes mesures. La couverture par le tunnel a également favorisé l'installation de la maladie. Ceci est probablement dû à un effet de microclimat plus favorable, et à l'intérêt d'avoir généré des différences de niveau de maladie entre ces 2 modalités, ce qui permet d'obtenir une gamme de variation plus importante dans les modalités inoculées suivies par métabolomique.

Nous représentons ensuite Figure 4 les résultats de notre méthodologie d'analyse, qui vise à prédire le temps thermique jusqu'à l'apparition/explosion des symptômes (10%) par un dosage soit du pathogène (PCRq), soit des 3 métabolites ciblées précédemment. Les 3 premières mesures ont été effectuées concomitamment aux 3 inoculations. Si les inoculations, en particulier les 2 premières, ont été peu efficaces, ce qui semble possible au vu des évolutions de symptômes (Figure 3) similaires entre modalités inoculées et non-traitées, alors il est probable qu'il n'y avait pas encore de champignon sur les feuilles lors de ces 1ères dates. Néanmoins, lors de la 4ème mesure, alors que la maladie semble avoir très légèrement progressé, la mesure de la masse fongique ne semble pas ici assez sensible pour le prédire. Il est à noter que la méthode de quantification utilisée n'est pas la même que celle déployée dans Gouache et al. (2009, 2011) : les différences de protocole peuvent peut-être aussi expliquer en partie les divergences de sensibilité entre les résultats historiques et les résultats de cette expérimentation. Toutefois, celle-ci reste valable, c'est-à-dire qu'elle permet également d'obtenir le même type de résultat que précédemment, à savoir la possibilité de prédire la date d'apparition/explosion des symptômes à partir d'un dosage de l'agent pathogène.



On observe que chacun des 3 métabolites permet d'établir une relation linéaire de prédiction d'apparition des symptômes, en particulier dès lors qu'on exclut la date de mesure du 04/06/2013. On remarquera que pour le métabolite 3, une des mesures semble a priori problématique. Ensuite, on remarquera que le métabolite 1 semble offrir la relation la plus sensible, car dès la mesure du 04/06 la relation est clairement linéaire, alors qu'on semble encore être dans une phase moins sensible pour les 2 autres métabolites et la PCRq. De plus, l'analyse des écarts-type de mesure (données non-figurées) montre que le métabolite 1 est le plus précisément quantifié.

Cette expérimentation a permis de montrer que les métabolites fluorescents de la voie du tryptophane, identifiés précédemment, sont bien induits en situation d'infection par la septoriose au champ. Elle montre également que les quantités de métabolites ainsi produits par la plante en réaction à cette infection constituent de bons prédicteurs de l'évolution des symptômes, au même titre qu'un dosage du champignon lui-même par PCRq. La quantification de ces MS est donc substituable au dosage du champignon. Parmi les métabolites, la sérotonine semble être le

marqueur métabolique le plus précis pour diagnostiquer l'infection. L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que la recherche d'un signal par fluorescence, correspondant aux spectres d'émission de ces 3 composés, est *a priori* pertinente pour le suivi de la progression de l'épidémie au champ.

3. EVALUATION DE MESURES DE FLUORESCENCE POUR SUIVRE UNE EPIDEMIE DE SEPTORIOSE AU CHAMP

3.1 MATERIEL & METHODES

3.1.1. Expérimentation

En l'absence d'un capteur portable au champ répondant aux spécifications de longueurs d'onde des métabolites identifiés précédemment, nous avons mis au point un dispositif de mesure de spectres de fluorescence sur feuilles de blé prélevées. Le dispositif de mesures (figure 5A, 5B) est un spectrofluorimètre Cary Eclipse (Varian) doté d'un guide optique permettant une mesure « face avant » de l'échantillon. Le dispositif permet de 'scanner' la feuille de blé. Pour chaque feuille, nous enregistrons 12 points de mesures. Chaque zone d'acquisition mesure 1 cm de diamètre et les mesures se suivent le long de la feuille (figure 5C) ce qui permet de mesurer la majeure partie de la feuille. Nous avons réalisé des spectres d'émission de fluorescence de 300 à 350 nm sous excitation UV ($\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$)

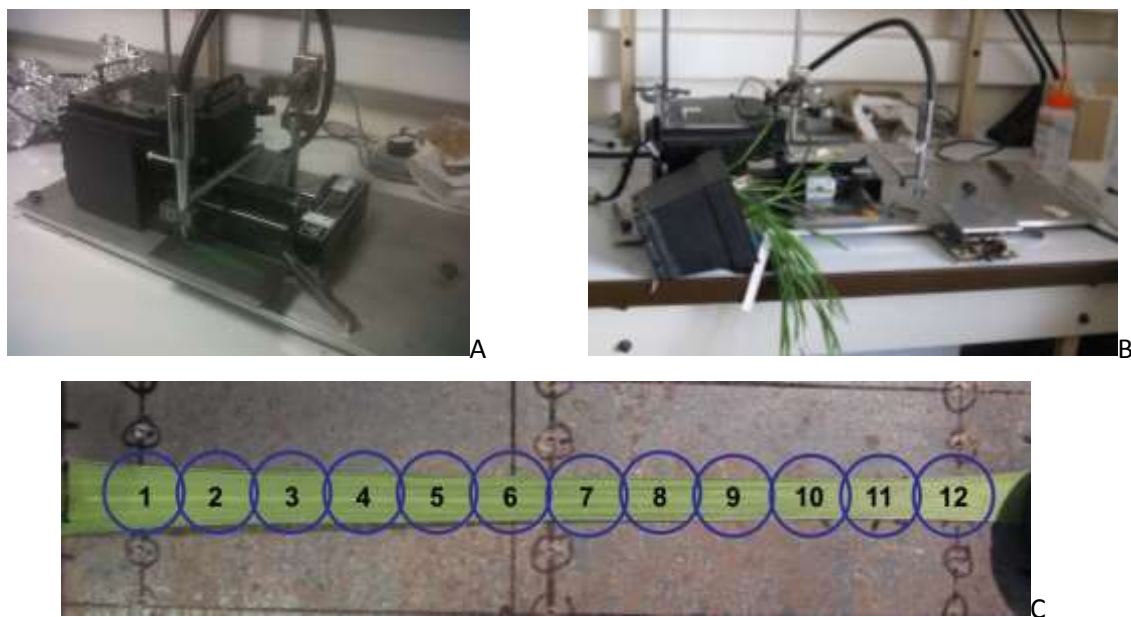


Figure 5. A : Photographie de l'ensemble du dispositif de mesure Spectrofluorimètre Cary Eclipse modifié. B : exemple de test sur plantule en pot. C : détail des 12 zones de mesure sur la feuille de blé ; A : Measurement system (modified Cary Eclipse Spectrofluorimeter). B : example of a test on a potted seedling. C : details of the 12 measurement zones on a wheat leaf

Etant donné la complexité de cette manipulation, nous avons souhaité scanner des feuilles en ayant la garantie que celles-ci porteraient effectivement des symptômes. Pour cette raison, nous avons choisi de compléter notre approche d'inoculation au pulvérisateur expérimental par une inoculation au pinceau. Ainsi, nous avons inoculé au pinceau, selon un protocole similaire à celui précédemment décrit, 100 feuilles F1 sur les parcelles inoculées du dispositif au champ de Villiers-le-bâcle. Cette inoculation a été réalisée le 05/06/2013, lendemain de la dernière inoculation au pulvérisateur. Nous avons ensuite prélevé à 7 dates (9, 12, 14, 16, 19, 21, 23 jai au pinceau) des feuilles pour analyse. A

chaque date, 10 feuilles inoculées au pinceau ainsi que 5 feuilles témoin de la modalité traitée ont été prélevées, la proportion de surface malade a été notée, puis les feuilles ont été analysées avec le dispositif de fluorimétrie. 5 des 10 feuilles inoculées ont également fait l'objet d'une quantification de la septoriose présente par PCRq.

3.1.1. Analyse de données

Il existe un gradient d'intensité de fluorescence de la ligule vers l'apex de la feuille. La première étape de traitement des spectres consiste donc à normaliser chaque spectre (un spectre = une zone de mesure sur une feuille à une date) en divisant les valeurs d'intensité de fluorescence par la valeur maximale du spectre. Pour chaque date de prélèvement, nous avons dans un 1^{er} temps cherché à établir si les spectres permettent de discriminer les feuilles inoculées des feuilles traitées. Ensuite, nous avons cherché à établir si les données des spectres pouvaient permettre de prédire la date d'apparition/explosion des symptômes. Comme précédemment, nous avons dans un 1^{er} temps établi cette date, en somme de températures base 0°C, en exploitant les observations de symptômes réalisées sur les feuilles prélevées. Nous avons ensuite cherché à mettre en relation le temps jusqu'à 10% de symptômes aux données des spectres. Chaque spectre est constitué de 18 valeurs d'émission sur la gamme de longueurs d'onde 300-350 nm. Pour chaque longueur d'onde, nous avons calculé la moyenne des 12 spectres normalisés de chaque feuille, puis des 10 feuilles de chaque date de prélèvement, obtenant ainsi une valeur par longueur d'onde et par date. Nous disposons donc de 18 variables potentiellement prédictives du temps restant jusqu'à l'apparition des symptômes, observé à 7 dates. Nous avons testé les corrélations avec chaque longueur d'onde individuelle, et également cherché à établir des modèles de prédiction par régression linéaire, régression PLS et elastic-net (Zou & Hastie, 2005 ; Gouache et al., 2015). Ces modèles ont été évalués en validation croisée « leave-one-out ».

3.2 RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure 6 présente les spectres normalisés moyens de chaque feuille prélevée lors de l'expérimentation.

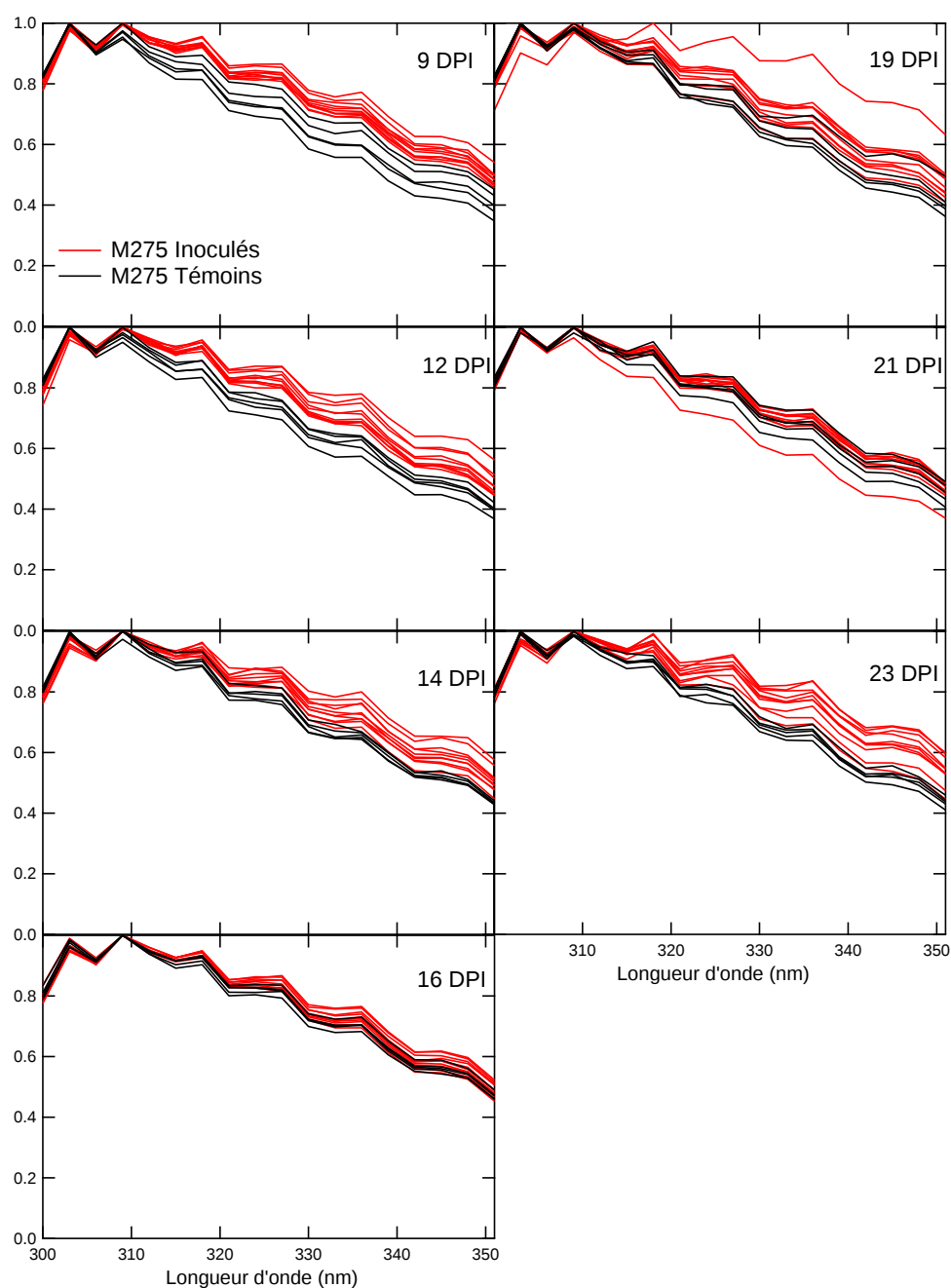


Figure 6 : Moyenne des spectres d'émission de fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 275 nm) normalisés à leur maximum des feuilles Témoins et Inoculé. Chaque fenêtre représente une date de mesure différente (DPI = days post-inoculation : jours après inoculation) ; Mean of fluorescence emission spectra (excitement wavelength 275 nm) normalized at their maximum, for Inoculated and Control leaves. Each window represents a different measurement date (DPI= days post inoculation)

Les spectres normalisés des feuilles inoculées se différencient des spectres des feuilles témoins. Cette séparation est nette dès 9 jours après inoculation. La largeur des spectres normés est plus grande sur les feuilles inoculées. Cette observation est cohérente avec la synthèse ou la sur expression de plusieurs composés par rapport aux feuilles témoins. Les 3 métabolites ciblés ont en effet des maxima de spectre d'émission entre 315 et 330 nm, induisant cet élargissement du spectre dans cette zone.

Aucune longueur d'onde individuelle des spectres ne nous a permis d'établir une relation prédictive avec la date d'apparition des symptômes. Les approches par elastic-net ou régression linéaire ont par

contre semblé permettre d'établir une relation. Toutefois, la validation croisée des modèles obtenus a indiqué une RMSEP de 45 à 52 °C-jours., alors que la RMSE des modèles était proche de 0°C. Etant donné le faible nombre d'observations disponibles dans cette expérimentation, il est très probable que cela corresponde à un sur-paramétrage. Dit autrement, nous ne disposons pas avec cette seule expérimentation d'assez de points pour espérer établir une relation robuste. Cela est d'autant plus vrai que la quantité de pathogène, attestée à la fois par les symptômes visuels et les quantifications par PCRq (données non montrées), est restée assez faible sur cette expérimentation, étant donné que l'inoculation au pinceau ne couvre qu'une petite zone de chaque feuille. Ces analyses statistiques ont toutefois indiqué que les longueurs d'onde du spectre d'émission les plus prédictives se concentrent dans la zone 300-330, autour des maxima d'émission des 3 métabolites.

4. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

4.1 LIMITES DE L'ÉTUDE ET TRAVAUX A MENER

Nos travaux ont permis d'identifier des voies métaboliques induites chez le blé lors d'une attaque par la septoriose. Parmi ces voies, celle de la sérotonine produit plusieurs métabolites émettant une fluorescence UV-UV (λ_{exc} 275 nm ; $\lambda_{\text{ém}}$ =315-330 nm). Nous avons pu vérifier que cette production de métabolites avait bien lieu dans des conditions de plein champ, à des stades pertinents du point de vue de la mise en œuvre de traitements phytosanitaires. De plus cette production apparaît tout aussi prédictive du développement des symptômes que la quantification du champignon lui-même (Gouache et al., 2009 ; 2011). Au champ, les spectres UV-UV de feuilles inoculées se distinguent bien des spectres de feuilles saines. Toutefois, les seules données produites dans le cadre de ce travail n'ont pas permis d'établir une équation prédictive du développement des symptômes, faute d'un nombre de données suffisant. Il apparaît donc nécessaire de poursuivre les travaux, en déclinant les protocoles mis en place lors de cette étude sur un nombre de situations important. Acquérir un nombre de spectres suffisant pour établir de telles équations constitue la prochaine étape majeure dans l'établissement du cahier des charges d'un futur capteur optique portable. En effet, il sera déterminant dans la conception du capteur de déterminer combien de longueurs d'onde d'émission doivent être mesurées.

Ces expérimentations supplémentaires devront aussi contribuer à établir le niveau de spécificité et de robustesse de cette réponse du blé à la septoriose. En effet, le rôle de cette voie métabolique a été établi dans les réactions de défense du blé (vis-à-vis de *Pyrenophora tritici* repentis et *Fusarium graminearum* : Du Fall & Solomon ; 2013, Gunnaiah et al., 2012), du riz (Ishihara et al., 2008) et de *Brachypodium distachyon* (Pasquet et al., 2014). Il sera donc important d'établir si l'induction de cette voie métabolique, et la signature fluorescente qu'elle crée, est spécifique de *Z. tritici*, ou si elle peut également être due à d'autres agents pathogènes. Il sera également important d'établir la robustesse de cette signature fluorescente en fonction du niveau de résistance de l'hôte et de virulence et/ou agressivité du pathogène. En effet, les études précédemment citées montrent que les produits de cette voie peuvent être impliqués dans un comportement de résistance (Ishihara et al., 2008 ; Du Fall & Solomon, 2013 ; Gunnaiah et al., 2012), de manière dépendante de la souche utilisée (Pasquet et al., 2014). Nos travaux montrent que cette voie est clairement induite lors d'une interaction compatible, mais montrent aussi qu'elle peut limiter la progression de la septoriose (Chaouch et al., 2015). Il sera donc nécessaire d'établir si la relation quantitative entre production de métabolites et développement des symptômes est modulée par le niveau de résistance.

4.2 PERSPECTIVES DE MISE EN ŒUVRE ET POTENTIEL POUR L'OPTIMISATION DES TRAITEMENTS

Le positionnement judicieux des traitements contre la septoriose permet d'obtenir des performances agronomiques équivalentes à l'application de doses supérieures de 25 % (Gouache & Couleaud, 2009 ; 2010). Aujourd'hui, les outils disponibles pour effectuer ce type de raisonnement sont des outils d'aide à la décision basés sur des modèles épidémiologiques, tenant compte de facteurs

agronomiques et climatiques (Gouache & Couleaud, 2009 ; Gouache et al., 2013). Certains outils proposent d'utiliser une ou des observations pour améliorer la précision de leurs simulations (Audsley et al., 2005 ; El Jarroudi et al., 2009). Une intégration complète du modèle agrométéorologique SeptoLIS® avec le futur capteur pourrait ainsi offrir une aide à la décision au positionnement du 1^{er} traitement, via par exemple une stratégie d'assimilation de données (Naud et al., 2009). Lors du projet, nous avons également cherché à évaluer l'intérêt d'approches en réseau, à savoir d'exploiter les données de réseaux d'observation épidémiologique, tels que ceux mis en place pour le Bulletin de Santé du Végétal (Sine et al., 2010) pour les combiner aux prédictions du modèle. Nous avons vu que la combinaison des données de simulation et des observations du réseau pouvaient permettre d'améliorer les conseils (Esquirol, 2012). Toutefois, cet intérêt est probablement sous-évalué dans cette étude, qui s'appuie sur des symptômes observés, et ne bénéficie pas du principal intérêt du futur capteur, à savoir une anticipation sur la sortie des symptômes, particulièrement pertinent pour cette maladie à temps de latence long (Lovell et al. 2004, Viljanen-Rollinson et al. 2005 ; Sanchez-Vallet et al., 2015).

Le futur capteur offrirait également la possibilité d'une application pour de la modulation de dose intra-parcellaire. En effet, des travaux d'Arvalis menés avec la Chambre d'Agriculture d'Ile de France en 2008 (Brouant & Gouache, non publié) ont montré qu'au sein d'une même parcelle agricole pouvaient exister des zones dans lesquelles aucune application de fongicide n'est nécessaire, alors que d'autres nécessitent l'application d'un programme à pleine dose. Cette différence était effectivement visible au niveau des symptômes observés de septoriose, et pourrait donc potentiellement être détectable. Une étude de cas plus complète, menée sur rouille jaune (West et al. 2003) a ainsi montré que les économies de traitement obtenues via une modulation intra-parcellaire pouvaient atteindre 80 %.

4.3 CONCLUSION

Nos travaux démontrent qu'il est possible de détecter, de manière précoce, le développement de la septoriose lors d'une épidémie au champ, via des capteurs de fluorescence UV-UV, qui détectent l'induction par la septoriose de la production de métabolites secondaires fluorescents de la voie métabolique tryptophane-sérotinine. De nombreuses questions persistent toutefois pour établir les spécifications techniques d'un tel capteur, en particulier les longueurs d'onde d'émission à mesurer pour établir une équation de prédiction. Il est donc nécessaire de poursuivre les travaux avec plusieurs expérimentations. Dans le contexte du plan Ecophyto, ce type d'outil ouvrirait des perspectives d'optimisation de traitements à même d'offrir des baisses d'utilisation de produit de 25 à 80 % suivant les sources (Gouache & Couleaud, 2009 ; West et al., 2003), pour la principale maladie du blé, qui constituent le 1^{er} consommateur de fongicides à l'échelle européenne (O'Driscoll et al., 2014).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le soutien du Ministère de l'Agriculture, dans le cadre de l'appel à projets Recherche finalisée et Innovation dans les instituts techniques agricoles de 2010, qui a subventionné le projet AAPIT n° 1014 « MiCODetect : Mise au point d'un Capteur Optique de Détection présymptomatique de Septoria tritici pour la lutte intégrée contre la septoriose du blé »

BIBLIOGRAPHIE

Agati, G., Cerovic, Z. G., Dalla Marta, A., Di Stefano, V., Pinelli, P., Traversi, M. L., & Orlandini, S. 2008. Optically-assessed preformed flavonoids and susceptibility of grapevine to *Plasmopara viticola* under different light regimes. *Functional plant biology*, 35(1), 77-84.

Arvalis (2010). Choisir et décider. Nord-Pas de Calais, Picardie, Champagne-Ardenne, Lorraine : traitements et interventions de printemps.

Audsley E., Milne A., Paveley N., 2005. A foliar disease model for use in wheat disease management decision support systems. *Aspects of Applied Biology* 147, 161-172.

Chaouch S, JC Pasquet, F Bellvert, MH Lebrun, M Dufresne, JM Seng, D Gouache, P Saindrenan. 2015. Induction of tryptophan-derived and hydroxycinnamic acid amide secondary metabolites and alteration of the primary metabolism during infection of wheat (*Triticum aestivum*) by *Zymoseptoria tritici*. *Plant Biology Scandinavia*. 9-13 August 2015. Stockholm, Sweden.

Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P. 2002 Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* 14(5):1093-107

Cohen, L., & Eyal, Z. (1993). The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathology*, 42(5), 737-743.

Deller S, Audeon C, Lafarge S, Pichon JP, Morel JB, Corbeau C, Marcel T, Paillrd S, Barloy D, Lebrun MH. 2011. Transcriptomics of the wheat interaction with *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*). 8th International Symposium on *Mycosphaerella* and *Stagonospora* Diseases of cereals 11-14 Sept. 2011. Mexico City, Mexico

Du Fall, L. A., & Solomon, P. S. 2013. The necrotrophic effector SnToxA induces the synthesis of a novel phytoalexin in wheat. *New Phytologist*, 200(1), 185-200.

El Jarroudi, M., Delfosse, P., Maraite, H., Hoffmann, L., & Tychon, B. 2009. Assessing the accuracy of simulation model for *Septoria* leaf blotch disease progress on winter wheat. *Plant Disease*, 93(10), 983-992.

Esquirol, L. 2012. Comment coupler observations et prédictions pour améliorer les prédictions d'épidémie de Septoriose sur le blé? Rapport de Master. AgroCampusOuest. 95 p.

Fraaije, B. A., Bayon, C., Atkins, S., Cools, H. J., Lucas, J. A., & Fraaije, M. W. (2012). Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors , the new weapons in the battle to control *Septoria* leaf blotch in wheat, 13(3), 263–275. doi:10.1111/J.1364-3703.2011.00746.X

Gohari, A.M., Ware, S. B., Wittenberg, A. H., Mehrabi, R., Ben M'Barek, S., Verstappen, E. C., ... & Kema, G. H. 2015. Effector discovery in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular plant pathology*.

Goodwin, S. B., Barek, S. B. M., Dhillon, B., Wittenberg, A. H. J., Charles, F., Hane, J. K., ... Kema GHJ. 2011. Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure , Chromosome Plasticity , and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genetics*, 7(6). doi:10.1371/journal.pgen.1002070

Gouache D., Selim S., Roisin C., Sansenne J. 2009. La PCR quantitative. Un potentiel à creuser pour la prévention du développement des symptômes de septoriose. AFPP. 9ème conférence Internationale sur les maladies et les plantes - Tours

Gouache D., Couleaud G. 2009. Le positionnement des traitements fongicides : enjeu pour la septoriose et intérêt du modèle "Septolis". AFPP. 9ème conférence Internationale sur les maladies et les plantes – Tours

Gouache D, S Thepot, C Roisin-Fichter, S Selim 2011. Exploring quantitative relationships between mycelial growth and visual symptoms of *Septoria tritici*. 8th International Symposium on *Mycosphaerella* and *Stagonospora* Diseases of cereals 11-14 Sept. 2011. Mexico City, Mexico

Gouache D, A Bensadoun, F Brun, C Pagé, D Makowski, D Wallach. 2013 Modelling climate change impact on *Septoria tritici* blotch (STB) in France: accounting for climate model and disease model uncertainty. *Agricultural and Forest Meteorology* 170, pp. 242-252

Gouache D, MS Leon, F Duyme, P Braun. 2015 A novel solution to the variable selection problem in Window-Pane approaches of plant pathogen-climate models: development, evaluation and application of a climatological model for brown rust of wheat. *Agricultural and Forest Meteorology* 205, 51-59

Gunnaiah R, Kushalappa AC, Duggavathi R, Fox S, Somers DJ (2012) Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 7(7): e40695. doi:10.1371/journal.pone.0040695

Jørgensen, L.N., Jahn, M., Clark, B., Antichi, D., Góral, T., Schepers, H., Lucas, P., Gouache, D., Hornok, L. 2008 Report on Best control practices of diseases in winter wheat in 8 countries in the EU. ENDURE Project

Hammond-Kosack KE, Rudd JJ. Plant resistance signalling hijacked by a necrotrophic fungal pathogen 2008 *Plant Signalling and Behavior* 3:11, 993-995

Ishihara, A., Hashimoto, Y., Tanaka, C., Dubouzet, J. G., Nakao, T., Matsuda, F., ... & Wakasa, K. 2008. The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *The Plant Journal*, 54(3), 481-495.

Kema GHJ, Yu D, Rijkenberg FHJ, Shaw MW, Baayen RP. 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86, 777–786.

Keon J, Antoniw J, Carzaniga R, Deller S, Ward JL, Baker JM, Beale MH, Hammond-Kosack K, Rudd JJ. 2007. Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to Programmed Cell Death (PCD) of its susceptible wheat host. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 20, 178–193.

Lovell, D. J., T. Hunter, et al. 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* 53(2): 170-181.

Manning VA, Chu AL, Steeves JE, Wolpert TJ, and Ciuffetti LM (2009) A Host-Selective Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, Ptr ToxA, Induces Photosystem Changes and Reactive Oxygen Species Accumulation in Sensitive Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(6), 665-676

Maufras JY, Maumene C, Couleaud G, Bousquet N 2006 ; Comment résister à la résistance ? ; *Perspectives Agricoles* n°328 (Novembre 2006)

M'Barek, S. B., Cordewener, J. H., van der Lee, T. A., America, A. H., Gohari, A. M., Mehrabi, R., ... & Kema, G. H. (2015). Proteome catalog of *Zymoseptoria tritici* captured during pathogenesis in wheat. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 42-53.

Morais, D. 2015. Les déterminants des phases épidémiques précoces de la septoriose du blé (*Zymoseptoria tritici*) : quantité, efficacité et origine de l'inoculum primaire. Thèse de doctorat AgroParisTech. 206 p.

Naud, C., D. Makowski, M.H. Jeuffroy. 2009. Leaf transmittance measurements can improve predictions of the nitrogen status for winter wheat crop. *Field Crops Research* 110: 27-34.

O'Driscoll, A., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J., & Mullins, E. 2014. The wheat–Septoria conflict: a new front opening up?. *Trends in plant science*, 19(9), 602-610.

Pandelova I, Betts MF, Manning VA, Wilhelm LJ, Mockler TC, Ciuffetti LM. 2009. Analysis of transcriptome changes induced by Ptr ToxA in wheat provides insights into the mechanisms of plant susceptibility. *Molecular Plant* 2(5):1067-83.

Pasquet, J. C., Chaouch, S., Macadré, C., Balzergue, S., Huguet, S., Martin-Magniette, M. L., ... & Dufresne, M. 2014. Differential gene expression and metabolomic analyses of *Brachypodium distachyon* infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of *Fusarium graminearum*. *BMC genomics*, 15(1), 629.

- Poutaraud, A., Latouche, G., Martins, S., Meyer, S., Merdinoglu, D., & Cerovic, Z. G. 2007. Fast and local assessment of stilbene content in grapevine leaf by in vivo fluorometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 4913-4920.
- 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.
- Rudd, J. J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., ... & Courbot, M. 2015. Transcriptome and Metabolite Profiling of the Infection Cycle of *Zymoseptoria tritici* on Wheat Reveals a Biphasic Interaction with Plant Immunity Involving Differential Pathogen Chromosomal Contributions and a Variation on the Hemibiotrophic Lifestyle Definition. *Plant physiology*, 167(3), 1158-1185.
- Sánchez-Vallet, A., McDonald, M. C., Solomon, P. S., & McDonald, B. A. 2015. Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph?. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 29-32.
- Shetty NP et al. 2009 Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 60 (15) 4287–4300
- Sine, M., Morin, E., Simonneau, D., Brochard, M., de Cosnac, G., & Escriou, H. (2010). VIGICULTURES–An early warning system for crop pest management. IAAALD XIIIth World Congress (pp. 26-29).
- Steinberg, G. 2015. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 17-23.
- Stergiopoulos I, Zwiers LH, De Waard MA. 2003 The ABC Transporter MgAtr4 Is a Virulence Factor of *Mycosphaerella graminicola* that Affects Colonization of Substomatal Cavities in Wheat Leaves *Molecular Plant–Microbe Interactions* 16 (8)
- Suffert, F., & Satche, I. 2011. Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe, 1–12. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02455.x
- Suffert, F., Satche, I., & Lannou, C. 2011. Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum, 1–12. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02369.x
- Suffert, F., Satche, I., & Lannou, C. 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology*, 62(6), 1330-1341.
- Viljanen-Rollinson, S. L. H., M. V. Marroni, et al. 2005. Latent periods of *Septoria tritici* blotch on ten cultivars of wheat. *New Zealand Plant Protection* 58: 256-260.
- West JS, Bravo C, Oberti R, Lemaire D, Moshou D, and McCartney HA. 2003. The potential of optical canopy measurement for targeted control of field crop diseases. *Annual Reviews in Phytopathology* 41:593–614
- Zou, H., & Hastie, T. 2005. Regularization and variable selection via the elastic net. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*, 67(2), 301-320.