



Déterminisme de la sensibilité du blé tendre à la Fusariose de l'épi

Francis Fabre

► To cite this version:

Francis Fabre. Déterminisme de la sensibilité du blé tendre à la Fusariose de l'épi. Agronomie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2020. Français. NNT : 2020CLFAC072 . tel-03349193

HAL Id: tel-03349193

<https://theses.hal.science/tel-03349193>

Submitted on 20 Sep 2021

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.

Université Clermont-Auvergne

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

**Présentée à l'Université Clermont-Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université**

Soutenue le 11 Mars 2020

Francis Fabre

Déterminisme de la sensibilité du blé tendre à la fusariose de l'épi

Sous la direction de :

Thierry Langin et Ludovic Bonhomme

Membres du jury :

Bruno Favery, Directeur de recherche INRAE

Isabelle Fudal, Directrice de recherche INRAE

Elodie Gaulin, Maître de Conférences Habilitée à diriger des recherches

Maria Manzanares-Dauleux, Professeure des Universités

Ludovic Bonhomme, Maître de Conférences Habilité à diriger des recherches

Thierry Langin, Directeur de recherche CNRS

UMR 1095 INRAE – Université Clermont Auvergne

« Génétique, Diversité et Écophysiologie des Céréales »

Équipe Maladies Des Céréales

5 chemin de Beaulieu – 63000 Clermont-Ferrand

Résumé

Les cultures de blé sont régulièrement exposées à une forte pression parasitaire exercée par un cortège complexe d'agents pathogènes capables d'attaquer les différentes parties de la plante. La fusariose de l'épi ou FHB (*Fusarium head blight*), principalement causée par le champignon ascomycète *Fusarium graminearum*, représente une préoccupation majeure, car cette maladie affecte non seulement le rendement et la qualité des grains, mais également leur état sanitaire via la production *in planta* de mycotoxines. A ce jour, les méthodes de lutte reposent sur l'utilisation combinée de pratiques culturales adaptées, de traitements fongicides et de cultivars génétiquement plus résistants. Toutefois, lors d'épisodes climatiques favorables et de fortes pressions parasitaires, ces méthodes s'avèrent incapables de contrôler efficacement le développement d'épidémies dommageables pour les cultures, la raison étant la faible efficacité de la grande majorité des sources de résistance présentes dans les variétés cultivées. Identifier des sources de résistance plus efficaces et surtout plus durables représente aujourd'hui un objectif majeur. Une des alternatives à la recherche de source de résistance classiques repose sur l'identification des facteurs clefs contrôlant la sensibilité de la plante à un agent pathogène, et leur utilisation pour générer des résistances considérées comme potentiellement plus durables. De façon à identifier des gènes de sensibilité du blé au champignon *F. graminearum*, agent principal de la fusariose de l'épi chez le blé tendre, nous avons mis en place, une stratégie exploratoire à large échelle tenant compte de la diversité, de la dynamique et des spécificités des événements moléculaires protéiques imputables aux deux protagonistes. Cette stratégie nous a donné accès pour la première fois aux ajustements simultanés des protéomes végétal et fongique au cours des étapes précoces de l'interaction, et plus spécifiquement lors de la transition 48 – 72 hpi. Ces résultats suggèrent que la stratégie fongique s'ajuste de manière dynamique au contexte du développement du grain. De plus, la surreprésentation de motifs d'adressage chloroplastique retrouvée au niveau des séquences protéiques des effecteurs fongiques, associée aux variations d'abondances des protéines du chloroplaste, suggèrent que cet organite pourrait être une des cibles principales des effecteurs fongiques et un élément clé du processus de manipulation parasitaire. Enfin, l'analyse fine du dialogue moléculaire contrôlant le développement de l'interaction entre différents cultivars de blé avec différentes souches fongiques a permis de mettre en évidence l'existence d'un core dual-protéome dont les seules variations quantitatives de ces composantes permettent d'expliquer les différents niveaux de sensibilité ou d'agressivité observés. Ce corpus de résultats permet de proposer la sensibilité comme étant issue de processus moléculaires communs entre différents fonds génétiques de blé et servira de base pour l'élaboration de nouvelles sources de résistance.

Mots clés : Sensibilité ; Dual-protéome ; Blé ; *Fusarium graminearum* ; Dialogue moléculaire

Abstract

Wheat crops are regularly exposed to high parasitic pressure from a complex procession of pathogens that can infect different parts of the plant. Fusarium head blight, caused mainly by the fungus *Fusarium graminearum*, is a major concern as it affects not only the yield and quality of grains but also their health status through the production of mycotoxins. Currently, the most effective control methods are based on the combined use of genetically more resistant cultivars, adapted cultivation practices and fungicide treatments. However, during favourable climatic episodes and high parasitic pressure, these methods are all unable to effectively control the development of damaging crop epidemics, largely due to the relatively low efficacy of the sources of resistance present in cultivated varieties. Identifying more effective and, above all, more sustainable sources of resistance is now a major objective. One of the alternatives to the search for classical sources of resistance is based on the identification of key factors controlling the plant's susceptibility to a pathogen, and their use to generate resistances that are considered potentially more durable. In order to identify wheat susceptibility genes to the fungus *F. graminearum*, the main agent of Fusarium head blight in wheat, we have developed a large-scale exploratory strategy taking into account the diversity, dynamics and specificities of the protein molecular events attributable to the two protagonists. This strategy allowed to access for the first time to simultaneous adjustments of the plant and fungal proteomes during the early stages of the interaction, and more specifically during the 48 – 72 hpi transition. These results suggest that the fungal strategy adjusts dynamically to the context of grain development. Moreover, the over-representation of chloroplast addressing motifs found in the protein sequences of fungal effectors, associated with variations in the abundance of chloroplast proteins, suggest that this organelle could be one of the main targets of fungal effectors and a key element in the parasite manipulation process. Finally, the analysis of the molecular dialogue controlling the development of the interaction between different wheat cultivars with different fungal strains revealed the existence of a core dual-proteome whose only quantitative variations in these components explain the different levels of susceptibility or aggressiveness observed. This corpus of results makes it possible to propose susceptibility as resulting from common molecular processes between different wheat genetic backgrounds and will serve as a basis for the development of new sources of resistance.

Keywords: Susceptibility; Dual-proteome; Wheat; *Fusarium graminearum*; Molecular dialogue

Remerciements

En premier lieu, je souhaiterais remercier **Thierry Langin** de m'avoir accueilli au sein de l'équipe Maladies des Céréales. Un immense merci pour toutes les discussions passionnantes que nous avons pu avoir tout au long de ces trois ans, ainsi que pour toutes vos remarques constructives et vos conseils qui m'ont permis de toujours avancer.

J'aimerais également chaleureusement remercier mon second Directeur de Thèse, **Ludovic Bonhomme**, que je tiens pour seul responsable de mon si grand intérêt pour le monde de la recherche. Merci de m'avoir accepté pour un premier stage en laboratoire il y a maintenant quatre ans et merci de m'avoir à nouveau fait confiance en me proposant ce passionnant projet de recherche qui m'aura bien occupé ces trois dernières années. Merci pour votre patience (il en fallait...), pour vos connaissances, votre aide et, plus important encore, de m'avoir tout appris.

Un grand merci également à tous les membres de mon jury de thèse, **Bruno Favery, Isabelle Fudal, Elodie Gaulin** et **Maria Manzanares-Dauleux**, pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'évaluer mon travail de Thèse.

Je tiens bien sûr à remercier l'ensemble des membres de l'équipe MDC pour leur soutien sans faille lors de ces trois années passées à leur côté. Un grand merci à **Cyrille**, à la fois pour tous les conseils que tu m'as donnés, et puis pour quelques expériences inattendues comme la dégustation du vin le plus improbable qu'il m'ait été donné de boire (Château de Saintenac pour les ~~courageux~~ curieux). Un immense merci à **Florence** pour m'avoir conseillé sur la quasi-totalité des aspects techniques de mon travail de thèse, un peu moins pour m'avoir obligé à écouter de la variété française lors de mes manip au labo. Si des erreurs se sont glissées dans ma Thèse, c'est que je ne m'en suis toujours pas complètement remis... Merci également à toi **Olivier**, pour avoir su amener un peu de légèreté tout au long de ces trois ans. Un grand merci également à tous les autres membres de l'équipe toujours présents ou partis vers d'autres horizons. **Philippe, Christine, Pauline, David, Andréa, Manon, Caroline, Tarek, Melissa** et **Florian**, merci de m'avoir accompagné tout au long de cette

aventure et d'avoir participé à créer cet environnement enrichissant non seulement scientifiquement mais également humainement.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe DOPM, **Fred, Magalie, Pierre** pour leur bonne humeur et leur soutien. J'ajouterai une mention particulière pour **Sylvie** pour son aide efficace et précieuse, en particulier lors de nos longues sessions de broyage d'épi dans l'azote liquide.

Comment rédiger cette partie du manuscrit sans remercier toutes les personnes qui ont participé directement ou indirectement à l'accomplissement de ce travail de thèse ? Un immense merci à **Michel Zivy, Olivier Langella, Marlène Davanture, et Thierry Balliau** pour leurs conseils avisés ainsi que leurs contributions aux analyses protéomiques. Merci également à **Serge Urbach** pour son implication essentielle dans la réussite de ma première publication. Un énorme merci à **Joerg Bormann** pour avoir accepté de m'accompagner dans mon travail de thèse. Merci également à **Marie Dufresne** pour toutes les discussions enrichissantes qu'on a pu avoir et à **Aurélia Boulaflous** pour son expertise en microscopie.

Je tiens également à honorer la mémoire de mes deux organismes d'accueil, **l'Université Blaise Pascal (UBP)** et **l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)** qui n'ont malheureusement pas survécu à mon passage en leur sein. Reposez en paix. C'est donc l'occasion de remercier les deux nouveaux organismes qui m'ont recueilli, **l'Université Clermont-Auvergne (UCA)** et **l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE)**.

Pour terminer, je souhaiterais témoigner mon immense gratitude à ma famille pour leur soutien sans faille. À mes parents, qui ont toujours tout fait pour me faciliter la vie afin que je puisse me consacrer au maximum à ce travail de Thèse. Indéniablement, c'est grâce à eux si la science, elle avance ! Enfin, à ma petite sœur, qui malgré mon stress et ma fréquente mauvaise humeur a su me supporter. À vous trois, merci du fond du cœur...

Liste des Figures et Tables

Figure 1 : Représentation des abondances relatives des protéines quantifiées dans les spores et spores en germination des souches MDC_Fg1 et MDC_FgU1.

Figure 2 : Nombre de protéines identifiées dans les protéomes des spores et spores en germination des souches MDC_Fg1 et MDC_FgU1.

Figure 3 : Représentation schématique des différentes zones de l'épi de blé analysées.

Figure 4 : Dynamique de l'évolution de la sévérité des symptômes induits par les trois souches de *F. graminearum* au niveau des deux zones périphériques des trois cultivars de blé étudiés.

Figure 5 : Observations à la loupe binoculaire et au microscope confocal de l'épillet et du rachis de la zone inoculée avec une souche de *F. graminearum* marquée DsRed à 168 hpi.

Figure 6 : Observations à la loupe binoculaire du rachis en zones non inoculé UP et DOWN à 240 hpi.

Figure 7 : Nombre de protéines identifiées dans les protéomes des trois cultivars de blé.

Figure 8 : Représentation de la dispersion des échantillons issue de l'analyse en composante principale.

Figure 9 : Nombre de protéines de blé significativement impactées par les différents facteurs de l'ANOVA.

Figure 10 : Représentation des clusters moyens de variation d'abondance des protéines de blé significativement impactées par le facteur « Traitement ».

Figure 11 : Représentation des clusters moyens de variation d'abondance des protéines de blé significativement impactées par l'addition des facteurs « Cultivar » et « Traitement ».

Figure 12 : Représentation des clusters moyens de variation d'abondance des protéines de blé significativement impactées par l'interaction des facteurs « Cultivar » et « Traitement ».

Figure 13 : Représentation Heat map des changements d'abondance des protéines de blé présentant un effet significatif de l'interaction entre les cultivars et le fond génétique de la souche inoculée.

Figure 14 : Représentation des profils de variations d'abondance protéiques et des niveaux de transcrits dans les différents tissus de l'épi de blé des quatre starch synthase identifiées dans au moins une de nos expérimentations.

Figure 15 : Karyoplot représentant l'ensemble du génome du blé tendre.

Annexe 1 : Table indiquant les facteurs de sensibilité identifiés à partir de données bibliographiques et correspondant aux protéines de blé identifiées au cours de ce travail.

Annexe 2 : Table indiquant les protéines codées par les différents homéologues des gènes de sensibilité identifiés.

Table des matières

Résumé	i
Remerciements.....	iii
Liste des Figures et Tables	v
Introduction.....	1
I – La manipulation des processus de l’hôte détermine le devenir de l’interaction.....	1
a) <i>Les effecteurs fongiques, acteurs clés de la manipulation parasitaire</i>	2
b) <i>Adaptation passe-muraille</i>	5
c) <i>Inhibition de la perception de l’agent pathogène.....</i>	5
d) <i>Piratage des réseaux de transduction des signaux de danger</i>	6
e) <i>Contrôle des mécanismes moléculaires et physiologiques induits par la détection du pathogène</i>	7
f) <i>Détournement des voies de signalisation hormonales</i>	8
g) <i>Synthèse des protéines PR et adaptation des agents pathogènes fongiques</i>	9
II – Concepts de sensibilité et résistance chez les plantes	12
a) <i>Les limites des gènes de résistance</i>	12
b) <i>Le concept de sensibilité</i>	14
<i>Gènes S impliqués dans la reconnaissance de l’hôte</i>	15
<i>Gènes S impliqués dans la régulation des défenses de la plante.....</i>	16
<i>Gènes S impliqués dans la gestion des besoins métaboliques de l’agent pathogène</i>	17
c) <i>Les gènes de sensibilité comme une alternative pour améliorer la résistance des plantes ?.....</i>	17
d) <i>L’exploitation de la sensibilité pour améliorer la résistance n’est pas sans contreparties pour la plante</i>	19
III – Sensibilité et résistance dans le cadre de la fusariose de l’épi.....	21
a) <i>La Fusariose de l’épi, une maladie particulière</i>	21
b) <i>Lutte génétique et résistance du blé à la fusariose de l’épi</i>	23
c) <i>Concept de sensibilité dans le contexte de la fusariose du blé.....</i>	25
d) <i>État de l’art concernant la sensibilité du blé tendre à la Fusariose de l’épi.....</i>	29
Problématique et objectifs de la Thèse.....	38
Chapitre I – Analyse de la nature et de la dynamique des protéomes végétal et fongique, composantes fondamentales du dialogue moléculaire contrôlant le devenir de l’interaction entre le blé tendre et <i>F. graminearum</i>.	42
Introduction	42
Article 1 – Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving Fusarium head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism	45
Conclusion.....	64
Chapitre II – Impact des fonds génétiques de l’agent pathogène et de l’hôte sur le déterminisme de la maladie.....	66
Introduction	66

Axe 1 – Analyse du déterminisme de l’agressivité de <i>Fusarium graminearum</i> en interaction avec le blé tendre	68
Article 2 – Unbalanced roles of fungal aggressiveness and host cultivars in the establishment of the <i>Fusarium</i> head blight in bread wheat.....	68
Résultats complémentaires	83
a) Analyse des spécificités protéomiques des spores de deux souches de <i>F. graminearum</i> d’agressivité contrastée	83
b) Analyse de la sévérité des symptômes en zones non-inoculées des épis	85
c) Analyse de la colonisation de l’épi par le mycélium fongique	86
Conclusion.....	87
Axe 2 – Spécificité des réponses de différents fonds génétiques du blé tendre à l’infection de différentes souches de <i>Fusarium graminearum</i>	90
Résultats	90
a) Caractérisation des protéomes des trois cultivars de blé	90
b) Caractérisation des réponses génériques du blé à l’infection par <i>Fusarium graminearum</i>	92
c) Existe-t-il des protéines permettant de discriminer les cultivars de blé vis-à-vis de leur réponse au FHB ?	93
d) Existe-t-il des réponses spécifiques aux fonds génétiques de <i>F. graminearum</i> permettant de discriminer les cultivars de blé ?.....	94
Conclusion.....	96
Discussion générale	98
I – Le cycle infectieux démarre lors de la production des spores par le champignon	98
II – Le dialogue moléculaire entre le blé tendre et <i>F. graminearum</i> s’ajuste au développement du grain..	99
III – L’interaction entre le blé et <i>F. graminearum</i> se base sur un core dual-protéome	102
IV – Le chloroplaste constitue une interface privilégiée de la manipulation parasitaire pour le contrôle de l’homéostasie cellulaire de la plante.....	104
V – Contribution de ces travaux de Thèse à l’identification de nouveaux déterminants du devenir de l’interaction.....	106
Conclusion et perspectives	109
I - Les protéines fongiques disposant de séquences d’adressage aux chloroplastes s’accumulent-elles dans cet organe et quelles sont leurs cibles moléculaires ?	110
II – Exploration de la diversité des homéologues pour les gènes de sensibilité candidats	111
III – Existe-t-il une part de l’effectome des spores de <i>F. graminearum</i> spécifiquement stockée pour l’initiation de l’infection ?	113
Références bibliographiques	114
Matériels et Méthodes supplémentaires	149
I – Analyse des spécificités protéomiques des spores de deux souches de <i>F. graminearum</i> d’agressivité contrastée.....	149
II – Analyse de la colonisation de l’épi par le mycélium fongique	149
III – Spécificité des réponses de différents fonds génétiques du blé tendre à l’infection de différentes souches de <i>Fusarium graminearum</i>	150

<i>a) Identification et quantification des peptides et protéines à partir de l'analyse MS / MS</i>	<i>150</i>
<i>b) Analyses statistiques.....</i>	<i>150</i>
Production scientifique	152
<i>Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture :</i>	<i>152</i>
<i>Communications orales lors de congrès :</i>	<i>152</i>
<i>Communications par affiche lors de congrès :.....</i>	<i>153</i>

Introduction

I – La manipulation des processus de l'hôte détermine le devenir de l'interaction

Dans leur environnement, les plantes sont régulièrement soumises à des pressions biologiques qui, dans certains cas, peuvent aboutir à l'apparition de maladies susceptibles de compromettre leur développement. Ces agressions sont générées par un cortège complexe d'agents pathogènes et de ravageurs capables d'investir les différents compartiments de la plante (*e.g.* racines, tiges, feuilles, fruits). Parmi la grande diversité des agents pathogènes attaquant les plantes, les champignons sont responsables d'un plus grand nombre d'épidémies que tout autre groupe de phytoravageurs (tels que les virus, les bactéries ou les insectes) (Gladieux *et al.*, 2017). On estime qu'environ 10% des espèces fongiques identifiées peuvent induire une maladie chez plus de 10 000 plantes différentes (Horbach *et al.*, 2011). Lorsqu'une interaction plante – champignon pathogène est établie, les intérêts de la plante et de l'agent pathogène sont contradictoires, engendrant ainsi une dynamique évolutive entre les deux protagonistes via la mise en place de différentes stratégies de défense chez l'hôte et de manipulation chez le champignon. Cette dynamique enferme les partenaires de l'interaction dans un cycle évolutif sans fin marqué par une course à l'armement où l'un des protagonistes va tenter de prendre l'avantage sur l'autre (Woolhouse *et al.*, 2002). La coévolution établie entre les plantes et les champignons pathogènes a ainsi permis la mise en place d'un ensemble complexe de mécanismes de défense chez l'hôte auquel les agents pathogènes ont répondu en développant des stratégies de contournements. Ce modèle de coévolution imaginé par Leigh Van Valen à l'échelle de l'individu (van Valen, 1973), a trouvé plus récemment une traduction au niveau moléculaire dans le modèle de Jones and Dangl (2006). Cette coévolution moléculaire (couramment appelé « Modèle Zig-Zag ») se base sur le concept linéaire et binaire d'interaction gène-pour-gène élaboré par Flor dans les années 1970 (Flor, 1971). Il peut être décomposé en trois étapes successives : (i) détection du bioagresseur et induction de mécanismes de défense non-spécifiques de l'agent pathogène (PTI, Pattern Triggered Immunity), (ii) réponse de l'agent pathogène qui synthétise des molécules appelées « effecteurs » permettant de court-circuiter ce premier niveau de défense et, (iii) induction d'un deuxième niveau

d'immunité via la reconnaissance spécifique de certains de ces effecteurs (ETI, Effector Triggered Immunity) (Jones and Dangl, 2006). Par la suite, pour qu'une relation plante-pathogène soit considérée comme compatible, le champignon devra être capable de surmonter les réponses immunitaires spécifiques de la plante. Toutefois, il ne faut pas oublier que le modèle « Zig-Zag » est très simplificateur. Des études récentes semblent en effet indiquer que les relations entre les plantes et leurs pathogènes ne reposent pas uniquement sur des interactions gène-pour-gène, ni sur une dichotomie aussi marquée entre les mécanismes de défense basaux et spécifiques que ce qui est suggéré par le modèle « Zig-Zag » (Kanyuka and Rudd, 2019). Le clonage récent de nouveaux gènes de résistance aux maladies fonctionnant dans des interactions gène-pour-gène, mais ressemblant structurellement à des récepteurs de reconnaissance à large spectre, contribue à rendre moins claire la distinction entre PTI et ETI (Kanyuka and Rudd, 2019). Ces résultats ont conduit à l'élaboration d'un nouveau modèle basé, pour l'essentiel, sur une répartition spatiale des différentes formes d'immunité des plantes notamment vis-à-vis de la localisation intracellulaire ou extracellulaire du site de reconnaissance des agents pathogènes (van der Burgh and Joosten, 2019). Cela dit, le modèle « Zig-Zag » a l'avantage de montrer de manière très simple comment les agents pathogènes assurent, via la synthèse de leurs effecteurs, le contournement des défenses des plantes.

a) Les effecteurs fongiques, acteurs clés de la manipulation parasitaire

L'établissement d'une interaction compatible, c'est à dire pénétrer les tissus de la plante, les coloniser et s'y développer passe obligatoirement par la suppression ou la diminution de la réponse immunitaire de l'hôte (Mukhtar *et al.*, 2011 ; Toruño *et al.*, 2016). Pour cela, l'agent pathogène synthétise des molécules appelées effecteurs qui sont les acteurs moléculaires de la manipulation parasitaire (de Wit *et al.*, 2009). Bien que quelques exemples d'effecteurs aient été identifiés comme étant des micro-ARN (Jian and Liang, 2019), ou des métabolites secondaires (de Wit, 2016 ; Lo Presti *et al.*, 2015), la grande majorité des effecteurs fongiques connus sont de nature protéique (de Wit *et al.*, 2009 ; Lo Presti *et al.*, 2015 ; Stergiopoulos and de Wit, 2009). Une des difficultés majeures dans l'étude des effecteurs réside dans leur identification puisqu'ils se caractérisent par l'absence de motifs conservés dans la séquence protéique, notamment chez les champignons phytopathogènes

(Sperschneider *et al.*, 2018). La multiplication des séquences de génomes d'agents pathogènes fongiques a permis l'acquisition d'une quantité énorme de données pouvant être analysée pour la recherche d'effecteurs candidats (Alouane *et al.*, 2018 ; Cuomo *et al.*, 2007 ; Plissonneau *et al.*, 2017, 2018). Ces analyses peuvent être complétées, au cas par cas, par des données d'expression issues d'analyses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques. L'analyse comparée par recherche de similarité de séquence peut également être vue comme un moyen d'identifier de nouveaux effecteurs à condition qu'une homologie suffisante existe. Cette approche de type « Gène candidat » a entre autres permis l'identification chez *Laccaria Bicolor* de plusieurs effecteurs présentant une forte homologie avec des effecteurs déjà connus chez la rouille et d'autres champignons (Martin *et al.*, 2008) ainsi qu'avec un gène homologue au gène ToxA de *Pyrenophora tritici-repentis* chez *Septoria nodorum* (Friesen *et al.*, 2006). Malgré le faible degré de conservation de la séquence parmi les effecteurs fongiques, l'analyse d'un ensemble important d'effecteurs candidats a tout de même permis d'identifier quelques caractéristiques structurales qui semblent récurrentes chez ce type de protéines.

En premier lieu, les gènes codant pour les effecteurs sont souvent localisés dans des régions génomiques à évolution rapide (Raffaele and Kamoun, 2012 ; Rep and Kistler, 2010 ; Sperschneider *et al.*, 2016). La présence des gènes fongiques codant pour les effecteurs dans des régions génomiques variables pourrait s'expliquer par le fait que cela favorise l'évolution rapide et la diversification de ces gènes (Rep and Kistler, 2010). Les effecteurs sont également décrits comme étant des protéines de faible poids moléculaire possédant une teneur élevée en cystéine, leur permettant probablement d'être plus facilement sécrétées et de mieux résister à la dégradation par les protéines enzymatiques végétales présentes dans le compartiment péri-plasmique (Sperschneider *et al.*, 2016). La sécrétion des effecteurs constitue d'ailleurs une autre caractéristique partagée des protéines effectrices. Ce dernier point est particulièrement intéressant puisque, contrairement aux systèmes de sécrétions aujourd'hui très bien caractérisés chez les bactéries (Coburn *et al.*, 2007 ; Deng *et al.*, 2017 ; Nivaskumar and Francetic, 2014 ; Wallden *et al.*, 2010), les mécanismes permettant la sécrétion et l'internalisation des effecteurs fongiques dans les cellules végétales sont encore très mal connus.

Certains champignons phytopathogènes mettent en place des structures d'infection/nutrition appelées haustoria qui correspondent à une invagination de la membrane plasmique de la cellule hôte et qui pourraient permettre la sécrétion des effecteurs (O'Connell and Panstruga, 2006 ; Panstruga and Dodds, 2009). D'autres structures, telles que le BIC (Biotrophic Interface Complexe) chez *Magnaporthe oryzae* (Giraldo *et al.*, 2013 ; Khang *et al.*, 2010 ; Mosquera *et al.*, 2009) ou des hyphes infectieux chez *Ustilago maydis* (Freitag *et al.*, 2011), ont pu être observées dans certaines associations plante-champignon. Cependant, pour un grand nombre de champignons phytopathogène, aucune de ces structures n'a encore pu être observée. La prédiction d'une possible sécrétion des effecteurs candidats peut alors se faire via la recherche de motifs fréquemment identifiés dans des protéines fongiques co-localisant dans la cellule de l'hôte. Par exemple, un profil hautement conservé de sept acides aminés «RSIDELD» a été identifié au niveau de l'extrémité C-terminale de 25 protéines sécrétées du basidiomycète *Piriformospora indica* (Zuccaro *et al.*, 2011) ou encore le motif « Y/F/WxC » retrouvé dans une cinquantaine d'effecteurs chez *Blumeria graminis* (Godfrey *et al.*, 2010 ; Pedersen *et al.*, 2012) et *Diplocarpon rosae* (Neu and Debener, 2019). Actuellement, aucune preuve formelle confirmant l'implication de ces motifs dans l'entrée des effecteurs fongiques à l'intérieur des cellules de la plante n'a pu être apportée bien que plusieurs travaux expérimentaux indépendants permettent de supposer qu'une partie des effecteurs fongiques les possédant sont bien internalisés dans les cellules végétales (Rafiqi *et al.*, 2010). La visualisation de protéines fongiques à l'extérieur des cellules du champignon a ainsi permis de créer deux grandes catégories d'effecteurs, (i) les effecteurs extracellulaires co-localisants dans le xylème ou dans le compartiment apoplasmique de la plante hôte et, (ii) les effecteurs cytoplasmiques visibles à l'intérieur de la cellule hôte (Salcedo *et al.*, 2017) et co-localisants directement dans certains organites de la plante (de Torres Zabala *et al.*, 2015). C'est le cas par exemple des effecteurs CTP1, CTP2 et CTP3 du champignon *Melampsora larici-populina* qui s'accumulent au niveau des chloroplastes et des mitochondries du tabac afin de contrôler la circulation protéique dans les cellules végétales (Petre *et al.*, 2016a) ou encore de l'effecteur Mlp124478 chez le même agent pathogène qui s'accumule dans les noyaux d'*Arabidopsis thaliana* et du tabac afin de bloquer les réponses immunitaires de la plante (Ahmed *et al.*, 2018).

Ainsi, dans le cadre d'une interaction plante-pathogène, les effecteurs jouent un rôle clé dans le succès de l'infection en étant impliquée dans la manipulation de la structure et des fonctions physiologiques de la cellule hôte, et plus particulièrement de ses mécanismes de défense (Kamoun, 2006). En effet, si on analyse l'importante diversité des mécanismes de défense décrite chez les plantes, on peut trouver des exemples de manipulation parasitaire permettant de tous les contourner.

b) Adaptation passe-muraille

La première défense des plantes correspond à la paroi pectocellulosique qui, outre son rôle dans le maintien de la forme de la cellule, représente également une barrière physique protectrice très efficace contre de nombreux agents pathogènes (Hematy *et al.*, 2009). Lorsqu'un champignon rencontre un hôte potentiel, la première étape de l'infection consiste généralement à passer cette muraille dans laquelle est enfermée la cellule hôte. Pour réaliser cela, les champignons phytopathogènes ont développé un arsenal très diversifié d'effecteurs généralement résumé sous le terme générique de Glycoside hydrolases ou glycosidases (Glass *et al.*, 2013). Les Glycoside hydrolases correspondent à des familles enzymatiques très conservées chez les différents genres fongiques soulignant ainsi leur importance pour les champignons. L'analyse des génomes de 131 espèces fongiques a permis l'identification de 453 CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) réparties en 44 familles enzymatiques différentes qui vont permettre de dégrader de manière efficace la paroi végétale (Murphy *et al.*, 2011).

c) Inhibition de la perception de l'agent pathogène

On peut considérer que la réponse immunitaire des plantes débute réellement par la perception de l'agent pathogène. Les cellules végétales possèdent des systèmes de perception sensibles permettant la reconnaissance de molécules associées à un danger tel que la libération de débris pariétaux appelés DAMPs (danger-associated molecular patterns) lorsque le champignon parvient à passer cette première ligne de défense (Nühse, 2012). La perception du danger peut également se faire via la détection de molécules caractéristiques des agents pathogènes appelées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) qui sont définis comme étant des composants conservés au cours de l'évolution dans des classes entières d'agents

pathogènes, car essentiels pour leur survie (Chisholm *et al.*, 2006 ; Nürnberger and Lipka, 2005 ; Thomma *et al.*, 2011). Dans la littérature de nombreux PAMPs associés aux champignons phytopathogènes ont déjà pu être identifiés, tels que la chitine (Kaku *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2013 ; Miya *et al.*, 2007 ; Shimizu *et al.*, 2010) ou l'ergostérol (Granado *et al.*, 1995). Un moyen efficace, élaboré par les champignons pour contrer ces mécanismes de perception, consiste en différentes stratégies de camouflage basées sur l'utilisation d'effecteurs extracellulaires permettant de perturber la détection de l'agent pathogène par la cellule végétale (Rovenich *et al.*, 2014 ; Sanchez-Vallet *et al.*, 2015). Parmi ces effecteurs extracellulaires, on retrouve des protéines possédant un domaine LysM, connu pour être impliqué dans la liaison à la chitine. Ce mécanisme a été découvert lors de l'étude de la protéine AVR4 de *Cladosporium fulvum* dont l'interaction avec les polymères de chitine permet, non seulement de protéger la paroi fongique contre les chitinases de la tomate, mais également de diminuer la formation de PAMPs suite à la dégradation de la chitine (van den Burg *et al.*, 2006 ; van Esse *et al.*, 2007). D'autres effecteurs de type LysM tels que Ecp6 de *C. fulvum* (de Jonge *et al.*, 2010), Slp1 de *Magnaporthe oryzae* (Mentlak *et al.*, 2012) ou encore RsLysM de *Rhizoctonia solani* (Dörfors *et al.*, 2019) ont par la suite été décrits comme intervenant, non pas dans la protection de la paroi, mais dans le camouflage des débris issus de la dégradation de la paroi fongique. D'autres composants pariétaux tels que le glucane peuvent aussi être la cible des effecteurs fongiques de façon, là encore, à perturber la détection de l'agent pathogène. C'est le cas par exemple de l'effecteur FGB1 (Fungal Glucan-Binding 1) identifié dans de l'interaction entre *Piriformospora indica* avec l'orge ou *A. thaliana* (Wawra *et al.*, 2016).

d) Piratage des réseaux de transduction des signaux de danger

Lorsque l'agent pathogène ne parvient pas à masquer sa présence, la perception des PAMPs et DAMPs se fait par l'intermédiaire de récepteurs PRR (Pattern-Recognition-Receptors) localisés au niveau de la membrane cellulaire (Zipfel, 2014). Les récepteurs de type PRR sont classés en deux groupes distincts, les Receptor-Like Proteins (RLPs) et les Receptor-Like Kinases (RLKs) (Boutrot and Zipfel, 2017 ; Couto and Zipfel, 2016). Les domaines extracellulaires des récepteurs PRR peuvent présenter des motifs caractérisés par des répétitions de leucine (LRR), des motifs LysM, des motifs

de type lectine ou des domaines de type facteur de croissance épidermique (EGF) (Saijo *et al.*, 2018) qui déterminent en grande partie la nature des ligands reconnus et induisent la transduction d'un signal de danger suite à la détection d'un PAMP spécifique (Nicaise *et al.*, 2009). À titre d'exemple, OsCEBiP est le premier récepteur capable de reconnaître spécifiquement les composés oligosaccharidiques de la chitine identifié chez les plantes (Kaku *et al.*, 2006). Il s'agit d'un RLP avec un domaine extracellulaire contenant deux motifs LysM à l'extrémité N-terminale (Kaku *et al.*, 2006 ; Kouzai *et al.*, 2014). Chez le blé, le récepteur RLK STB6, récemment caractérisé, est impliqué dans une relation de type gène-à-gène avec le gène d'avrirulence AvrSTB6 de *Zymoseptoria tritici* (Saintenac *et al.*, 2018 ; Zhong *et al.*, 2017). Les récepteurs PRR de la plante peuvent ainsi induire la transduction du signal issu de la perception de l'agent pathogène via un réseau biochimique complexe et permettre la mise en place d'une réponse immunitaire basale, que les agents pathogènes peuvent court-circuiter via leurs effecteurs. Irieda *et al.* (2009) ont ainsi montré que l'effecteur NIS1, présent chez différents agents pathogènes tels que *Magnaporthe oryzae* ou *Colletotrichum tofieldiae*, ciblait de manière spécifique les RLK BAK1 et BIK1 en inhibant leurs activités kinase et par extension, la réponse immunitaire médiée par ces RLK (Irieda *et al.*, 2019).

e) Contrôle des mécanismes moléculaires et physiologiques induits par la détection du pathogène

Très rapidement après la reconnaissance par les récepteurs PRR de PAMPs ou DAMPs, la cellule végétale va subir une profonde modification de sa physiologie via l'induction d'un burst oxydatif et la modification des flux d'ions de la cellule (Chinchilla and Boller, 2011). Le burst oxydatif correspond à la production massive de molécules toxiques appelées ROS (Reactive Oxygen Species) (Baker and Orlandi, 1995 ; Bolwell *et al.*, 2002). À cela, les agents pathogènes se sont adaptés en développant des effecteurs cytoplasmiques ciblant les systèmes de production de ces ROS, tel que Pep1 chez *Ustilago maydis* qui interagit de manière directe avec la peroxydase POX12 permettant le contrôle du burst oxydatif (Hemetsberger *et al.*, 2012). Le second mécanisme majeur induit par la détection des PAMPs correspond à la modification des flux d'ions comme le calcium, le potassium, le chlore ou encore l'hydron (Clough *et al.*, 2000 ; Lecourieux *et al.*, 2002, 2006 ; Zimmermann *et al.*, 1999). Ces changements incluent un afflux accru de Ca^{2+} dans la cellule et un

efflux de K^+ et d'anions nitrates entraînant une dépolarisation de la membrane plasmique initiatrice de l'activation de diverses voies de signalisation associées aux réponses immunitaires (Shen *et al.*, 2017). La sortie des ions K^+ a pour conséquence immédiate l'alcalinisation de l'apoplasme, le rendant plus inhospitalier pour l'agent pathogène (Kudla *et al.*, 2010). Le même mécanisme d'alcalinisation de l'apoplasme a été observé chez certains agents phytopathogènes suggérant que ces derniers aient pu s'adapter à cette contrainte biochimique (Masachis *et al.*, 2016). Au cours de l'infection de l'hôte, *Fusarium oxysporum* provoque une augmentation du pH extracellulaire, ce qui conduit à la phosphorylation de la kinase fongique Fmk1 impliquée dans la croissance des hyphes invasifs du champignon (Di Pietro *et al.*, 2001 ; Masachis *et al.*, 2016). Ce décalage de pH extracellulaire effectué via un effecteur peptidique présentant une homologie avec les facteurs alcalinisants rapides des plantes (RALF ; rapid alkalization factor) (Murphy and De Smet, 2014) semble être un mécanisme de manipulation parasitaire très conservé chez les pathogènes fongiques (Masachis *et al.*, 2016 ; Thynne *et al.*, 2017).

f) Détournement des voies de signalisation hormonales

Peu de temps après la perception de l'agent pathogène, une reprogrammation complète de la transcription des gènes impliqués dans la signalisation hormonale a lieu (Di *et al.*, 2016). Parmi la grande diversité de phytohormones, les principales hormones végétales qui régulent les réactions de défense sont l'acide salicylique, l'éthylène et l'acide jasmonique (Tsuda *et al.*, 2009). De manière générale, l'acide salicylique joue un rôle clé dans la défense contre les agents pathogènes biotrophes tandis que l'éthylène et l'acide jasmonique s'avèrent plus efficaces contre les agents pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005). Cette spécificité des différentes hormones pourrait s'expliquer par l'antagonisme observé entre les voies de production de l'acide salicylique et celles de l'acide jasmonique / éthylène (Spoel and Dong, 2008 ; van der Does *et al.*, 2013). D'autres hormones telles que les auxines, l'acide abscissique, les cytokinines, les brassinostéroïdes ou les acides gibbérelliques ont également été rapportées pour être impliquées dans l'immunité des plantes via des actions synergiques ou antagonistes (Mauch-Mani and Mauch, 2005). Il a par exemple été montré que l'acide salicylique permet l'inhibition de la germination des spores et de la croissance des colonies de

Fusarium graminearum et de *Harpophora maydis* (Degani *et al.*, 2015 ; Qi *et al.*, 2012) et réduit également considérablement la croissance des hyphes d'*Aspergillus flavus* (Panahirad *et al.*, 2014). En réponse, de nombreux champignons phytopathogènes ont élaboré des stratégies ciblant les voies de biosynthèse et d'accumulation des phytohormones telles que *Ustilago maydis* qui produit une chorismate mutase appelée Cmu1 dont la fonction est de convertir le chorismate, précurseur de l'acide salicylique, en préphénate afin d'inhiber la production de l'hormone (Djamei *et al.*, 2011). Une autre stratégie utilisée par *U. maydis* consiste à dégrader directement l'acide salicylique par l'intermédiaire d'une salicylate hydrolase, l'effecteur Shy1 (Rabe *et al.*, 2013). D'autres agents pathogènes manipulent la plante en tirant profit de l'antagonisme des voies de synthèse des différentes hormones. Lors de l'interaction entre *Botrytis cinerea* et la tomate, le champignon produit lui-même de l'éthylène afin d'inhiber la production d'acide salicylique par la plante (Cristescu *et al.*, 2002). Enfin, il a été démontré que certaines espèces fongiques symbiotiques produisaient des cytokinines afin d'améliorer la photosynthèse des cellules végétales (Drüge and Schonbeck, 1993 ; Wullschleger and Reid, 1990). Un phénomène similaire pourrait exister chez certains champignons pathogènes. En effet, il a été montré qu'une souche de *Magnaporthe oryzae* déficiente dans la production de cytokinines présentait une virulence très réduite et une carence en éléments nutritifs (Chanclud *et al.*, 2016). Les voies de synthèse hormonales semblent donc être une cible importante lors de la manipulation parasitaire puisqu'elles permettent de contrôler non seulement l'immunité de l'hôte, mais également l'allocation des ressources nutritives pour le champignon.

g) Synthèse des protéines PR et adaptation des agents pathogènes fongiques

Les mécanismes de défense des plantes se caractérisent également par la synthèse de composés antimicrobiens destinés à limiter ou stopper le développement de l'agent pathogène *in planta* (Kim *et al.*, 2005), via l'épaississement de la paroi cellulaire de la plante par incrustation de callose, de lignine, de composés phénoliques ou encore de glycoprotéines structurales (Benhamou and Rey, 2012 ; Dangl and Jones, 2001 ; Jones and Dangl, 2006). Le renforcement pariétal se traduit généralement par la formation de nouvelles barrières appelées papilles qui contribuent à retarder la progression du pathogène dans les tissus de la plante ainsi qu'à diminuer la diffusion des enzymes de

dégradation des parois et des toxines du champignon (Benhamou and Rey, 2012). En outre, les mécanismes décrits précédemment (*i.e.* burst oxydatif, modification des flux d'ions, production des ROS, des phytohormones, transduction de signaux induits par les récepteurs PRR) vont permettre l'activation de gènes de défense codant pour des « Pathogenesis-Related Proteins » (PR protéines) définies comme étant des protéines synthétisées par la plante uniquement dans certaines situations de stress telles que l'attaque d'un agent pathogène (van Loon *et al.*, 2006). Les protéines PR ont été identifiées pour la première fois après analyse de plants de tabac infectés par le virus de la mosaïque du tabac (van Loon and Van Kammen, 1970). Un total de 17 familles de PR protéines sont aujourd'hui décrites, comprenant entre autres les β -1,3-glucanases, les chitinases, les protéines analogues à la thaumatine, les peroxydases, les défensines, les thionines et les oxalate oxydases (Jain and Khurana, 2018). Parmi les différentes familles PR identifiées, une des plus étudiées est la famille PR-1. Les protéines appartenant à cette famille sont décrites comme ayant une forte activité antifongique conférée par leur capacité à se lier et séquestrer les ergostérols de la membrane fongique des champignons permettant ainsi l'inhibition de la croissance du pathogène (Gamir *et al.*, 2017). Les PR protéines sont également directement associées au développement de deux mécanismes de défense particuliers, (i) la réponse hypersensible (HR) et, (ii) la résistance systémique acquise (SAR) (Jain and Khurana, 2018). La HR est une réponse immunitaire provoquant la mort cellulaire programmée dans la zone entourant le site d'infection. L'apoptose induite, rapide et localisée, se montre particulièrement efficace contre les pathogènes biotrophes en limitant l'accès aux ressources nutritionnelles nécessaires au développement du pathogène (Andersen *et al.*, 2018 ; Greenberg and Yao, 2004). Elle induit également l'activation de voies de signalisation et de défense cellulaires adaptées au niveau de la zone infectée puis dans la plante entière (Chetouhi *et al.*, 2015 ; de Wit *et al.*, 2009 ; van der Meer-Janssen *et al.*, 2010) via la mise en place de la SAR (Khodai-kalaki *et al.*, 2015 ; Thomma *et al.*, 2011). La SAR est décrite comme étant un processus permettant la mise en place d'une réponse plus efficace face à une nouvelle agression basée sur l'activation des mécanismes de défense de manière préventive (Heath, 2000). Ainsi, les PR protéines permettent à la plante de se défendre contre les pathogènes, sauf quand ces derniers parviennent à développer des mécanismes

permettant d'en limiter l'efficacité. Les champignons peuvent réduire directement l'activité enzymatique des PR en les dégradant par le biais d'effecteurs apoplasmiques de type protéase (Muszewska *et al.*, 2017). L'analyse de génomes fongiques a permis l'identification de protéases sécrétées dont le profil d'expression soutient un rôle d'effecteur promouvant la colonisation et la croissance de l'agent pathogène (Goodwin *et al.*, 2011 ; Guyon *et al.*, 2014 ; O'Connell *et al.*, 2012). *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersicum* sécrète une sérine protéase Sep1 et une métalloprotéase Mep1, qui agissent de manière synergique pour cliver les chitinases hôtes, empêchant ainsi leur activité de dégradation des parois des cellules fongiques (Jashni *et al.*, 2015). La même observation a pu être faite sur différents pathosystèmes suggérant, selon les auteurs, que la dégradation de PR protéines végétales par des protéases fongiques pourrait représenter un mécanisme général de pathogénicité utilisé par divers champignons pour favoriser le développement de la maladie (Naumann and Price, 2012 ; Soanes *et al.*, 2007). D'autres adaptations permettant de cibler spécifiquement les PR ont récemment été démontrées lors de l'interaction de *P. nodorum* avec le blé (Breen *et al.*, 2016). Dans leur étude, Breen *et al.* (2016) ont montré que le champignon *P. nodorum* utilise l'effecteur (SnTox3) afin de cibler différentes protéines appartenant à la famille PR-1 sans pour autant que l'activité protéase de l'effecteur soit établie.

II – Concepts de sensibilité et résistance chez les plantes

La résistance peut être définie comme étant un « état » permettant soit de prévenir l'infection, soit d'en limiter l'étendue de façon à réduire au maximum les dommages occasionnés par l'agent pathogène (Stenberg and Muola, 2017). Cet « état » peut être considéré comme la résultante des processus de défense génériques précédemment cités et de processus moléculaires plus spécifiques permettant la reconnaissance directe des effecteurs fongiques comme du « non-soi ». Cette reconnaissance se fait grâce à des protéines de résistance dite spécifique codées par les gènes de résistance (R). Généralement dominants, les gènes R offrent soit une résistance totale (résistance qualitative) soit partielle (quantitative) à un ou plusieurs agents pathogènes (Kourelis and van der Hoorn, 2018). Historiquement, le premier gène de résistance cloné est Hm1 chez le maïs, dont la fonction est de détoxifier la toxine HC produite par *Cochliobolus carbonum* (Johal and Briggs, 1992). Par la suite, des dizaines d'autres gènes de résistance ont été identifiés et clonés. Une récente méta-analyse de 314 gènes de résistance clonés a montré que la grande majorité d'entre eux codent pour des récepteurs membranaires de surface ou intracellulaires, impliqués dans le déclenchement de neuf mécanismes moléculaires différents (Kourelis and van der Hoorn, 2018). Or, comme pour tous les mécanismes de défense basaux décrits précédemment, les résistances spécifiques induites par les gènes R sont elles aussi condamnées à être contournées.

a) Les limites des gènes de résistance

Le succès du développement d'une maladie passe systématiquement par un processus de manipulation complexe de l'agent pathogène, élaboré *via* un véritable arsenal d'effecteurs. Cette manipulation parasitaire va ainsi permettre à l'agent infectieux de créer un environnement favorable à son développement via le contournement à plus ou moins long terme des gènes de résistances de la plante. Dans le cas d'une plante d'intérêt agronomique, la durabilité d'une résistance revêt une importance primordiale. Elle est définie comme le temps durant lequel une résistance reste efficace alors que le cultivar la possédant est massivement cultivé dans un environnement favorisant la maladie (Johnson, 1983). Outre l'identification de nouvelles sources de résistance, les recherches actuelles ont ainsi pour objectif d'améliorer leur durabilité. Les études portant sur l'identification

moléculaire des résistances ont montré que les résistances polygéniques étaient plus difficiles à contourner que les résistances monogéniques (Lindhout, 2002). La faible durabilité des résistances monogéniques peut être illustrée par un grand nombre d'exemples issus de la littérature tels que le gène Run1 chez *Vitis rotundifolia* qui conférait une résistance totale à l'oïdium (Feechan *et al.*, 2015 ; Pauquet *et al.*, 2001). Dans ce cas, un isolat naturel d'oïdium, Musc4, recueilli dans la région sud-est de l'Amérique du Nord dont *V. rotundifolia* est originaire, s'est révélé capable de briser la résistance conférée par RUN1, indiquant que l'effecteur reconnu par la protéine RUN1 avait été muté ou avait été complètement perdu par l'isolat Musc4 (Feechan *et al.*, 2013). Concernant les résistances polygéniques telles que l'assemblage de plusieurs gènes majeurs de résistance ou les QTL de résistance (Quantitative Trait Loci) (Corwin and Kliebenstein, 2017 ; Wu *et al.*, 2015), leur plus grande durabilité pourrait provenir du fait qu'elle repose sur plusieurs facteurs de résistance ciblant différents mécanismes de l'agent pathogène (*i.e.* pyramidage). On peut supposer que lorsque l'agent pathogène est confronté à une résistance polygénique, ce dernier devra acquérir et fixer un nombre de mutations plus important afin de la contourner. Des études réalisées sur la tavelure du pommier ont ainsi montré que l'utilisation de cultivars portant un seul QTL de résistance avait, au cours du temps (*i.e.* 8 ans), induit la sélection de souches de *Venturia inaequalis* plus agressives, conduisant *in fine* au contournement de la résistance (Caffier *et al.*, 2016). Le pyramidage de 3 QTL a permis de relancer la résistance notamment parce que ces trois QTL n'agissaient pas au même stade du cycle infectieux du champignon (Laloi *et al.*, 2017). Ainsi, si les QTL restent de bons candidats pour l'amélioration de la résistance des plantes, leur identification reste longue et coûteuse par rapport à la sélection de gènes de résistance monogénique et l'introgession de QTL de résistance reste toujours insuffisante pour transformer un cultivar sensible en cultivar résistant. Elle peut même, dans certains cas, conduire à l'apparition d'effets pléiotropiques indésirables (Steiner *et al.*, 2017), comme démontré dans le pathosystème *Solanum habrochaites* – *Phytophthora infestans* (Haggard *et al.*, 2013). De plus, les QTL de résistance n'empêchent pas totalement l'agent pathogène de se développer. Le contournement des résistances de la plante, qu'elles soient qualitatives ou quantitatives, est dû principalement aux phénomènes de sélection de l'agent pathogène par le biais de

multiples mutations indépendantes (Mundt, 1990), par recombinaisons (Chen *et al.*, 2017), par la perte de gènes d'avirulence reconnus par les gènes R (Petit-Houdenot and Fudal, 2017) ou par dérive génétique au niveau de la population de l'agent pathogène (Burdon *et al.*, 2016). Déjà en 1958, Flor avait découvert chez *Melampsora lini* qu'environ trois spores sur deux millions devenaient virulentes uniquement par mutation naturelle (Flor, 1958). En se basant sur les calculs de Drake et collaborateurs (1998), Stam et McDonald ont calculé qu'environ 10^7 spores mutantes capables de vaincre un gène R seraient produites par hectare au cours d'une journée en conditions optimales pour un organisme tel que l'oïdium (Drake *et al.*, 1998 ; Stam and McDonald, 2018). Tous ces événements génétiques, rendus possible par le fait que la plupart des QTL et gènes de résistance permet au moins un faible niveau de reproduction de l'agent pathogène, conduit à un contournement plus ou moins rapide, mais inévitable, de la plupart des résistances connues jusqu'à présent (Brown, 2015 ; Fabre *et al.*, 2015).

b) Le concept de sensibilité

L'étude des interactions hôtes – pathogènes conduit généralement à penser que les mécanismes moléculaires imputables aux deux protagonistes sont bénéfiques à celui qui les met en place. Or, si le contournement des résistances de la plante associé à leur durabilité réduite semble suggérer une bonne adaptation des agents pathogènes face à leur hôte, on peut tout de même se questionner sur l'implication de la plante elle-même dans le succès de l'infection. En effet, l'observation selon laquelle la résistance aux maladies peut également être héritée de manière récessive indique que les agents pathogènes peuvent directement tirer profit des fonctions de l'hôte (Huckelhoven, 2005). Les fonctions ainsi détournées sont appelées facteurs de sensibilité (S). La première mention du terme «Facteur de Sensibilité » remonte à 1990 (Fraser, 1990). Fraser, travaillant alors sur la génétique de la résistance des plantes contre les virus, a émis l'hypothèse que la plante pouvait avoir un rôle direct dans le succès de la maladie, puisque les fonctions cellulaires et le métabolisme primaire de la cellule végétale fournissent les éléments de base à la multiplication du virus (Heinlein, 2015). Par exemple, différentes composantes de l'appareil de traduction des cellules végétales comme les hélicases de type eIF4A, eIF3, eEF1A et eEF1B contribuent à la réplication du virus (Sanfacon, 2015). Plus récemment, le terme de « Gène de sensibilité ou Gène S » a été proposé pour la première fois en

dehors d'un système plante – virus par Eckardt en 2002 après la découverte d'une nouvelle forme de résistance contre le mildiou résultant de la perte de la fonction du gène PMR6 chez *A. thaliana* (Eckardt, 2002 ; Vogel *et al.*, 2002). Ce n'est qu'en 2014 que van Schie et Takken ont véritablement posé les bases de la notion de sensibilité des plantes en lui apportant une définition claire. La sensibilité correspond à l'ensemble des mécanismes par lesquels les gènes de la plante contribuent à la réussite de l'infection (van Schie and Takken, 2014). Elle peut être ainsi vue comme une résultante du processus de manipulation parasitaire qui va permettre à l'agent infectieux de créer un environnement favorable à son développement via son arsenal d'effecteurs. Dans leur revue, les auteurs proposent trois catégories de gènes de sensibilité : (i) les gènes permettant une compatibilité de base facilitant la reconnaissance et la pénétration de l'hôte, (ii) les gènes codant pour des régulateurs négatifs des défenses de la plante et, (iii) les gènes permettant à l'agent pathogène de satisfaire ses besoins métaboliques et sa prolifération (van Schie and Takken, 2014).

Gènes S impliqués dans la reconnaissance de l'hôte

L'interaction entre une plante et un agent pathogène débute lors de la rencontre des deux membres du pathosystème à condition que le pathogène puisse reconnaître son hôte. Plusieurs gènes S végétaux impliqués dans la reconnaissance de l'hôte par le pathogène ont déjà pu être identifiés. C'est le cas du gène IRG1 (rust germ tube differentiation1) connu comme étant impliqué dans la compatibilité de l'interaction entre *Medicago truncatula* et les champignons phytopathogènes *Phakopsora pachyrhizi*, *Puccinia emaculata* et *Colletotrichum trifolii*. La mutation de ce gène, qui code pour le facteur de transcription à doigts de zinc Cys(2)His(2) PALM1, entraîne une réduction à la surface des feuilles de plus de 90 % des alcools primaires en C30 et une augmentation des alcanes en C29 et C31 par rapport au type sauvage (Uppalapati *et al.*, 2012). La perte des cristaux de cire épicuticulaire en C30, nécessaires aux champignons pour reconnaître leur hôte, est à l'origine du passage de la plante au statut de non-hôte (Uppalapati *et al.*, 2012). De la même manière, la perte de fonction du gène CYP83A1 codant pour le cytochrome P450 83A1 monooxygénase chez *Arabidopsis thaliana* implique une diminution drastique de la germination et de la formation d'appressorium /

conidiophores par *Erysiphe cruciferarum* à la surface des feuilles (Weis *et al.*, 2014). La perte de sensibilité causée par la mutation *cyp83a1* s'explique par une perte des signaux inductifs de l'hôte et par une accumulation de métabolites probablement fongitoxiques (Weis *et al.*, 2014). D'autres exemples tels que les gènes *KCS1* et *KCS6* de l'orge codant pour des protéines impliquées dans l'élongation des acides gras à la base des cires épicuticulaires des feuilles, se sont révélés nécessaires à la reconnaissance de l'hôte par différentes espèces d'oïdiums (Li *et al.*, 2018 ; Weidenbach *et al.*, 2014).

Gènes S impliqués dans la régulation des défenses de la plante

Il est reconnu qu'en l'absence d'attaque par un agent pathogène, l'expression de la résistance a un coût pour la plante (impact sur la fitness) ce qui impose une régulation fine des mécanismes sous-jacents. De nombreux régulateurs positifs et négatifs ont été identifiés, certains étant clairement ciblés par les agents infectieux et pouvant, *de facto*, être considérés comme des facteurs de sensibilité (Abou-Attia *et al.*, 2016 ; Copeland *et al.*, 2016 ; Fernandes *et al.*, 2017 ; Yu *et al.*, 2017). Des mutants homozygotes impliquant une perte de fonction de certains de ces gènes présentent des réponses immunitaires plus fortes lors de l'infection comme par exemple le gène *EDR1* dont la mutation confère une résistance à l'infection du champignon *Erysiphe cichoracearum* chez *A. thaliana* (Frye *et al.*, 2001). Ce gène code pour une MAP3K impliquée dans la régulation négative des voies de production de l'éthylène (Frye *et al.*, 2001). Chez le riz, le gène *ERF 922* a été décrit comme un facteur de sensibilité pouvant être utilisé par le champignon *Magnaporthe grisea* (Koga *et al.*, 2004). En présence du pathogène, la plante surexprime le gène *ERF 922* ce qui conduit à une augmentation de la production d'acide abscissique avec pour conséquence un meilleur développement du champignon (Koga *et al.*, 2004). Les auteurs de l'étude proposent que le champignon lui-même pourrait être responsable de l'activation de ce gène via l'utilisation d'un effecteur non identifié, puisqu'un mécanisme de manipulation parasitaire similaire effectué par l'intermédiaire de l'effecteur cytoplasmique *AvrPtoB*, a déjà été décrit lors de l'interaction de la bactérie *Pseudomonas syringae* et *Arabidopsis thaliana* (de Torres-Zabala *et al.*, 2007).

Gènes S impliqués dans la gestion des besoins métaboliques de l'agent pathogène

Ces gènes de sensibilité sont impliqués dans le détournement de certains processus cellulaires de l'hôte au profit de la nutrition de l'agent pathogène (van Schie and Takken, 2014). C'est le cas du gène RACB de l'orge qui code pour une protéine dont l'interaction avec la protéine végétale RIPb permet l'hébergement et la croissance de l'haustorium de *Blumeria graminis* dans les cellules épidermiques des feuilles, ce qui contribue à assurer les besoins métaboliques du champignon (McCollum *et al.*, 2019 ; Scheler *et al.*, 2016). D'autres exemples de manipulation parasitaire ciblant les gènes SWEET, qui codent pour des transporteurs de sucres, ont également été décrits (Chong *et al.*, 2014). Chong et collaborateurs ont rapporté que l'infection par le champignon *Botrytis cinerea* déclenchait chez la vigne une forte activation de l'expression du gène SWEET4, un transporteur de glucose situé au niveau de la membrane de la cellule végétale, facilitant l'acquisition de sucres par l'agent pathogène (Chong *et al.*, 2014). Le ou les effecteurs responsables de cette manipulation parasitaire n'ont toutefois pas pu être identifiés contrairement au pathosystème *Oryza sativa* – *Xanthomonas oryzae* pour lequel l'effecteur bactérien TAL (Transcription activator-like) PthXo1 impliqué dans l'activation de gènes SWEET, a pu être identifié (Chu *et al.*, 2006).

c) Les gènes de sensibilité comme une alternative pour améliorer la résistance des plantes ?

Si la résistance et la sensibilité correspondent à deux concepts bien distincts en termes de processus moléculaires et physiologiques, leur résultante sur la fitness de la plante et sur la réussite de l'infection par l'agent pathogène semble totalement opposée. Ainsi, l'identification de résistances monogéniques récessives, c'est-à-dire de gènes impliqués dans l'établissement d'un état de sensibilité de la plante hôte pourrait être une alternative complémentaire à l'utilisation des gènes de résistance. En effet, l'utilisation de ces derniers apparaît comme clairement limitée en termes de durabilité, à l'image du gène majeur de résistance STB6 du blé qui a été contourné en moins de trois ans par *Zymoseptoria tritici* (Chartrain *et al.*, 2005 ; Cowger *et al.*, 2000) via une série de mutations non synonymes au niveau des trois CDS du gène codant pour l'effecteur AvrSTB6 (Zhong *et al.*, 2017). Dans le même pathosystème, les QTL de résistance ne résistent pas non plus très longtemps, comme

le montre l'érosion de la résistance quantitative du cultivar Madsen, efficace de 1990 à 1995 avant de s'effondrer à partir de 1996 (McDonald and Mundt, 2016 ; Mundt *et al.*, 2002).

De par la nature des mécanismes impliqués dans la sensibilité des plantes, il a été postulé que les résistances résultant de l'utilisation de variants alléliques de certains des gènes S, pouvaient être plus difficiles à contourner par les agents pathogènes et donc avoir une plus grande durabilité. De ce fait, l'utilisation de ce type de résistance, qui résulte d'une diminution de la sensibilité, pourrait s'avérer être une alternative complémentaire à l'utilisation de gènes de résistance classiques. Si l'on considère un gène de sensibilité impliqué dans la régulation négative des défenses de la plante, il est raisonnable de postuler qu'une inactivation de ce gène va induire une activation constitutive des mécanismes de défense chez la plante hôte qui pourrait limiter significativement, voire bloquer, le développement des agents pathogènes lors premiers stades de l'infection (Vogel and Somerville, 2000). De plus, il a été montré que certains gènes de sensibilité pouvaient participer au contrôle de plusieurs processus physiologiques de la plante (Weßling *et al.*, 2014), suggérant que l'utilisation de lignées portant des mutations affectant la fonction de ce type de gène aurait un impact très fort sur le développement *in planta* de l'agent pathogène, en le privant de plusieurs fonctions essentielles et en limitant fortement sa capacité à trouver des solutions alternatives pour poursuivre son développement (van Schie and Takken, 2014). Dans leur revue, van Schie et Takken (2014) utilisent l'exemple des agents pathogènes biotrophes obligatoires qui ne peuvent produire eux-mêmes certains métabolites essentiels à leur survie. Une résistance de la plante induite par la perte du gène de sensibilité dont la fonction est d'assurer la production de ces métabolites, obligerait l'agent pathogène à acquérir tous les processus métaboliques permettant de les synthétiser à la place de l'hôte (van Schie and Takken, 2014). Or acquérir de nouvelles fonctions est beaucoup plus long d'un point de vue évolutif que la simple perte / modification de gène(s) Avr (van Schie and Takken, 2014), voire probablement impossible selon la loi de Dollo (Dollo, 1893 ; Gould, 1970). Ceci montre qu'il est plus simple pour un agent pathogène de perdre ou de modifier un/plusieurs effecteur(s) reconnu(s) par la/les protéine(s) R de la plante, que de surmonter la perte du gène de sensibilité de l'hôte. L'exemple le plus parlant est très certainement celui du gène MLO dont il a été montré, il y a près de quatre-vingts ans, qu'un

mutant récessif conférait une résistance totale à l'oïdium chez l'orge (Freisleben and Lein, 1942). Les cultivars *mlo*, toujours cultivés aujourd'hui, continuent de conférer une résistance à toutes les souches d'oïdium (Büschges *et al.*, 1997 ; Jørgensen, 1992 ; van Schie and Takken, 2014).

d) L'exploitation de la sensibilité pour améliorer la résistance n'est pas sans contreparties pour la plante

Les gènes de sensibilité, en dépit de leur action positive sur le développement des agents pathogènes, n'ont pas été éliminés par l'évolution. Cela suggère que ces gènes ont des fonctions essentielles au fonctionnement de la cellule végétale. La perte de fonction de gènes impliqués dans la régulation négative des défenses de la plante s'accompagne parfois d'effets pléiotropiques trop importants pour avoir un intérêt agronomique (Engelhardt *et al.*, 2018). Il a par exemple été montré que la perte de sensibilité du riz envers *Xanthomonas oryzae*, résultant de l'utilisation d'allèles récessifs du gène Os8N3, s'accompagnait d'une diminution de la production de pollen (Chu *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2006). Parmi les 182 exemples de mutants affectés dans des gènes de sensibilité compilés par van Schie and Takken (2014), 57 % présentent des effets pléiotropiques connus plus ou moins graves pour la plante, incluant nanisme, dimorphisme des organes, augmentation de la sensibilité à un autre pathogène ou tolérance réduite envers certains stress abiotiques. Cependant, on notera tout de même que 43 % de ces mutants ne présentent pas d'autres effets visibles que la diminution de la sensibilité envers l'agent pathogène. De plus, les effets pléiotropiques observés lors de la mutation de certains gènes S semblent être dépendant de l'espèce végétale et de l'environnement. Par exemple, il a été observé une chlorose foliaire de type sénescence chez les mutants *mlo* d'orge dans certaines conditions très spécifiques, alors qu'aucun phénotype pléiotrope évident n'a encore été noté chez les mutants *mlo* de la tomate (Bai *et al.*, 2008) et de la vigne (Pessina *et al.*, 2016). Bien que ces effets pléiotropiques aient parfois été rapportés chez des mutants *mlo* de l'orge (Büschges *et al.*, 1997), cette résistance reste, de loin, la source de résistance au mildiou la plus utilisée chez l'orge de printemps cultivée en Europe (Pavan *et al.*, 2009). L'exploitation des gènes de sensibilité dans l'objectif d'améliorer la résistance des plantes est clairement une stratégie complexe, mais prometteuse. L'identification de « bons » gènes S utilisables pour générer des résistances

durables et utilisables en sélection demande une compréhension détaillée des mécanismes moléculaires sous-jacents. Cette compréhension est essentielle afin de contrôler les effets pléiotropiques pouvant être induits par leur mutation ainsi que pour prédire leur durabilité. Ainsi, l'exploitation de résistances basées sur l'utilisation de gènes de sensibilité, en complément des gènes R majeurs et des QTLs de résistance, représente une stratégie prometteuse pour générer des résistances efficaces et potentiellement durables.

III – Sensibilité et résistance dans le cadre de la fusariose de l'épi

a) La Fusariose de l'épi, une maladie particulière

La fusariose de l'épi ou *Fusarium head blight* (FHB), décrite pour la première fois en Angleterre en 1884 (Smith, 1884), est une maladie affectant la totalité des céréales sur l'ensemble des régions tempérées du globe (Goswami and Kistler, 2004 ; Parry *et al.*, 1995). La première particularité de cette maladie provient de l'importante diversité des agents pathogènes qui en sont responsables. À ce jour, vingt-deux espèces fongiques appartenant aux genres *Fusarium* et *Microdochium* ont été décrites comme agents causaux de la maladie (Arseniuk *et al.*, 1999). Sur un même épi de blé, plusieurs espèces peuvent ainsi cohabiter sous forme de complexe fusarien complexifiant l'équilibre et la dynamique de l'interaction avec la plante (Xu and Nicholson, 2009). Toutefois, en Europe, au Canada et aux États-Unis, l'agent principal de la fusariose de l'épi est *Fusarium graminearum* Schwabe (*Hypocreales: Nectriaceae*) (téléomorphe: *Gibberella zeae*) (Brennan *et al.*, 2003). Lors de conditions climatiques favorables, ce champignon peut attaquer toutes les parties de la plante depuis les racines jusqu'aux épis et ce, à tous les stades ontogéniques de l'hôte (Parry *et al.*, 1995). Cette faculté de *F. graminearum* à pouvoir infecter des tissus ou organes aussi différents (*i.e.* racines, feuilles ou épi) à différents stades ontogéniques de la plante rend l'interaction entre ce champignon et son hôte très atypique. Outre les différences de transcriptomes fongiques observées lors de l'interaction de *F. graminearum* avec différentes espèces de céréales (Harris *et al.*, 2016), de précédentes études ont également montré que le transcriptome de *F. graminearum* présentait des spécificités notables lors de l'infection de différents organes ou tissus d'une même espèce végétale comme le blé (Lysøe *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012b). La même observation a pu être faite du côté de la plante, où les transcriptomes de six organes différents (glume, lemme, paléa, anthère, ovaire et rachis) se sont révélés très spécifiques lors de la réponse à une infection à *F. graminearum* (Golkari *et al.*, 2007). Ces caractéristiques suggèrent une capacité du champignon à adapter sa stratégie infectieuse en fonction du tissu, de l'organe ou du stage de développement de la plante, associée à une réponse spécifique de la plante hôte (Wang *et al.*, 2017). Cette situation complique considérablement l'étude de cette interaction dans le sens où l'épi est un organe complexe composé

de différents tissus. Une autre particularité de cette maladie découle directement des spécificités moléculaires induites par l'ontogénie de la plante. En effet, contrairement à la plupart des maladies qui impactent généralement un tissu qui a fini son développement, la fusariose de l'épi démarre lors de l'anthèse des épillets, c'est-à-dire avant même que l'embryon n'ait initié son développement et que le grain ne soit formé (Rogers and Quatrano, 1983). Les résultats obtenus dans le cadre de la thèse de C. Chétouhi (Chetouhi *et al.* (2016) suggèrent l'existence d'une phase de latence durant laquelle, après pénétration des tissus végétaux, le champignon attend que la formation du grain débute pour initier son développement *in planta*. Ceci est illustré en particulier par le fait que l'évolution de la biomasse fongique n'est pas linéaire au cours de l'infection du grain, avec une forte multiplication de *F. graminearum* débutant uniquement lors de la phase de remplissage du grain (Chetouhi *et al.*, 2016). Cette hypothèse peut également être appuyée par l'analyse transcriptomique réalisée par Brown et collaborateurs (2017) qui a montré une modification de l'expression des gènes de *F. graminearum* codant pour les effecteurs fongiques au cours d'une cinétique d'infection. Les résultats de leur étude suggèrent ainsi que les effecteurs présentant une forte abondance au cours des premiers stades de l'infection (*i.e.* 200°C jour) favorisaient une infection asymptomatique, alors que les effecteurs fortement exprimés dans les stades plus tardifs (*i.e.* 400°C jour) étaient impliqués dans la dégradation des tissus végétaux (Brown *et al.*, 2017). La même observation a été faite sur les profils d'expression des CAZymes fongiques (Brown *et al.*, 2017). Du côté de la plante, il a été montré que les gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée étaient eux aussi non seulement fortement sous exprimés lors des quatre premiers jours de l'infection (Pan *et al.*, 2018a), mais également lors de stades plus avancés de la maladie (Chetouhi *et al.*, 2016). Ces observations montrent toute la particularité de cette maladie puisqu'elles supposent que *Fusarium graminearum* ne dégrade pas les tissus de la plante tant que cette dernière n'a pas fini de former son grain et que la plante elle-même ne déclenche pas ses mécanismes d'apoptose afin de ne pas tuer sa descendance. Cela sous-entend que des mécanismes régulateurs bloquent le déclenchement de la mort cellulaire de façon à protéger l'embryon, ce qui expliquerait en partie l'absence de résistances efficaces du blé contre cet agent hémibiotrophe.

b) Lutte génétique et résistance du blé à la fusariose de l'épi

Depuis le début des années 90, la fusariose de l'épi est devenue un problème majeur pour les cultures de blé dans le monde en raison de la fréquence des épidémies dans de nombreuses régions productrices de blé, tels les États-Unis, le Canada, l'Europe et la Chine (Zhang *et al.*, 2012a). Aux États-Unis, une estimation récente des pertes de rendement pour le blé s'élevait à 1,176 milliards de dollars en 2015 et 2016 (Wilson *et al.*, 2018). Cette maladie affecte directement la qualité nutritionnelle des grains et provoque de graves problèmes sanitaires tout au long de la chaîne alimentaire via la contamination des grains par des mycotoxines résistantes aux procédés de transformation (Li *et al.*, 2014), entraînant des pertes de qualité et de rendement considérables, incompatibles avec l'augmentation constante des besoins humains en nourriture (AlTaweel *et al.*, 2017). Les espèces de *Fusarium* sont des producteurs de trichotécènes, dont la principale est le deoxynivalenol ou DON. C'est l'une des toxines les plus fréquemment trouvées dans les produits de consommation (Li *et al.*, 2014). Au niveau cellulaire, le DON induit une inhibition de la synthèse des protéines (Kazan *et al.*, 2012 ; Ueno, 1984). Le DON est également connu pour avoir un rôle dans la propagation du champignon au-delà de l'infection initiale (Bai *et al.*, 2001) en facilitant le passage de *F. graminearum* des épillets au rachis de la plante et induirait la transition de la biotrophie à la nécrotrophie de l'agent pathogène (Bönnighausen *et al.*, 2018). Une enquête menée par Rodrigues et Naehrer entre 2009 et 2011 a montré que 79% des échantillons de maïs et 76% des échantillons de blé étaient contaminés par le DON en Amérique du Nord (Rodrigues and Naehrer, 2012).

Les méthodes de lutte les plus efficaces reposent sur l'utilisation combinée de cultivars génétiquement plus tolérants, de pratiques culturales adaptées et de traitements fongicides. Toutefois, l'efficacité de ces méthodes est fortement remise en question par l'occurrence de conditions environnementales favorables à l'agent pathogène et à l'apparition de souches résistantes aux fongicides dans les populations naturelles de *F. graminearum*. Cette situation impose de trouver rapidement des alternatives efficaces et durables. La recherche de nouvelles variétés résistantes est un enjeu majeur de la sélection variétale. À l'heure actuelle, il n'existe aucun cultivar de blé complètement résistant à la fusariose de l'épi, raison pour laquelle le contrôle de la maladie repose

sur l'utilisation de cultivars commerciaux à résistances partielles permettant de limiter les pertes de rendements et l'accumulation des toxines dans la récolte (Mesterházy *et al.*, 2005 ; Tóth *et al.*, 2008). Historiquement, la résistance du blé à la fusariose de l'épi a été catégorisée en cinq grands groupes : (i) la résistance à la pénétration du champignon (Schroeder and Christensen, 1963), (ii) la résistance à la propagation du champignon d'épillets en épillets (Schroeder and Christensen, 1963), (iii) la résistance du grain à l'infection (Mesterházy, 1995), (iv) la tolérance aux trichotécènes fongiques (Mesterházy, 1995) et, (v) la résistance à l'accumulation des trichotécènes (Miller *et al.*, 1985) qui découle soit de la capacité de la plante à modifier chimiquement les mycotoxines pour les rendre moins toxiques, soit d'induire l'inhibition directe de leur synthèse par le champignon (Boutigny *et al.*, 2008). Ces différents types de résistance sont gouvernés par des traits quantitatifs complexes contrôlés par des QTL à effets faibles ou moyens (Steiner *et al.*, 2019). Le premier QTL de résistance à la fusariose de l'épi a été identifié et validé en 1999. Provenant de variétés de blé asiatique, ce QTL est composé de cinq régions génomiques (trois issus du cultivar Sumai et deux du cultivar Stoa) qui sont associées à un accroissement de 15 % de la résistance à la fusariose de l'épi (Bai *et al.*, 1999 ; Waldron *et al.*, 1999). Vingt ans plus tard, les résultats issus de la cartographie de plus de 120 populations ainsi que de plusieurs panels d'associations ont permis d'identifier 556 QTL formant 65 méta-QTL répartis sur l'ensemble des chromosomes du blé tendre (Buerstmayr *et al.*, 2009 ; Jia *et al.*, 2018 ; Liu *et al.*, 2009 ; Steiner *et al.*, 2017 ; Venske *et al.*, 2019). Cependant, seuls quelques-uns de ces QTL ont été validés et uniquement cinq d'entre eux, Fhb1 (Cuthbert *et al.*, 2006), Fhb2 (Cuthbert *et al.*, 2007), Fhb4 (Xue *et al.*, 2010), Fhb5 (Xue *et al.*, 2011), et Qfhs.ndsu-3AS (Zhu *et al.*, 2016), ont été soumis à une cartographie fine afin d'identifier des marqueurs géniques (Steiner *et al.*, 2019) ce qui démontre toute la difficulté d'étude de ce type de résistance et les limites à leur utilisation. En effet, si le pyramidage de plusieurs QTL peut augmenter de 40 à 48% la variance phénotypique associée au trait de résistance (Buerstmayr *et al.*, 2003), l'utilisation de QTL, même seul, peut dans certains cas induire l'apparition d'effets pléiotropiques empêchant leur utilisation en grandes cultures. À titre d'exemple, l'introgression du QTL Sumai-3 5AS dans la variété de blé canadienne a été associée de manière significative à une diminution de la teneur en protéine des

grains, ou celle du QTL 4B FHB qui induit une augmentation de la taille de la plante la rendant très sensible à la verse (McCartney *et al.*, 2007). Le gain de résistance apporté par ces QTL est donc probablement accompagné d'une introgression de gènes non adaptés à une population ou à un environnement donné, ce qui limite considérablement leur utilisation dans des programmes de sélection. Sachant que ces résistances sont en plus inefficaces sous une forte pression parasitaire et de faible durabilité, il paraît pertinent d'envisager de diversifier les sources potentielles de résistance à cette maladie en explorant des sources alternatives et complémentaires comme les gènes et de sensibilité.

Le développement des techniques de type NGS ont récemment rendu possible le séquençage du génome du blé tendre (International Wheat Genome Sequencing Consortium [IWGSC], 2018) ainsi que de différentes souches de *Fusarium graminearum* (Alouane *et al.*, 2018 ; Cuomo *et al.*, 2007), facilitant non seulement la recherche de nouvelles sources de résistance via le criblage des ressources génétiques, mais surtout, ouvrant la voie à la recherche chez le blé et pour cette interaction de sources alternatives telles que les gènes de sensibilité.

c) Concept de sensibilité dans le contexte de la fusariose du blé

Beaucoup d'efforts ont été et sont toujours consacrés à l'identification de sources de résistance à la fusariose de l'épi chez le blé. Toutefois, aucune résistance totale n'a encore pu être identifiée à ce jour. L'introgression d'un ou de plusieurs de ces QTL dans un cultivar de blé sensible reste jusqu'à présent toujours insuffisant pour induire une résistance efficace et durable (Buerstmayr *et al.*, 2009 ; Salameh *et al.*, 2011). Partant de ce constat, on peut tout de même se questionner sur la réelle inefficacité des QTL de résistance identifiés jusqu'à présent. En effet, l'absence de résistance observée pourrait avant tout provenir d'une forte présence de gènes ou d'allèles de sensibilité dans les génomes qui contre-balanceraient, avec un effet plus fort, la résistance induite par les différents QTL connus. La présence de nombreux gènes de sensibilité chez le blé pourrait provenir du processus évolutif très particulier qui a conduit à la création des variétés actuelles. Le blé est une plante cultivée par l'homme depuis environ 10 000 ans au cours desquels de nombreux processus d'amélioration des cultures ont eu lieu avec pour objectif de sélectionner les variétés présentant les caractères les plus

rentables (Feldman *et al.*, 2001). Si l'homogénéité et l'uniformité des fonds génétiques qui en découlent offrent aujourd'hui des avantages à la fois en termes de quantité et de qualité des récoltes, ces pratiques conduisent indéniablement à l'érosion génétique des variétés cultivées (Harlan, 1972 ; van de Wouw *et al.*, 2010), avec pour conséquence directe une plus grande sensibilité des cultivars envers les agents pathogènes (Hammer and Teklu, 2008 ; Parker, 1988) notamment via la probable fixation de facteurs de sensibilité dans leurs génomes. De précédentes études ont montré une résistance supérieure aux maladies chez des cultivars de blé « synthétiques » par rapport aux cultivars traditionnels (Börner *et al.*, 2015 ; Szabo-Hever *et al.*, 2018). L'étude du montage génétique du cultivar de blé tendre Renan semble confirmer cette observation. Cette variété, qui est considérée comme tolérante à la fusariose de l'épi et aux rouilles (Bai *et al.*, 2018 ; Dedryver *et al.*, 2009) et qui est utilisée en agriculture biologique depuis trente ans, est le fruit du croisement entre un hybride *A. ventricosa* × *T. persicum* avec le cultivar de blé tendre « Marne ». Outre l'hypothèse de Szabo-Hever et collaborateurs (2018) qui suggèrent que l'utilisation d'espèces apparentées au blé tendre a pu réintroduire des QTL encore inexploités, on ne peut exclure le fait que l'amélioration de la résistance observée pour les blés synthétiques tels que Renan puisse également être une conséquence de l'élimination d'allèles de sensibilité présents dans le parent hexaploïde (*i.e.* le cultivar de blé tendre « Marne » dans le cas de Renan) par introgression de matériels génétiques provenant d'espèces non issues de la sélection variétale. La création d'un blé « synthétique » pourrait ainsi permettre d'introgresser dans les cultivars d'intérêt agronomique actuels, des versions de gènes perdues lors des processus de sélection successifs. Cette hypothèse selon laquelle les génomes des variétés de blé cultivées actuellement contiennent un nombre non négligeable de facteurs de sensibilité, semble être appuyée par un certain nombre d'études récentes. Par exemple, Ma et collaborateurs (2006) ont montré que la résistance du cultivar « Chinese Spring » était considérablement améliorée lors de la substitution de son chromosome 7A par celui du cultivar « Sumai 3 » dans lequel aucun QTL de résistance n'est présent (Ma *et al.*, 2006). La résistance de « Chinese Spring » s'expliquerait donc ici, non pas par un gain de facteur(s) de résistance provenant du chromosome de « Sumai 3 », mais plutôt par la perte de facteurs de sensibilité présents sur les bras longs et courts du chromosome 7A (Ma *et*

al., 2006). L'étude a également montré que la simple délétion de bras longs ou courts de cinq autres chromosomes de « Chinese Spring » améliore également la résistance de cette variété à la fusariose de l'épi (Ma *et al.*, 2006), suggérant que plusieurs facteurs de sensibilité pourraient être dispersés dans le génome de ce cultivar. Dans une autre étude, un QTL situé sur le bras court du chromosome 2D de Sumai-3 a également été décrit comme impliqué dans la sensibilité à la fusariose de l'épi (Basnet *et al.*, 2012). De la même manière, la suppression d'un fragment correspondant à 19 % de la taille du bras long du chromosome 3D chez le cultivar sensible « Apogée » et chez le cultivar « Chinese Spring » a également permis de suspecter la présence de gène(s) de sensibilité en augmentant d'environ de 30 % à 50 % sa résistance à la maladie (Garvin *et al.*, 2015). Srinivasachary et collaborateurs (2008) ont montré que la tolérance du cultivar « Spark » était conférée en grande partie par l'allèle sauvage du gène Rht-D1 tandis que l'allèle Rht-D1b présent dans des populations sensibles était responsable d'environ 50 % de la variance phénotypique associée aux diminutions des résistances de type 1 et 2 (Srinivasachary *et al.*, 2008). Même si les facteurs de sensibilité n'ont pas été clairement identifiés dans les études précédemment citées, ces dernières démontrent que leur fréquence dans les variétés cultivées pourrait être beaucoup plus importante que prévu. Cette hypothèse pourrait à l'avenir permettre d'orienter différemment les recherches concernant l'amélioration variétale, en cherchant plutôt à identifier les facteurs de sensibilité présents, plutôt que de chercher d'hypothétiques gènes de résistance.

L'efficacité de l'élimination de facteurs de sensibilité plutôt que la recherche de nouveaux QTL de résistance pourrait être illustrée par l'exemple de *Fhb1*. En effet, *Fhb1* est le seul QTL parmi les 556 découverts ces vingt dernières années qui est largement utilisé par les programmes de sélection du blé dans le monde (Li *et al.*, 2019a). En France, ce QTL a été introgressé avec succès dans la variété de blé « Jacéo » qui présente une tolérance accrue à la fusariose de l'épi, aux rouilles ainsi qu'au froid (Chetouhi, 2015 ; Steiner *et al.*, 2017). Or, deux études réalisées de manière indépendante par deux équipes distinctes ont très récemment démontré que la résistance gouvernée par *Fhb1* est en réalité principalement pilotée par un seul des 16 gènes inclus dans ce QTL (Li *et al.*, 2019b ; Su *et al.*, 2019). Ce gène, appelé Ta-HRC code pour une protéine de liaison au calcium riche en histidine

localisée au niveau du noyau. Les deux études s'accordent sur le fait que Ta-HRC fonctionne comme un gène de sensibilité puisqu'elles ont démontré qu'une délétion du codon « start » de ce gène, induisant une inhibition totale de son expression, est le facteur déterminant de la résistance à la fusariose induite par *Fhb1* (Li *et al.*, 2019b ; Su *et al.*, 2019). À notre connaissance, aucun effet pléiotropique n'a encore été relevé lors de l'utilisation de Ta-HRC, probablement parce qu'il semblerait que ce soit la copie de la composante B du génome qui soit responsable du phénotype sensible de la plante (Su *et al.*, 2019) et que la perte de fonction induite par son élimination pourrait être compensée par les copies des composantes A et D. Il s'agit donc du premier gène de sensibilité clairement validé et utilisable chez le blé tendre vis-à-vis de la fusariose de l'épi. On peut mettre en lien ces résultats avec ceux de deux autres études plus anciennes qui étaient déjà parvenues à identifier un allèle de sensibilité candidat sur le bras court du chromosome 2D dans le cultivar « Sumai 3 ». Le gène en question, codant pour une multidrug resistance-associated protein, n'avait toutefois pas pu être validé formellement (Basnet *et al.*, 2012 ; Handa *et al.*, 2008). La détection d'une région chromosomique associée à la sensibilité dans le cultivar de blé duquel provient *Fhb1*, suggère que le faible niveau général de résistance du blé pourrait provenir de l'existence d'un ensemble d'allèles de sensibilité présents même dans les génomes des cultivars les plus tolérants à la fusariose tels que Sumai 3. Cela pourrait également expliquer pourquoi l'extinction du gène TaHRC n'explique que 40 % de l'amélioration de la résistance de la plante (Li *et al.*, 2019b ; Su *et al.*, 2019). L'utilisation de ces gènes de sensibilité combinée à celle des QTL de résistance, pourrait ainsi s'avérer être une alternative prometteuse, comme en témoigne l'exemple de Ta-HRC.

Cependant, avant d'envisager pouvoir exploiter la sensibilité du blé tendre comme un moyen d'améliorer sa résistance à la fusariose de l'épi, il est nécessaire de caractériser au niveau le plus fin les gènes, fonctions, mécanismes et processus biologiques impliqués dans la sensibilité du blé à la maladie. Actuellement, le dialogue moléculaire mis en place lors de l'établissement de la maladie constitue encore une véritable « boîte noire », où facteurs de sensibilité et effecteurs demeurent toujours méconnus. Ainsi, l'identification des déterminants moléculaires ainsi que la compréhension des liens entre l'expression des effecteurs de l'agent pathogène et le succès du développement

infectieux, en caractérisant leurs rôles dans le remodelage des fonctions cellulaires végétales constitue ainsi une véritable question de Biologie intégrative des interactions et s'avérera nécessaire pour le développement de nouvelles stratégies de contrôle des épisodes épidémiques.

d) État de l'art concernant la sensibilité du blé tendre à la Fusariose de l'épi

La fusariose de l'épi, principalement causée par *Fusarium graminearum*, est l'une des maladies fongiques du blé les plus dévastatrices. Au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont été déployés pour disséquer la résistance du blé tendre à la fusariose de l'épi, en étudiant à la fois les réponses du blé à l'infection et, plus récemment, les déterminants fongiques de la pathogénicité. Bien qu'aucune résistance totale n'ait été identifiée jusqu'à présent, ces travaux ont démontré que certaines fonctions de la plante et l'expression de gènes spécifiques sont nécessaires pour favoriser le développement de la maladie. Associé à la liste croissante des effecteurs de *F. graminearum* capables de détourner les processus moléculaires de la plante, ce fait plaide fortement en faveur d'un lien fonctionnel entre les facteurs liés à la sensibilité et le devenir de cette maladie. Au cours de cette partie introductive publié sous forme de revue dans le journal *Frontiers in Plant Science*, nous rassemblons les données les plus récentes concernant l'implication des gènes, fonctions et mécanismes végétaux et fongiques dans le développement de la sensibilité et nous discutons de la possibilité de les utiliser pour diversifier les sources actuelles de résistance.



Searching for FHB Resistances in Bread Wheat: Susceptibility at the Crossroad

Francis Fabre[†], Florian Rocher[†], Tarek Alouane, Thierry Langin and Ludovic Bonhomme*

Université Clermont Auvergne, INRAE, UMR 1095 Genetics, Diversity and Ecophysiology of Cereals, Clermont-Ferrand, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Paul Christiaan Struik,
Wageningen University and Research,
Netherlands

Reviewed by:

Wei-Hua Tang,
Institute of Plant Physiology
and Ecology, Shanghai Institutes
for Biological Sciences (CAS), China
Moez Hanin,
University of Sfax, Tunisia

*Correspondence:

Ludovic Bonhomme
ludovic.bonhomme@inrae.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

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

Received: 29 March 2020

Accepted: 07 May 2020

Published: 11 June 2020

Citation:

Fabre F, Rocher F, Alouane T,
Langin T and Bonhomme L (2020)
Searching for FHB Resistances
in Bread Wheat: Susceptibility
at the Crossroad.
Front. Plant Sci. 11:731.
doi: 10.3389/fpls.2020.00731

Fusarium head blight (FHB), primarily caused by *Fusarium graminearum*, is one of the most devastating fungal wheat diseases. During the past decades, many efforts have been deployed to dissect FHB resistance, investigating both the wheat responses to infection and, more recently, the fungal determinants of pathogenicity. Although no total resistance has been identified so far, they demonstrated that some plant functions and the expression of specific genes are needed to promote FHB. Associated with the increasing list of *F. graminearum* effectors able to divert plant molecular processes, this fact strongly argues for a functional link between susceptibility-related factors and the fate of this disease in wheat. In this review, we gather more recent data concerning the involvement of plant and fungal genes and the functions and mechanisms in the development of FHB susceptibility, and we discuss the possibility to use them to diversify the current sources of FHB resistance.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Fusarium graminearum*, scab, susceptibility factors, S genes, fungal effectors, new resistance sources

INTRODUCTION

Fusarium head blight (FHB) is a cereal fungal disease primarily induced by *Fusarium graminearum* (Goswami and Kistler, 2004; Xu and Nicholson, 2009). In wheat, FHB has a direct impact on yield and grain quality, reducing grain weight as well as changing protein accumulation. FHB also causes serious health concerns through the contamination of grains by mycotoxins (e.g., deoxynivalenol, DON, a group 3 carcinogenic toxin), which are resilient to most transformation processes (Li et al., 2014). FHB has become a major threat for wheat crops since the early 1990s, especially in the main producing areas, such as North America, Europe, and China (Zhang et al., 2012). For example, economic losses have been estimated to a total of \$1.176 billion over 2015 and 2016 in the United States (Wilson et al., 2018). Such losses are expected to increase as a result of an amplification of the frequency and the intensity of FHB outbreaks due to rises in temperatures and occasional increases in air humidity expected with the climate change (Luck et al., 2011; Shah et al., 2014).

Although the combined use of tolerant wheat cultivars, fungicides, and specific management practices (e.g., tillage and crop rotation) can reduce part of the losses due to the disease (Haidukowski et al., 2005; Hollingsworth et al., 2008; Salgado et al., 2014; Dahl and Wilson, 2018), no efficient strategy can fully control FHB epidemics so far (Mesterházy et al., 2005;

Tóth et al., 2008). Primarily addressed through the search for genetic resistance, the last two decades of prolific FHB researches turn out with more than 550 quantitative trait loci (QTLs) (Steiner et al., 2017; Venske et al., 2019), covering the whole genome of wheat but with little effect on resistance improvement and failing in identifying regular resistant genes. Twenty years after the identification of *Fhb1*, the most stable and efficient locus for wheat resistance to FHB (Bai et al., 1999), it was recently shown that a deletion spanning the start codon or an N-terminal mutation of the *TaHRC* gene encoding a putative histidine-rich calcium-binding protein explains part of the *Fhb1*-mediated resistance (Li et al., 2019; Su et al., 2019). Although still in dispute, *TaHRC* constitutes the first susceptibility (S) gene to FHB in wheat and directly questions the involvement of susceptibility factors in the disease progress. With this in mind, the purpose of this review is to discuss the growing interest about the determinism of susceptibility to FHB by gathering information from both interacting partners and by emphasizing on its benefits in diversifying the current sources of FHB resistance.

FHB INFECTION PROCESS: IS SUSCEPTIBILITY BEHIND THE MIRROR?

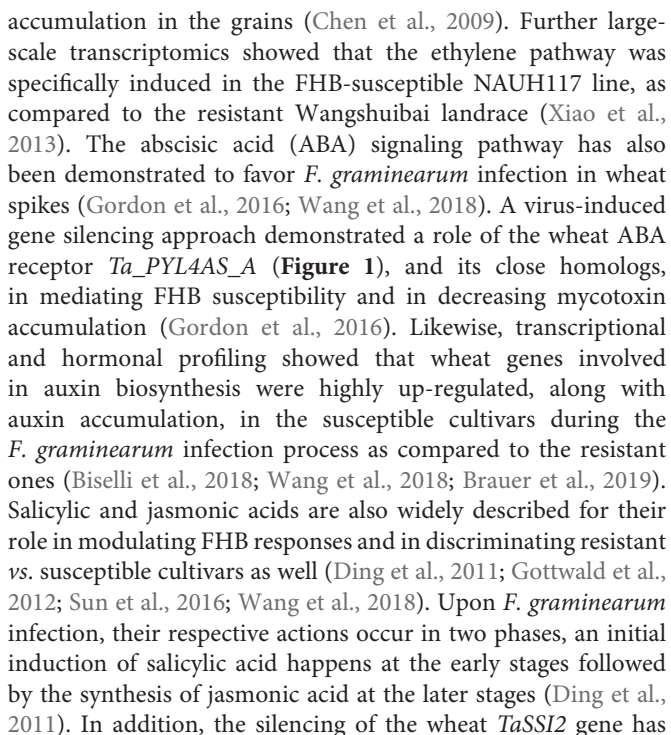
Although the recessive nature of some plant resistances has been established for decades, the concept of susceptibility factors, encoded by the so-called susceptibility genes (S genes), has been clearly defined in 2002 by describing the function of the *pmr6* plant gene that promotes the infection process and supports the pathogen's growth and development (Vogel et al., 2002). Many S genes are now described in plants [reviewed in van Schie and Takken (2014)]. Albeit relatively few, those controlling the wheat/pathogens interactions fit well with this model. For example, the monodehydroascorbate reductase gene, *TaMDHAR4*, has been demonstrated to promote wheat stripe rust infection (Feng et al., 2014). Its mutation results in reducing the hyphae growth of the biotrophic pathogen *Puccinia striiformis*, thus inhibiting its sporulation and enhancing necrosis at the infection site. Further studies in the same interaction evidenced two other S genes, *TaMDAR6* and *TaSTP13* (Abou-Attia et al., 2016; Huai et al., 2020), emphasizing the existence of several S genes in the wheat genome and suggesting that some of them might be implicated in wheat susceptibility-related mechanisms to FHB. If most studies have focused on the genetic determinants of wheat resistance to FHB so far, an interesting alternative is to consider the molecular and the physiological processes that make the host plant susceptible to *F. graminearum*. An extensive literature dealing with large-scale analyses has already shown that, compared to resistant cultivars, the most susceptible ones are characterized by a specific deregulation of genes involved in a wide range of molecular processes (e.g., transcription factors, enzymes involved in primary and secondary metabolism, and defense-related genes), suggesting the intricate participation of a wealth of potential susceptibility factors (Ding et al., 2011; Gottwald et al., 2012; Erayman et al., 2015; Pan et al., 2018; Wang et al., 2018; Brauer et al., 2019).

Genetics Demonstration of the Existence of Wheat Susceptibility Factors to FHB

The involvement of putative susceptibility determinants during FHB development has been primarily suggested by studies using wheat aneuploid lines (Figure 1). Ma et al. (2006) first evidenced that ditelosomic lines lacking in specific chromosome arms displayed an enhanced resistance to *F. graminearum* infection, suggesting the removal of pivotal susceptibility factors along with chromosome fragment deletion. Likewise, Garvin et al. (2015), in an attempt to introgress a new FHB resistance locus from the cultivar (cv.) “Freedom” into the susceptible cv. “Apogee,” have shown that the most resistant line was characterized by the deletion of a chromosome segment of about 19% of the length of the 3DL arm in comparison with the cv. “Apogee” (Figure 1). The wheat line missing this genomic interval resulted in up to 59% decrease of FHB severity as compared to cv. “Apogee” and displayed a significant reduction of DON accumulation (Garvin et al., 2015). Similarly, another chromosomal fragment of 31.7 Mbp on the short arm of chromosome 4D was demonstrated to contain potential wheat susceptibility factors to FHB (Hales et al., 2020). Its deletion leads to a significant decrease of *F. graminearum* spreading in wheat spikes. Evidence of susceptibility factors to FHB has also been provided through allele mining studies. The dwarfing allele at the locus *Rht-D1* (*Rht-D1b*, formerly termed *Rht2*) has not been associated to FHB susceptibility by a direct effect of the plant height but rather through a pleiotropic or linkage effect (Draeger et al., 2007). Further experiments demonstrated that, in the cv. “Spark,” FHB resistance was largely conferred by the wild allele of the *Rht-D1* gene, while the *Rht-D1b* allele found in the susceptible lines was responsible for approximately 50% of the phenotypic variance associated with the magnitude of initial infection (Srinivasachary et al., 2009). A similar increase of FHB infection has been described for the two particular alleles of the vernalization-related genes *Vrn-A1* and *Vrn-B1* (Xu et al., 2020). An FHB susceptibility source has also been identified in the “Sumai 3” *Qfhs.kibr-2DS* QTL (Figure 1), in which a specific allele encoding a multidrug resistance-associated protein was identified in the susceptible “Sumai 3”-derived cv. named “Gamenya,” unveiling that the FHB susceptibility determinants could be fortuitously inherited from resistant cultivars (Handa et al., 2008; Basnet et al., 2012; Niwa et al., 2014). Such examples suggest that a substantial subset of S genes/factors could be present in the wheat genome and highly conserved among the wheat cultivars. Although most of these studies provide only indirect evidences about the molecular determinism of FHB susceptibility, these results emphasize the relevance of considering the diversity of S genes as a complementary and promising approach to improve wheat resistance to FHB.

Role of Phytohormones in FHB Development

Several works have already suggested that wheat hormonal pathways play a favorable role in FHB development. For instance, reducing EIN2 expression in wheat, one of the major components of ethylene signaling, decreased the disease symptoms and DON



Shaping FHB Susceptibility in the Course of Grain Development

With a period of maximal susceptibility occurring within 3 days after anthesis (Beccari et al., 2019), FHB develops concomitantly with the grain filling period, during which a large number of plant physiological processes allow a massive accumulation of sugars, lipids, and proteins (Nadaud et al., 2010), resulting in a possible nutrient reservoir in the infection area. Spike ontogeny could thus indirectly and sequentially set up a range of susceptibility factors that can partly explain the dynamics of fungal development during the infection course (Chetouhi et al., 2015, 2016). Extensively boosted during the endosperm expansion, *in planta* *F. graminearum* growth is associated with massive protein abundance adjustments detectable simultaneously in both plant and fungal proteomes at 48–72 h post-inoculation at

anthesis transition (Fabre et al., 2019b). At this stage, extensive metabolic changes in wheat rachis nodes have been reported, including a strong increase of gibberellic acid amount as well as glycolysis intermediates, suggesting that a release of wheat storage carbohydrates could possibly be used for fungal metabolic requirements (Bönnighausen et al., 2018). This is also supported by the converging evidences of large decreases in the expression of genes involved in sucrose and starch metabolism (Erayman et al., 2015; Chetoui et al., 2016). Starch components, such as amylopectin and amylose, are known to be difficult for the fungus to recycle as a carbon source and for DON production (Oh et al., 2016), unlike sucrose (Jiao et al., 2008; Kawakami et al., 2014), suggesting that the deregulation of the host energy processes at the early stage of the disease could be one of the key factors that determine wheat susceptibility. However, the links are not obvious since many other studies have shown that primary metabolism and especially photosynthesis are extensively rearranged (Long et al., 2015; Biselli et al., 2018; Li et al., 2018; Fabre et al., 2019b). Although this can substantially limit the accumulation of sugars, this could also be seen as a means of constraining the energy requirements necessary to trigger defense mechanisms (Bolton, 2009). In agreement with many previous studies suggesting a key role of chloroplast in plant susceptibility (Lo Presti et al., 2015; Sowden et al., 2018; Han and Kahmann, 2019; Kretschmer et al., 2020), the remodeling of its functioning in wheat spikes during FHB is suspected to be a link between the plant defense responses and the adjustments of primary metabolism. This raises direct questions about the mechanisms used by the fungus to achieve such effects (Fabre et al., 2019b).

***Fusarium graminearum* EFFECTORS: KNOCKING AT THE WHEAT CELL DOOR TO TRIGGER SUSCEPTIBILITY?**

Several studies have already demonstrated that plant susceptibility factors could be diverted by a range of pathogen effectors. Consisting of proteins, RNA, and metabolites, effectors are molecules synthesized by the pathogen, delivered in host tissues, and able to alter the structure and the function of the host cell (Hogenhout et al., 2009; Lo Presti et al., 2015). Compared to bacteria, knowledge about fungal effectors remains relatively limited (Niu et al., 2013). However, a number of studies have provided essential information on the ability of *F. graminearum* in interfering with wheat molecular processes. Identifying *F. graminearum* effectors and understanding their roles in the infectious process could be a relevant strategy for identifying wheat susceptibility factors.

Breaking Wheat's Defenses

One of the first characterized effectors of *F. graminearum* is the secreted DON mycotoxin (Miller and Young, 1985). Although its synthesis is not necessary for the penetration phase, its role in fungal spreading within the spike has been reported (Bai et al., 2001). DON acts as an inhibitor of protein and nucleotide synthesis in the host cell (Audenaert et al., 2013). Through such

an effect, DON is supposed to alter the mitochondrial functions of many eukaryotes, and its role in inhibiting programmed cell death as well as in the expression of defense compounds (chitinases, peroxidases, and pathogen-related proteins) has already been described (Brown et al., 2011; Audenaert et al., 2013; Diamond et al., 2013). A recent report has shown that DON promotes the *TaNFXL1* transcription factor in wheat, leading to FHB susceptibility through uncharacterized mechanisms (Brauer et al., 2020). Other *F. graminearum* effectors have been reported so far, revealing that proteins belonging to the cell-wall-degrading enzymes (CWDEs) are important promoters of wheat susceptibility to FHB (Quarantin et al., 2016, 2019; Paccanaro et al., 2017; Lu and Faris, 2019). For instance, several studies identified *F. graminearum* xylanases with a direct impact on cell wall weakening and an indirect role in enhancing hypersensitive-like symptoms in plant tissues (Paper et al., 2007; Pollet et al., 2009; Sella et al., 2013; Tundo et al., 2015). The FGL1 lipase, another CWDE effector (Voigt et al., 2005), was shown to physically interact with the wheat immunophilin protein FKBP12, altering the establishment of the FKBP12/ERG complex, which finally triggers cell death (Niu et al., 2013). In addition, by degrading the plant cell wall, the FGL1 effector promotes the release of free fatty acids that inhibit the callose deposits associated with the immune responses (Blümke et al., 2014). Similarly, the arabinanase Arb93b, induced during the early stage of FHB, was shown to suppress ROS-activated defense along with its arabinan-degrading activity (Hao et al., 2019). Besides protein effectors, sRNA products have also been reported to control plant responses. The 18-nt-length sRNA (Fg-sRNA1) targets a wheat chitin elicitor-binding protein, which is likely to function in wheat disease resistance signaling pathways (Jian and Liang, 2019). The identification of non-targeted allelic variants could thus guide future research toward “loss-of-susceptibility” forms of resistances.

Predicted Effector Searches Reveal an Increasingly Complex Arsenal

Although the catalog of characterized *F. graminearum* effectors remains limited, substantial efforts using genomics approaches have provided a large set of new candidates. Using the reference genome sequence, Brown et al. (2012) established a predicted secretome of 574 proteins sharing the structural features of secreted proteins (small size, cysteine-rich proteins, and signal peptides). This revealed a diverse hydrolytic arsenal and a range of putative effectors that could be potentially delivered in the wheat tissues. Secretome was further investigated by focusing on the 190 small secreted cystein-rich proteins (SS): the extracellular localization was confirmed for 25 of them, and the expression of 34 of them was demonstrated as regulated during the FHB progress (Lu and Edwards, 2015). The sequence analysis suggested that 17 SS harbor conserved functional domains such as glycosyl-hydrolase or pathogenesis-related domains, and two of them were homologous to Ecp2, a well-known effector produced by the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* (Van den Ackerveken et al., 1993). Other studies dealing with *in vitro* or *in planta* approaches have also been successful in enlarging the list of candidate effectors (Paper et al., 2007;

Yang et al., 2012; Ji et al., 2013). By evidencing the protein repertoire found specifically in the extracellular part of the plant tissues or identified in liquid culture and confirmed *in planta* using qRT-PCR, these extended the range of putative function including a number of proteases, esterase, and nucleases. Based on the few structural information available about fungal effectors (Sperschneider et al., 2018), several exploratory reports provided novel insights in their diversity and dynamics (Lysøe et al., 2011; Brown et al., 2017; Fabre et al., 2019a,b). By dissecting the asymptomatic and the symptomatic stages of the FHB infection, Brown et al. (2017) revealed particular gene groups with specific abundance patterns illustrating the early expression of genes involved in the transport of amino acids, in polyamine synthesis and ABC transporters, while hydrolytic carbohydrate-active enzymes and lipases were found at later stages. The delivery of putative effectors by waves at specific stages of the infection has also been confirmed at the protein level using an *in planta* dual-proteome approach (Fabre et al., 2019b). This study further demonstrated that putative effectors could be already accumulated in spores or synthesized within hours, and extensive co-variations were evidenced between abundance changes of effectors and the regulation of plant chloroplast proteins, especially at the beginning of grain cellularization. In addition, strong links were evidenced between the abundance of candidate effectors and strain aggressiveness (Fabre et al., 2019a), emphasizing that increased knowledge of the fungal component could lead to a better understanding of the processes involved in host susceptibility.

CONCLUDING REMARKS

The past decades of researches on FHB in wheat have provided a wealth of information on the genetic and the molecular determinants of the disease progress in spikes, mostly focused on resistance mechanisms. Although still marginally

investigated, wheat susceptibility factors to FHB are emerging as key components that determine the fate of the disease, involving a complex molecular dialogue based on the interplay of fungal effectors and their plant targets. Understanding wheat susceptibility still requires many efforts on both partners and needs to fill the gap between wheat and fungal studies. This knowledge will open new strategies in order to control this complex plant/fungus interaction, providing alternative forms of resistance that are potentially more sustainable. While still a challenge, such loss-of-susceptibility forms have already demonstrated their potential to provide efficient and durable sources of disease resistance in crops (Pavan et al., 2010). They represent a promising strategy to control FHB epidemics and may provide a complementary approach to the introgression of gain-of-function resistance genes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FF, FR, and TA organized, prepared, and drafted the manuscript. TL and LB designed, reviewed, and finalized the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Region Auvergne-Rhône-Alpes, the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER support), and by the Agence Nationale de la Recherche (NewMyco project, ANR-15-CE21-0010). The present work falls within the thematic area of the French Government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. C. Saintenac for his critical comments on the manuscript.

REFERENCES

- Abou-Attia, M. A., Wang, X., Nashaat Al-Attala, M., Xu, Q., Zhan, G., and Kang, Z. (2016). TaMDAR6 acts as a negative regulator of plant cell death and participates indirectly in stomatal regulation during the wheat stripe rust-fungus interaction. *Physiol. Plant.* 156, 262–277. doi: 10.1111/ppl.12355
- Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte, M., and Haesaert, G. (2013). Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins* 6, 1–19. doi: 10.3390/toxins6010001
- Bai, G., Kolb, F. L., Shaner, G., and Domier, L. L. (1999). Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* 89, 343–348. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.4.343
- Bai, G. H., Plattner, R., Desjardins, A., and Kolb, F. (2001). Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breed.* 120, 1–6.
- Basnet, B. R., Glover, K. D., Ibrahim, A. M. H., Yen, Y., and Chao, S. (2012). A QTL on chromosome 2DS of “Sumai 3” increases susceptibility to *Fusarium* head blight in wheat. *Euphytica* 186, 91–101. doi: 10.1007/s10681-011-0495-x
- Beccari, G., Arellano, C., Covarelli, L., Tini, F., Sulyok, M., and Cowger, C. (2019). Effect of wheat infection timing on *Fusarium* head blight causal agents and secondary metabolites in grain. *Int. J. Food Microbiol.* 290, 214–225. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2018.10.014
- Biselli, C., Bagnaresi, P., Faccioli, P., Hu, X., Balcerzak, M., Mattera, M. G., et al. (2018). Comparative transcriptome profiles of near-isogenic hexaploid wheat lines differing for effective alleles at the 2DL FHB resistance QTL. *Front. Plant Sci.* 9:37. doi: 10.3389/fpls.2018.00037
- Blümke, A., Falter, C., Herrfurth, C., Sode, B., Bode, R., Schäfer, W., et al. (2014). Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection. *Plant Physiol.* 165, 346–358. doi: 10.1104/pp.114.236737
- Bolton, M. (2009). Primary metabolism and plant defense – Fuel for the fire. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 487–497. doi: 10.1094/MPMI-22-5-0487
- Bönnighausen, J., Schauer, N., Schäfer, W., and Bormann, J. (2018). Metabolic profiling of wheat rachis node infection by *Fusarium graminearum* – decoding deoxynivalenol-dependent susceptibility. *New Phytol.* 221, 459–469. doi: 10.1111/nph.15377
- Brauer, E. K., Balcerzak, M., Rocheleau, H., Leung, W., Scherthaner, J., Subramaniam, R., et al. (2020). Genome editing of a deoxynivalenol-induced transcription factor confers resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 33, 553–560. doi: 10.1094/MPMI-11-19-0332-R
- Brauer, E. K., Rocheleau, H., Balcerzak, M., Pan, Y., Fauteux, F., Liu, Z., et al. (2019). Transcriptional and hormonal profiling of *Fusarium graminearum*-infected wheat reveals an association between auxin and susceptibility. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 107, 33–39. doi: 10.1016/j.pmp.2019.04.006

- Brown, N. A., Antoniw, J., and Hammond-Kosack, K. E. (2012). The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis. *PLoS One* 7:e33731. doi: 10.1371/journal.pone.0033731
- Brown, N. A., Bass, C., Baldwin, T. K., Chen, H., Massot, F., Carion, P. W. C., et al. (2011). Characterisation of the *Fusarium graminearum*-Wheat Floral Interaction. *J. Pathog.* 2011:e626345. doi: 10.4061/2011/626345
- Brown, N. A., Evans, J., Mead, A., and Hammond-Kosack, K. E. (2017). A spatial temporal analysis of the *Fusarium graminearum* transcriptome during symptomless and symptomatic wheat infection. *Mol. Plant Pathol.* 18, 1295–1312. doi: 10.1111/mpp.12564
- Chen, X., Steed, A., Travella, S., Keller, B., and Nicholson, P. (2009). *Fusarium graminearum* exploits ethylene signalling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plants. *New Phytol.* 182, 975–983. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02821.x
- Chetouhi, C., Bonhomme, L., Lasserre-Zuber, P., Cambon, F., Pelletier, S., Renou, J.-P., et al. (2016). Transcriptome dynamics of a susceptible wheat upon *Fusarium* head blight reveals that molecular responses to *Fusarium graminearum* infection fit over the grain development processes. *Funct. Integr. Genomics* 16, 183–201. doi: 10.1007/s10142-016-0476-471
- Chetouhi, C., Bonhomme, L., Lecomte, P., Cambon, F., Merlino, M., Biron, D. G., et al. (2015). A proteomics survey on wheat susceptibility to *Fusarium* head blight during grain development. *Eur. J. plant Pathol.* 141, 407–418. doi: 10.1007/s10658-014-0552-550
- Dahl, B., and Wilson, W. W. (2018). Risk premiums due to *Fusarium* Head Blight (FHB) in wheat and barley. *Agric. Syst.* 162, 145–153. doi: 10.1016/j.agry.2018.01.025
- Diamond, M., Reape, T. J., Rocha, O., Doyle, S. M., Kacprzyk, J., Doohan, F. M., et al. (2013). The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol can inhibit plant apoptosis-like programmed cell death. *PLoS One* 8:e69542. doi: 10.1371/journal.pone.0069542
- Ding, L., Xu, H., Yi, H., Yang, L., Kong, Z., Zhang, L., et al. (2011). Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS One* 6:e19008. doi: 10.1371/journal.pone.0019008
- Draeger, R., Gosman, N., Steed, A., Chandler, E., Thomsett, M., Srinivasachary, A., et al. (2007). Identification of QTLs for resistance to *Fusarium* head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. *Theor. Appl. Genet.* 115, 617–625. doi: 10.1007/s00122-007-0592-593
- Erayman, M., Turktas, M., Akdogan, G., Gurkok, T., Inal, B., Ishakoglu, E., et al. (2015). Transcriptome analysis of wheat inoculated with *Fusarium graminearum*. *Front. Plant Sci.* 6:867. doi: 10.3389/fpls.2015.00867
- Fabre, F., Bormann, J., Urbach, S., Roche, S., and Langin, T. (2019a). 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
- Fabre, F., Vignassa, M., Urbach, S., Langin, T., and Bonhomme, L. (2019b). Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving *Fusarium* head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism. *Plant Cell Environ.* 42, 2291–2308. doi: 10.1111/pce.13549
- Feng, H., Liu, W., Zhang, Q., Wang, X., Wang, X., Duan, X., et al. (2014). TaMDHAR4, a monodehydroascorbate reductase gene participates in the interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. *Plant Physiol.* 166, 7–16. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.12.015
- Garvin, D. F., Porter, H., Blankenheim, Z. J., Chao, S., Dill-Mackey, R., and Gustafson, J. P. (2015). A spontaneous segmental deletion from chromosome arm 3DL enhances *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Genome* 58, 479–488. doi: 10.1139/gen-2015-2088
- Gordon, C. S., Rajagopalan, N., Risseuw, E. P., Surpin, M., Ball, F. J., Barber, C. J., et al. (2016). Characterization of *Triticum aestivum* abscisic acid receptors and a possible role for these in mediating *Fusarium* head blight susceptibility in wheat. *PLoS One* 11:e164996. doi: 10.1371/journal.pone.0164996
- Goswami, R. S., and Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5, 515–525. doi: 10.1111/J.1364-3703.2004.00252.X
- Gottwald, S., Samans, B., Lück, S., and Friedt, W. (2012). Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: two essential mechanisms of *Fusarium* head blight resistance in wheat? *BMC Genomics* 13:369. doi: 10.1186/1471-2164-13-369
- Haidukowski, M., Pascale, M., Perrone, G., Pancaldi, D., Campagna, C., and Visconti, A. (2005). Effect of fungicides on the development of *Fusarium* head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *J. Sci. Food Agric.* 85, 191–198. doi: 10.1002/jsfa.1965
- Hales, B., Steed, A., Giovannelli, V., Burt, C., Lemmens, M., Molnar-Lang, M., et al. (2020). Type II *Fusarium* head blight susceptibility factor identified in wheat. *bioRxiv [Preprint]* doi: 10.1101/2020.02.06.937425
- Han, X., and Kahmann, R. (2019). Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Front. Plant Sci.* 10:822. doi: 10.3389/fpls.2019.00822
- Handa, H., Namiki, N., Xu, D., and Ban, T. (2008). Dissecting of the FHB resistance QTL on the short arm of wheat chromosome 2D using a comparative genomic approach: from QTL to candidate gene. *Mol. Breed.* 22, 71–84. doi: 10.1007/s11032-008-9157-7
- Hao, G., McCormick, S., Vaughan, M., Naumann, T., Kim, H.-S., Proctor, R. H., et al. (2019). *Fusarium graminearum* arabinanase (Arb93B) enhances wheat head blight susceptibility by suppressing plant immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 32, 888–898. doi: 10.1094/mpmi-06-18-0170-r
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R., and Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 115–122. doi: 10.1094/MPMI-22-2-0115
- Hollingsworth, C. R., Motteberg, C. D., Wiersma, J. V., and Atkinson, L. M. (2008). Agronomic and economic responses of spring wheat to management of *Fusarium* head blight. *Plant Dis.* 92, 1339–1348. doi: 10.1094/PDIS-92-9-1339
- Hu, L., Mu, J., Su, P., Wu, H., Yu, G., Wang, G., et al. (2018). Multi-functional roles of TaSSI2 involved in *Fusarium* head blight and powdery mildew resistance and drought tolerance. *J. Integr. Agric.* 17, 368–380. doi: 10.1016/S2095-3119(17)61680-61680
- Huai, B., Yang, Q., Wei, X., Pan, Q., Kang, Z., and Liu, J. (2020). TaSTP13 contributes to wheat susceptibility to stripe rust possibly by increasing cytoplasmic hexose concentration. *BMC Plant Biol.* 20:49. doi: 10.1186/s12870-020-2248-2242
- Ji, X. L., Yan, M., Yang, Z. D., Li, A. F., and Kong, L. R. (2013). Shotgun analysis of the secretome of *Fusarium graminearum*. *Indian J. Microbiol.* 53, 400–409. doi: 10.1007/s12088-013-0392-391
- Jian, J., and Liang, X. (2019). One small RNA of *Fusarium graminearum* targets and silences CEBiP gene in common wheat. *Microorganisms* 7:425. doi: 10.3390/microorganisms7100425
- Jiao, F., Kawakami, A., and Nakajima, T. (2008). Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 285, 212–219. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01235.x
- Kachroo, A., Venugopal, S. C., Lapchik, L., Falcone, D., Hildebrand, D., and Kachroo, P. (2004). Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 5152–5157. doi: 10.1073/pnas.0401315101
- Kawakami, A., Nakajima, T., and Hirayae, K. (2014). Effects of carbon sources and amines on induction of trichothecene production by *Fusarium asiaticum* in liquid culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 352, 204–212. doi: 10.1111/1574-6968.12386
- Kretschmer, M., Damoo, D., Djamei, A., and Kronstad, J. (2020). Chloroplasts and plant immunity: where are the fungal effectors? *Pathogens* 9, 1–16. doi: 10.3390/pathogens9010019
- Li, G., Zhou, J., Jia, H., Gao, Z., Fan, M., Luo, Y., et al. (2019). Mutation of a histidine-rich calcium-binding-protein gene in wheat confers resistance to *Fusarium* head blight. *Nat. Genet.* 51, 1106–1112. doi: 10.1038/s41588-019-0426-427
- Li, X., Zhao, L., Fan, Y., Jia, Y., Sun, L., Ma, S., et al. (2014). Occurrence of mycotoxins in feed ingredients and complete feeds obtained from the Beijing region of China. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 1–8. doi: 10.1186/2049-1891-5-37
- Li, X., Zhong, S., Chen, W., Fatima, S. A., Huang, Q., Li, Q., et al. (2018). Transcriptome analysis identifies a 140 kb region of chromosome 3B containing genes specific to *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 19:852. doi: 10.3390/ijms19030852
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., et al. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 513–545. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623

- Long, X. Y., Balcerzak, M., Gulden, S., Cao, W., Fedak, G., Wei, Y. M., et al. (2015). Expression profiling identifies differentially expressed genes associated with the Fusarium head blight resistance QTL 2DL from the wheat variety Wuhan-1. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 90, 1–11. doi: 10.1016/j.pmpp.2015.02.002
- Lu, S., and Edwards, M. C. (2015). Genome-wide analysis of small secreted cysteine-rich proteins identifies candidate effector proteins potentially involved in *Fusarium graminearum*-wheat interactions. *Phytopathology* 106, 166–176. doi: 10.1094/PHYTO-09-15-0215-R
- Lu, S., and Faris, J. D. (2019). *Fusarium graminearum* KP4-like proteins possess root growth-inhibiting activity against wheat and potentially contribute to fungal virulence in seedling rot. *Fungal Genet. Biol.* 123, 1–13. doi: 10.1016/j.fgb.2018.11.002
- Luck, J., Spackman, M., Freeman, A., TreBicki, P., Griffiths, W., Finlay, K., et al. (2011). Climate change and diseases of food crops. *Plant Pathol.* 60, 113–121. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02414.x
- Lysøe, E., Seong, K.-Y., and Kistler, H. C. (2011). The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 24, 995–1000. doi: 10.1094/MPMI-02-11-0038
- Ma, H. X., Bai, G. H., Gill, B. S., and Hart, L. P. (2006). Deletion of a chromosome arm altered wheat resistance to Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in Chinese spring. *Plant Dis.* 90, 1545–1549. doi: 10.1094/PD-90-1545
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Kászonyi, G., Varga, M., Tóth, B., and Varga, J. (2005). Common resistance to different *Fusarium* spp. causing Fusarium head blight in wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 112, 267–281. doi: 10.1007/s10658-005-2853-2859
- Miller, J. D., and Young, J. C. (1985). Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat. *Can. J. Plant. Pathol.* 7, 132–134.
- Nadaud, I., Girousse, C., Debiton, C., Chambon, C., Bouzidi, M. F., Martre, P., et al. (2010). Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. *Proteomics* 10, 2901–2910. doi: 10.1002/pmic.200900792
- Niu, X.-W., Zheng, Z.-Y., Feng, Y.-G., Guo, W.-Z., and Wang, X.-Y. (2013). The *Fusarium graminearum* virulence factor FGL targets an FKBP12 immunophilin of wheat. *Gene* 525, 77–83. doi: 10.1016/j.gene.2013.04.052
- Niwa, S., Kubo, K., Lewis, J., Kikuchi, R., Alagu, M., and Ban, T. (2014). Variations for Fusarium head blight resistance associated with genomic diversity in different sources of the resistant wheat cultivar “Sumai 3.”. *Breed. Sci.* 64, 90–96. doi: 10.1270/jsbbs.64.90
- Oh, M., Son, H., Choi, G. J., Lee, C., Kim, J. C., Kim, H., et al. (2016). Transcription factor ART1 mediates starch hydrolysis and mycotoxin production in *Fusarium graminearum* and *F.verticillioides*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 755–768. doi: 10.1111/mpp.12328
- Paccanaro, M. C., Sella, L., Castiglioni, C., Giacomello, F., Martínez-Rocha, A. L., D’Ovidio, R., et al. (2017). Synergistic effect of different plant cell wall-degrading enzymes is important for virulence of *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30, 886–895. doi: 10.1094/MPMI-07-17-0179-R
- Pan, Y., Liu, Z., Rocheleau, H., Fauteux, F., Wang, Y., and McCartney, C. (2018). Transcriptome dynamics associated with resistance and susceptibility against fusarium head blight in four wheat genotypes. *BMC Genomics* 19:642. doi: 10.1186/s12864-018-5012-5013
- Paper, J. M., Scott-Craig, J. S., Adhikari, N. D., Cuomo, C. A., and Walton, J. D. (2007). Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics* 7, 3171–3183. doi: 10.1002/pmic.200700184
- Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., and Bai, Y. (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Mol. Breed.* 25, 1–12. doi: 10.1007/s1032-009-9323-6
- Pollet, A., Sansen, S., Raedschelders, G., Gebruers, K., Rabijns, A., Delcour, J. A., et al. (2009). Identification of structural determinants for inhibition strength and specificity of wheat xylanase inhibitors TAXI-IA and TAXI-IIA. *FEBS J.* 276, 3916–3927. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07105.x
- Quarantin, A., Castiglioni, C., Schäfer, W., Favaron, F., and Sella, L. (2019). The *Fusarium graminearum* cerato-platanins loosen cellulose substrates enhancing fungal cellulase activity as expansin-like proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 139, 229–238. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.03.025
- Quarantin, A., Glasenapp, A., Schäfer, W., Favaron, F., and Sella, L. (2016). Involvement of the *Fusarium graminearum* cerato-platanin proteins in fungal growth and plant infection. *Plant Physiol. Biochem.* 109, 220–229. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.10.001
- Salgado, J. D., Madden, L. V., Paul, P. A., Pathology, P., and Ohio, T. (2014). Efficacy and economics of integrating in-field and harvesting strategies to manage Fusarium head blight of wheat. *Plant Dis.* 98, 1407–1421. doi: 10.1094/PDIS-01-14-0093-RE
- Sella, L., Gazzetti, K., Faoro, F., Odorizzi, S., D’Ovidio, R., Schäfer, W., et al. (2013). A *Fusarium graminearum* xylanase expressed during wheat infection is a necrotizing factor but is not essential for virulence. *Plant Physiol. Biochem.* 64, 1–10. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.12.008
- Shah, D. A., De Wolf, E. D., Paul, P. A., and Madden, L. V. (2014). Predicting Fusarium head blight epidemics with boosted regression trees. *Phytopathology* 104, 702–714. doi: 10.1094/PHYTO-10-13-0273-R
- Sowden, R. G., Watson, S. J., and Jarvis, P. (2018). The role of chloroplasts in plant pathology. *Essays Biochem.* 62, 21–39. doi: 10.1042/EBC20170020
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., and Taylor, J. M. (2018). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Mol. Plant Pathol.* 19, 2094–2110. doi: 10.1111/mpp.12682
- Srinivasachary, A., Gosman, N., Steed, A., Hollins, T. W., Bayles, R., Jennings, P., et al. (2009). Semi-dwarfing Rht-B1 and Rht-D1 loci of wheat differ significantly in their influence on resistance to Fusarium head blight. *Theor. Appl. Genet.* 118, 695–702. doi: 10.1007/s00122-008-0930-930
- Steiner, B., Buerstmayr, M., Michel, S., Schweiger, W., Lemmens, M., and Buerstmayr, H. (2017). Breeding strategies and advances in line selection for Fusarium head blight resistance in wheat. *Trop. Plant Pathol.* 42, 165–174. doi: 10.1007/s40858-017-0127-127
- Su, Z., Bernardo, A., Tian, B., Chen, H., Wang, S., Ma, H., et al. (2019). A deletion mutation in TaHRC confers Fhb1 resistance to Fusarium head blight in wheat. *Nat. Genet.* 51, 1099–1105. doi: 10.1038/s41588-019-0425-428
- Sun, Y., Xiao, J., Jia, X., Ke, P., He, L., Cao, A., et al. (2016). The role of wheat jasmonic acid and ethylene pathways in response to *Fusarium graminearum* infection. *Plant Growth Regul.* 80, 69–77. doi: 10.1007/s10725-016-0147-141
- Tóth, B., Kászonyi, G., Bartók, T., Varga, J., and Mesterházy, Á. (2008). Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. *Plant Breed.* 127, 1–8. doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01412.x
- Tundo, S., Moscetti, I., Faoro, F., Lafond, M., Giardina, T., Favaron, F., et al. (2015). *Fusarium graminearum* produces different xylanases causing host cell death that is prevented by the xylanase inhibitors XIP-I and TAXI-III in wheat. *Plant Sci.* 240, 161–169. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.002
- Van den Ackerveken, G. F., Van Kan, J. A., Joosten, M. H., Muisers, J. M., Verbakel, H. M., and De Wit, P. J. (1993). Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 210–215. doi: 10.1094/MPMI-6-210
- van Schie, C. C. N., and Takken, F. L. W. (2014). Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 551–581. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-145854
- Venske, E., dos Santos, R. S., Farias, D., da, R., Rother, V., da Maia, L. C., et al. (2019). Meta-analysis of the QTLome of Fusarium head blight resistance in bread wheat: refining the current puzzle. *Front. Plant Sci.* 10:727. doi: 10.3389/fpls.2019.00727
- Vogel, J. P., Raab, T. K., Schiff, C., and Somerville, S. C. (2002). PMR6, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 2095–2106. doi: 10.1105/tpc.003509
- Voigt, C. A., Schäfer, W., and Salomon, S. (2005). A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J.* 42, 364–375. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02377.x
- Wang, L., Li, Q., Liu, Z., Surendra, A., Pan, Y., Li, Y., et al. (2018). Integrated transcriptome and hormone profiling highlight the role of multiple phytohormone pathways in wheat resistance against Fusarium head blight. *PLoS One* 13:e0207036. doi: 10.1371/journal.pone.0207036
- Wilson, W., Dahl, B., and Nganje, W. (2018). Economic costs of Fusarium head blight, scab and deoxynivalenol. *World Mycotoxin J.* 11, 291–302. doi: 10.3920/WMJ2017.2204
- Xiao, J., Jin, X., Jia, X., Wang, H., Cao, A., Zhao, W., et al. (2013). Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against Fusarium head blight in wheat landrace Wangshuibai. *BMC Genomics* 14:197. doi: 10.1186/1471-2164-14-197
- Xu, K., He, X., Dreisigacker, S., He, Z., and Singh, P. K. (2020). Anther extrusion and its association with Fusarium head blight in CIMMYT wheat germplasm. *Agronomy* 10, 1–16. doi: 10.3390/agronomy10010047

- Xu, X., and Nicholson, P. (2009). Community ecology of fungal pathogens causing Wheat head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 83–103. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081737
- Yang, F., Jensen, J. D., Svensson, B., Jørgensen, H. J. L., Collinge, D. B., and Finnie, C. (2012). Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. *Mol. Plant Pathol.* 13, 445–453. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00759.x
- Zhang, H., vander Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Xu, J., et al. (2012). Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS One* 7:e31722. doi: 10.1371/journal.pone.0031722

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.

Copyright © 2020 Fabre, Rocher, Alouane, Langin and Bonhomme. 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.

Problématique et objectifs de la Thèse

La réalisation de l'ensemble de ce travail de thèse a été effectuée au sein de l'Unité Mixte de Recherche Génétique, Diversité, Écophysiologie des Céréales (UMR 1095 GDEC, INRAE/UCA). Les projets de cette structure sont focalisés sur le blé tendre, une espèce modèle d'importance agronomique majeure (2^{ème} céréale au niveau mondial en termes de volumes produits). Associant sept équipes de recherche aux compétences complémentaires, ces projets sont menés à l'interface entre recherche fondamentale et recherche finalisée avec pour objectif commun : l'amélioration de la qualité et du rendement du blé dans un contexte d'agriculture durable et de changements climatiques. Ils visent (i) à avancer dans la connaissance de la structure, de l'organisation, du fonctionnement et de l'évolution du génome complexe du blé ; (ii) à comprendre la genèse de nouvelles fonctions et/ou l'évolution de fonctions spécifiques conservées ; (iii) à décrypter les mécanismes contrôlant des caractères agronomiques importants (rendement, qualité du grain, résistance à des stress biotiques et abiotiques) ; (iv) à caractériser les ressources génétiques, et *in fine* (v) à intégrer et modéliser ces connaissances et développer des outils pour améliorer l'efficacité de la sélection variétale. Au sein de l'UMR GDEC, l'équipe « Maladies des céréales » (MDC) focalise ses projets de recherche autour de deux des principales maladies affectant les cultures de blé tendre : la septoriose et la fusariose de l'épi. Créée en 2010, les projets de l'équipe MDC présentent un double-objectif : (i) mettre à la disposition de la sélection de nouveaux gènes, de nouvelles combinaisons génétiques et des mécanismes originaux de façon à élargir les sources de résistance, et à augmenter leur durabilité et (ii) apporter des éléments d'information originaux sur les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans le contrôle et le développement de ces deux maladies. Ces deux objectifs se structurent en trois axes de recherche complémentaires, le premier axe, animé par Cyrille Saintenac vise à comprendre le déterminisme et le fonctionnement des résistances totales ou quantitatives du blé tendre à *Z. tritici*. Le deuxième axe, animé par Ludovic Bonhomme, vise à identifier des gènes de sensibilité à la fusariose de l'épi. Le troisième axe, animé par Thierry Langin consiste à évaluer la contribution du microbiome à la résistance du blé. C'est dans le second axe de recherche que s'inscrit ce travail de thèse. Cet axe s'inscrit dans une véritable démarche de biologie intégrative visant à identifier, chez la

plante comme chez l'agent pathogène, les bases génétiques, moléculaires et physiologiques contrôlant l'interaction du blé tendre avec *F. graminearum*. Les travaux de l'équipe pour ce second axe ont débuté avec la thèse de Chérif Chetouhi dont le travail fut d'effectuer une analyse des réponses moléculaires du blé tendre lors de son interaction avec *F. graminearum* au cours des étapes majeures du développement du grain, c'est-à-dire au cours des stades où la maladie était totalement établie. Son objectif était de caractériser des gènes, fonctions et processus biologiques liés à la sensibilité de la plante. Pour réaliser cela, Chérif Chetouhi a utilisé des techniques de transcriptomique (Chetouhi *et al.*, 2016) et de protéomique (Chetouhi *et al.*, 2014) afin d'analyser les réponses moléculaires du cultivar de blé très sensible Récital au cours de son interaction avec *F. graminearum*. Ces analyses ont été réalisées à différents stades ontogéniques allant de la floraison jusqu'aux grains matures. Ces deux approches « omiques » complémentaires ont permis l'identification de modifications majeures dans certains processus cellulaires de la plante au cours de l'infection comme par exemple, l'induction des gènes impliqués dans la régulation négative de la mort cellulaire de la plante en présence de *F. graminearum*. Bien que les connaissances concernant les modifications physiologiques moléculaires de la plante en présence du champignon aient été grandement améliorées par les travaux de Chérif Chetouhi, les événements moléculaires associés à *Fusarium graminearum* restent une véritable boîte noire. En effet, les résultats de Chérif Chetouhi ont montré une réelle difficulté à identifier les acteurs moléculaires fongiques *in planta* et ce, même aux stades les plus avancés de la maladie. Associés au travail de thèse de Chérif Chetouhi, d'autres résultats obtenus par Rachelle Abou-Sleiman lors de son stage de Master 2 dans l'équipe en 2014, ont permis de clairement redéfinir les contours de la cinétique d'infection à étudier. En infectant des épillets de blé avec une souche de *Fusarium graminearum* marquée à la GFP directement dans la cavité florale, elle a ainsi pu montrer que la germination des spores du champignon s'observait dès 24 heures post-inoculation (hpi) au niveau de l'apex de l'ovaire du blé, que le mycélium commençait à se développer à 48hpi, qu'il recouvrait entièrement la glumelle à 72 hpi et que les premiers symptômes apparaissaient à 96 hpi.

À partir de l'ensemble des résultats de ces précédents travaux, plusieurs aspects de l'interaction restent encore à déterminer : (i) quels sont les événements moléculaires précoces imputables à la

plante et à *F. graminearum* permettant d'expliquer le succès de la maladie et, (ii) existe-t-il des spécificités dans le dialogue moléculaire établi lors de l'interaction permettant d'expliquer les différences d'agressivité et de sensibilité observées ?

Les travaux que je réalise au cours de ma thèse sont ainsi la continuité directe de ceux réalisés par Chérif Chetouhi et Rachelle Abou-Sleiman et ambitionnent de répondre aux deux questions précédentes. L'intitulé de ma thèse est « **Déterminisme moléculaire de la sensibilité du blé à la Fusariose de l'épi : Comment les évènements moléculaires précoces contrôlent le devenir de l'infection ?** » Ce travail s'organise autour de deux objectifs principaux :

Objectif 1 : Analyse de la nature et de la dynamique des protéomes végétal et fongique, composantes fondamentales du dialogue moléculaire contrôlant le devenir de l'interaction entre le blé tendre et *F. graminearum*.

Au cours de cet objectif, la question posée concerne la nature et la dynamique des évènements moléculaires précoces contribuant à la sensibilité de la plante. La première étape de cette étude a été de mettre au point un protocole d'étude protéomique suffisamment puissant et résolutif pour la détection des protéines fongiques *in planta*. Ce protocole expérimental, basé sur une double approche protéomique a été utilisé pour collecter simultanément des données sur l'abondance en protéines du blé et de *Fusarium graminearum* au cours des tout premiers stades de l'établissement de la maladie. Cet objectif, qui correspond au premier chapitre de la thèse, a permis la rédaction d'un premier article intitulé « **Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving Fusarium head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism** » publié en mars 2019 dans la revue *Plant Cell & Environment*.

Objectif 2 : Analyse de l'impact des fonds génétiques du blé et de *Fusarium graminearum* sur le développement de la maladie.

Le deuxième objectif de la thèse questionne l'impact des fonds génétiques des souches fongiques et des plantes infectées sur le dialogue moléculaire qui s'établit lors du développement de la maladie afin d'identifier les évènements moléculaires génériques et spécifiques ayant lieu au cours

de l'interaction. Pour cela, nous avons choisi d'aborder cette question au travers de deux parties complémentaires.

La première partie de cet objectif visait à comprendre ce qui détermine l'agressivité des souches de *Fusarium graminearum*. Pour cela, une analyse du dual-protéome basée sur la méthode protéomique mise au point lors du premier objectif a été réalisée afin d'identifier l'impact des fonds génétiques de l'agent pathogène et de l'hôte sur les protéomes des différentes souches exprimés dans le cadre de l'infection. Les spécificités qualitative et quantitative des protéomes des trois souches fongiques en fonction du fond génétique du cultivar de blé infecté ont été évaluées. Ces premiers résultats, visant à comprendre le déterminisme de l'agressivité du champignon, ont permis la rédaction d'un article intitulé « **Unbalanced roles of fungal aggressiveness and host cultivars in the establishment of the Fusarium head blight in bread wheat** » accepté en novembre 2019 par le journal *Frontiers in Microbiology* et constituent le premier axe du second chapitre de la thèse.

Dans la seconde partie de cet objectif, l'identification des spécificités protéomiques des cultivars de blé contrastés par leur sensibilité à la fusariose de l'épi a été effectuée. La composante protéomique des différents cultivars de blé en interaction avec les trois souches fongiques a été analysée afin d'apporter des résultats complémentaires sur les facteurs de sensibilité candidats déjà identifiés au cours du premier objectif de la thèse notamment au travers de l'identification de protéines et de processus cellulaires permettant de discriminer les trois cultivars de sensibilité contrastée.

Enfin, le dernier chapitre de ce manuscrit consistera à discuter conjointement l'ensemble des résultats obtenus lors de la thèse et d'identifier les nouvelles questions biologiques et physiologiques qui en découlent.

Chapitre I – Analyse de la nature et de la dynamique des protéomes végétal et fongique, composantes fondamentales du dialogue moléculaire contrôlant le devenir de l'interaction entre le blé tendre et *F. graminearum*.

Introduction

L'interaction entre le blé tendre et *Fusarium graminearum* est, comme toutes relations hôte – pathogène, une relation caractérisée par un échange de molécules d'origines fongique et végétale (Gupta *et al.*, 2015). Pour aborder cet objectif, nous sommes partis du postulat qu'on ne pouvait pas appréhender la complexité de ce dialogue moléculaire sans étudier les événements biochimiques et physiologiques imputables aux deux protagonistes. Or, une brève analyse bibliographique des études précédemment effectuées sur ce pathosystème révèle que les auteurs ont souvent concentré leurs efforts soit sur les réponses de la plante (Biselli *et al.*, 2018 ; Bönninghausen *et al.*, 2018 ; Dhokane *et al.*, 2016), soit sur celle du pathogène (Hong *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2011a). Si les informations issues de ces travaux permettent d'acquérir de nouvelles connaissances sur l'un ou l'autre des protagonistes, elles ne permettent l'obtention que d'une image partielle de l'interaction. À ce jour, l'étude simultanée des événements moléculaires de l'hôte et du champignon n'a pu être réalisée que par l'utilisation d'approches transcriptomiques (Pan *et al.*, 2018a ; Peyraud *et al.*, 2017 ; Puri *et al.*, 2016). Cependant, si ce type d'analyse permet d'apporter de nouveaux éléments sur la compréhension du dialogue moléculaire entre une plante et son pathogène (Gottwald *et al.*, 2012 ; Kugler *et al.*, 2013), il n'offre qu'une information incomplète de l'étendue des régulations cellulaires mises en œuvre au cours de l'interaction (Chetouhi *et al.*, 2015 ; Panek *et al.*, 2014 ; Quirino *et al.*, 2010). En effet, il est maintenant établi que l'expression des gènes est régulée à différents niveaux et que les changements d'abondances des ARNm ne sont que très faiblement corrélés aux abondances des protéines correspondantes (Maier *et al.*, 2009 ; Nie *et al.*, 2006 ; Ponnala *et al.*, 2014). L'augmentation ou la diminution de l'abondance d'une protéine, qui est la molécule fonctionnelle de la cellule (Li and Cao, 2010), peut par exemple être due à l'accumulation ou à la lyse de la protéine sans pour autant qu'il n'y ait de modification du niveau du transcrit qui en est à l'origine (Quirino *et al.*, 2010). En complément du transcriptome, l'étude protéomique permettrait donc d'avoir une vision

très précise des ajustements cellulaires qu'un organisme déploie en réponse à une stimulation exogène. Par définition, la protéomique correspond à la détermination des caractéristiques de l'ensemble des protéines présentes dans une cellule à un moment donné et dans une situation déterminée. En tant que moyen de fournir des informations pertinentes des acteurs fonctionnels de la cellule, la protéomique est un outil prometteur pour étudier le dialogue moléculaire. Bien que cette méthode ait déjà fourni des données informatives sur le blé ou le champignon (Chetouhi *et al.*, 2014 ; Dornez *et al.*, 2010 ; Gunnaiah *et al.*, 2012) aucune de ces études n'est parvenue à identifier les protéines de *Fusarium graminearum in planta* (Ding *et al.*, 2011 ; Eggert and Pawelzik, 2011 ; Masci *et al.*, 2015). Ceci est principalement dû au fait que les abondances protéiques entre l'hôte et les protéines de l'agent pathogène sont fortement déséquilibrées au cours de l'interaction notamment aux stades les plus précoces de l'établissement de la maladie. De plus, la grande majorité de ces travaux de protéomiques a suivi un chemin réductionniste en analysant, chez un seul des deux protagonistes, uniquement quelques processus cellulaires ou protéines (McCormick *et al.*, 2010 ; Xie *et al.*, 2019 ; Yao *et al.*, 2016) alors qu'il apparaît de plus en plus clairement que les protéines ne fonctionnent pas de façon isolée, mais sous forme de réseaux étroitement interconnectés (Lescuyer *et al.*, 2004). Ainsi, le choix d'une étude exploratoire à large échelle semble être pertinent pour la caractérisation la plus complète possible du dialogue moléculaire établi lors de la maladie. Tenir compte des événements moléculaires imputables aux deux organismes du pathosystème ainsi que de leur dynamique temporelle au cours des premiers stades de l'infection pourrait permettre l'obtention d'informations non détectables via une analyse réductionniste. En effet, l'identification de la dynamique d'abondance des protéines fongiques au sein même de l'épi de blé pourrait s'avérer être un moyen puissant d'améliorer nos connaissances sur les effecteurs impliqués dans la manipulation. De la même manière, la prédiction des adressages de ces protéines dans les organites de la plante, associée aux variations d'abondance des protéines végétales de l'organe ciblé, pourrait s'avérer être un moyen original d'identifier les facteurs de sensibilité du blé à fusariose de l'épi.

Pour répondre à cet objectif, la souche fongique la plus agressive en notre possession a été inoculée sur le cultivar de blé le plus sensible afin d'étudier le développement de la maladie dans un

contexte de sensibilité fort pour (i) maximiser la détection d'effecteurs fongique et (ii) maximiser la détection de protéines et processus biologiques associés à la sensibilité du côté de la plante. De plus, nous avons suivi les points de cinétique que Rachelle Abou-Sleiman avait déterminée au cours de son stage afin d'axer notre analyse sur les stades les plus précoces du développement de la maladie. Un intérêt particulier a été donné à l'identification d'effecteurs fongiques candidats, qui, à partir de prédictions de sécrétion et de leur adressage au niveau d'organites spécifiques de la plante, nous a permis d'identifier des facteurs de sensibilité présumés chez la plante. Le bagage protéique déterminant l'établissement de la dynamique du dialogue moléculaire a également été évalué dans les spores et les spores en germination du champignon. En combinant des données protéomiques approfondies avec des analyses de transcription, des données de phénotypage du blé et un profil de développement de la biomasse de *F. graminearum*, nous avons proposé un nouveau répertoire d'effecteurs fongiques putatifs ainsi que des processus cellulaires et physiologiques de la plante possiblement impliqués dans l'établissement de la sensibilité.

Article 1 – Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving Fusarium head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism

Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving *Fusarium* head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism

Francis Fabre¹ | Manon Vignassa¹ | Serge Urbach² | Thierry Langin¹ |Ludovic Bonhomme¹ 

¹Genetics, Diversity and Ecophysiology of Cereals, UMR 1095, INRA, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

²Functional Proteomics Platform (FPP), Institute of Functional Genomics (IGF), CNRS UMR 5203 INSERM U661, Montpellier, France

Correspondence

L. Bonhomme, UMR1095 INRA-UCA, Génétique, Diversité et Écophysologie des Céréales (GDEC), 5 Chemin de Beaulieu F-63039 cedex 2, France.
Email: ludovic.bonhomme@inra.fr

Funding information

FEDER; Region Auvergne-Rhône-Alpes

Abstract

Fungal plant diseases are controlled by a complex molecular dialogue that involves pathogen effectors able to manipulate plant susceptibility factors at the earliest stages of the interaction. By probing the wheat–*Fusarium graminearum* pathosystem, we profiled the coregulations of the fungal and plant proteins shaping the molecular responses of a 96-hr-long infection's dynamics. Although no symptoms were yet detectable, fungal biomass swiftly increased along with an extremely diverse set of secreted proteins and candidate effectors supposed to target key plant organelles. Some showed to be early accumulated during the interaction or already present in spores, otherwise stored in germinating spores and detectable in an in vitro *F. graminearum* exudate. Wheat responses were swiftly set up and were evidenced before any visible symptom. Significant wheat protein abundance changes co-occurred along with the accumulation of putative secreted fungal proteins and predicted effectors. Regulated wheat proteins were closely connected to basal cellular processes occurring during spikelet ontogeny, and particular coregulation patterns were evidenced between chloroplast proteins and fungal proteins harbouring a predicted chloroplast transit peptide. The described plant and fungal coordinated responses provide a resourceful set of data and expand our understanding of the wheat–*F. graminearum* interaction.

KEYWORDS

dual proteomics, *Fusarium graminearum*, *Fusarium* head blight, molecular dialogue, plant–pathogen interaction, secreted protein effectors, spore proteins, susceptibility genes, *Triticum aestivum*

1 | INTRODUCTION

Plants are steadily subjected to biological pressures promoting diseases that could compromise their development. To face the wide diversity of pathogens, plants have evolved several defensive mechanisms such as the cellular recognition of pathogens making the occurrence of the disease an exception (Nejat, Rookes, Mantri, & Cahill, 2017; Staskawicz, 2001). When a successful interaction is establishing,

orchestrated plant responses are usually bypassed by the pathogen using specific molecules, the so-called effectors, able to control host cellular responses (Cesari et al., 2013; Jones & Dangl, 2006; Nürnberger, Brunner, Kemmerling, & Piater, 2004). Although plant can evolve an effector-triggered immunity to promote the targeted plant defences, the ability of the pathogens to evolve new effectors will define the fate of the interaction (Jones & Dangl, 2006; Nürnberger et al., 2004; Thatcher, Gardiner, Kazan, & Manners,

2012). This shapes a singular molecular dialogue based on a complex swapping of molecules that involves swift and coregulated plant responses and their interplay with the set of pathogen effectors (Lo Presti et al., 2015; van Schie & Takken, 2014). Effectors are pivotal components of this molecular dialogue and keystone determinants of parasite manipulation. Mainly of protein nature, they are produced to reach the contact zone with the plant cell or be directly translocated in the host cells (Salcedo et al., 2017). Specific targets of effectors can be proteins, RNA, or DNA, and they constitute the so-called plant susceptibility genes or factors. Susceptibility genes/factors are defined as all plant genes/processes that facilitate infection and support the compatibility with the pathogen (Lapin & Van den Ackerveken, 2013; van Schie & Takken, 2014). Some susceptibility genes have already been described, as exemplified by the *mlo* gene in barley or the *Tsn1* and the *Snn* genes in wheat (Friesen, Zhang, Solomon, Oliver, & Faris, 2008; Jørgensen, 1992). However, their dynamic expression upon pathogen interaction and their connections with effectors are still poorly documented.

One of the relevant pathosystems to decipher the molecular dialogue controlling plant–pathogen interactions is the relation between bread wheat and the fungus *Fusarium graminearum* (*Fg*, teleomorph *Gibberella zeae*). *Fg* belongs to the *Ascomycota* division and is able to infect a broad spectrum of hosts such as small grain cereals (wheat, maize, and barley for instance; Goswami & Kistler, 2004). *Fg* induces *Fusarium* head blight (FHB), one of the most deleterious diseases in cereals (Steiner et al., 2017), leading up to 40% yield losses in wheat and contaminating grains by mycotoxin production (Xu & Nicholson, 2009). Controlling FHB epidemics is therefore of particular concern, because wheat is the second most produced cereal worldwide after maize. The molecular dialogue driving FHB disease occurs in wheat spikelets, which include complex tissues and which continuously change with grain development. This probably requires *Fg* to set up specific infection strategies coordinated with the changing molecular context of spikelet ontogeny. Deciphering this intricate molecular dialogue has recently been made possible because of the availability of the dual genome sequences (Cuomo et al., 2007; International Wheat Genome Sequencing Consortium [IWGSC], 2018; for *Fg* and wheat, respectively). Although *Fg* possesses a small genome of about 36-Mb, wheat is characterized by a complex three-component genome of about 17 Gb (AA, BB, and DD) that could shape specific responses to pathogens (Ma, Bai, Gill, & Hart, 2006).

Previous studies carried out on *Fg* evidenced its ability to produce effector-like molecules such as FGL1, involved in extracellular lysoytic activities and fungal virulence (Voigt, Schäfer, & Salomon, 2005). Further studies on wheat have also reported that *Fg* is able to manipulate wheat cell, in a time-dependent manner, by inducing the reprogramming of pivotal plant biological processes, such as starch and defence metabolisms (Chetouhi et al., 2015, 2016; Erayman et al., 2015). However, most of the in planta analyses performed on this pathosystem have only focused on the plant responses and gained fragmentary information about fungal molecule dynamics (Bönnighausen, Schauer, Schäfer, & Bormann, 2018; Dhokane, Karre,

Kushalappa, & McCartney, 2016; Gunnaiah & Kushalappa, 2014; Li et al., 2018). Previous mRNA analyses have already provided new insights into the putative synthesized molecules involved in the molecular dialogue between wheat and its pathogen (Gottwald, Samans, Lück, & Friedt, 2012; Pan et al., 2018; Peyraud et al., 2017; Puri, Yan, Leng, & Zhong, 2016), but transcripts depict only a limited image of the functional cellular products.

As a mean to provide relevant information from the functional actors of the cell, proteomics is a promising tool to investigate the intricate molecular dialogue in host–pathogen interactions. Although proteomics already yielded informative data in either the wheat or the fungal side (Chetouhi et al., 2015; Dornez et al., 2010; Gunnaiah, Kushalappa, Duggavathi, Fox, & Somers, 2012), no dual proteomics have been successful. The few proteomics dealing with this pathosystem have failed to identify *Fg* proteins in planta (Chetouhi et al., 2015; Ding et al., 2011; Dornez et al., 2010; Eggert & Pawelzik, 2011; Masci et al., 2015; Zhang, Fu, Hiromasa, Pan, & Bai, 2013) or have identified less than a dozen (Zhou, Eudes, & Laroche, 2006). The identification of pathogen's proteins is challenging, because the abundances between the host and the pathogen proteins are strongly unbalanced during the interaction. Moreover, most of the FHB proteomics have been interested in the midterm stages of the infection (Chetouhi et al., 2015; Dornez et al., 2010; Gunnaiah et al., 2012), and none assessed spore protein contents, whereas the molecular events that drive the fate of the interaction are probably shaped during the early stages and even preconditioned by accumulated molecules in the fungal spores.

By using an original shotgun dual proteomics approach, our main goal was to perform a descriptive analysis of the molecular dialogue's dynamics during the early stages of the FHB progress in bread wheat to collect protein abundance data simultaneously in the wheat and *Fg*. The protein baggage contained in spores (Sp) and in germinating spores (gSp) as well as proteins found in an in vitro *Fg* exudate were also assessed to add value to the in planta dataset.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Plant growth and *F. graminearum* inoculation

Fg inoculum was prepared using the *F. graminearum* MDC_Fg1 strain (Alouane et al., 2018) at a concentration of 10^5 spores per ml. *Fg* inoculations were conducted on the FHB-susceptible winter wheat cultivar, cv. Recital. Wheat seeds were sown in buckets and kept at 20°C to allow germination. Plant vernalization was performed at 4°C for 8 weeks, then they were transplanted in 4-L pots and transferred to a growth cabinet with optimal conditions to allow tillering and synchronized flowering. Automatic watering was installed, and the daily photoperiod was set at 16-hr daylight for a temperature of 20°C and 8-hr darkness at 18°C. After 47 days, flowering of the main culm was observed in all plants. Seven additional days were waited for *Fg* infection in order to inoculate spikes showing the same ontogeny during the same day (midanthesis). Three spikes per plant were

inoculated by depositing 10 μ l of inoculum in the floral cavity of six spikelets located in the middle zone of each wheat spike (Figure 1a). Control plants (Mock) were inoculated with water. Only the point-inoculated spikelets were collected at four kinetic points of infection (24, 48, 72, and 96 hr postinoculation [hpi]), and stored at -80°C . Three biological replicates were performed, that is, 72 inoculated spikes (two treatments, four kinetic points, three spikes, and three biological replicates).

2.2 | Protein extraction

Frozen wheat spikelets collected from the same plant were mixed and finely ground using pestle and mortar cooled with liquid nitrogen. For each sample, a denaturing protein extraction using the trichloroacetic acid/acetone procedure was achieved as described in Bonhomme, Valot, Tardieu, and Zivy (2012), except that resolubilization was performed in Laemmli buffer. Protein content was determined using

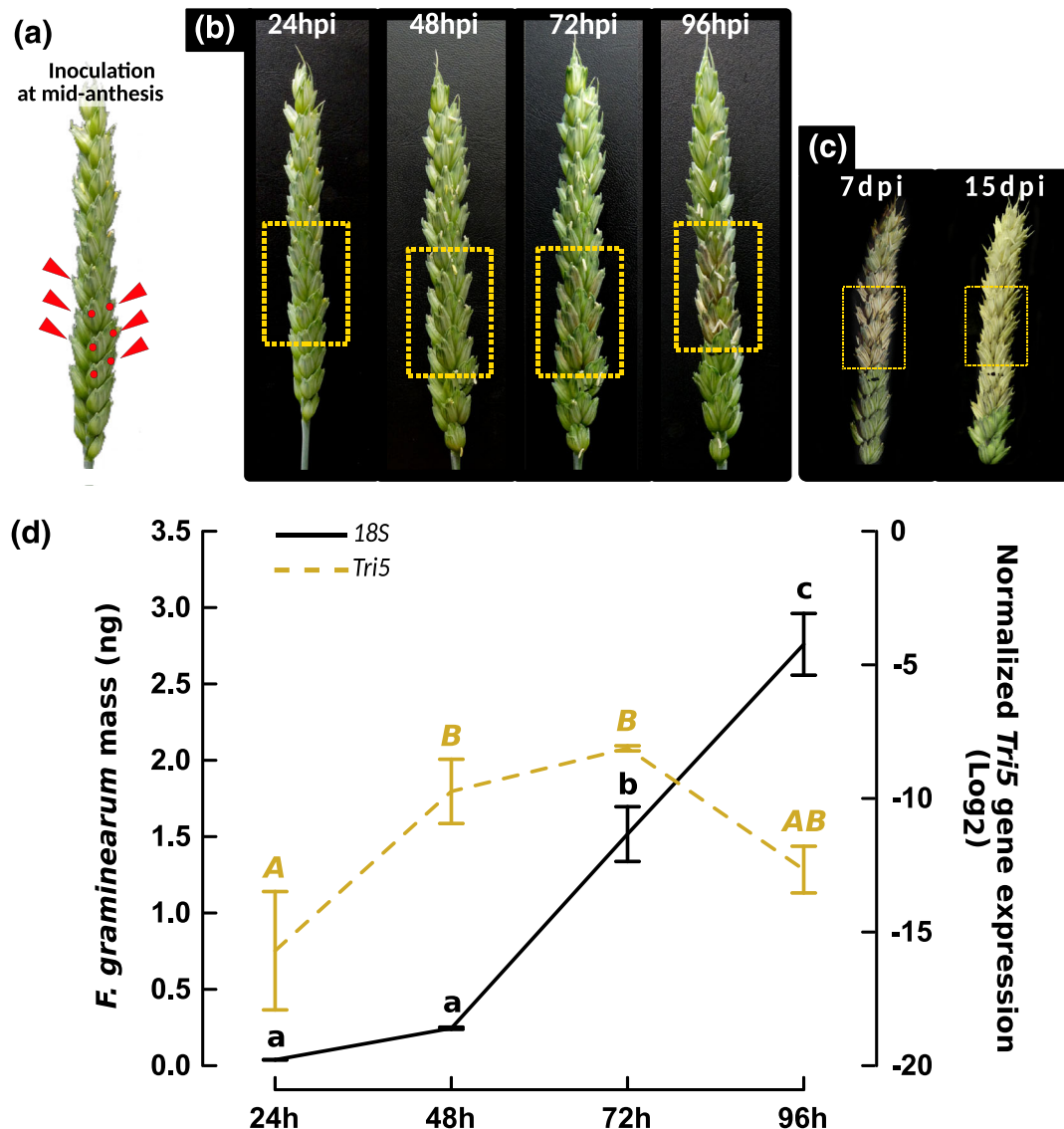


FIGURE 1 Inoculation procedure and monitoring of wheat spike symptoms, *Tri5* gene expression, and fungal biomass development in planta. (a) Schematic representation of the point inoculation method of *Fg* spores in the six spikelets of each wheat spike. (b) The pictures represent the dynamics of symptom development in the inoculated spikelets during the kinetics of infection (hpi: hr postinoculation). (c) The two pictures show representative symptoms observed beyond the studied kinetics (dai: days after inoculation). (d) Line plots show the course of the fungal mass and of the *Tri5* gene expression (an estimate of DON mycotoxin synthesis, Ilgen et al., 2009) during the infection kinetics. Fungal mass (black line) was assessed from the absolute quantification of the 18S ribosomal subunit-encoding genomic region, using RT-qPCR (Pasquet et al., 2016). The values were calculated with a standard curve of 10-fold dilutions (ranging from 0.01 to 100 ng) of *Fusarium graminearum* DNA purification. *Tri5* gene expression (yellow dash line) was analysed on total RNA extracts and normalized per fungal mass unit. Letters show the result of independent Duncan's tests (P value <0.05) for both fungal mass (black letters) and *Tri5* expression (yellow letters)

a protein quantification assay (Macherey-Nagel), with bovine serum albumin as standard. Proteins included in the supernatant of a liquid culture medium of *Fg* (in vitro *Fg* exudate; Data S1) were precipitated as described above, whereas proteins of *Fg* spores (Sp) and *Fg* germinating spores (gSP) was performed using 10% trichloroacetic acid in acetonitrile (Data S1).

2.3 | Tandem mass spectrometry analyses

A starting amount of 120 µg of proteins from each sample was collected and submitted to reduction and alkylation as described in Maghames et al. (2018). Proteins were digested in-gel using trypsin (Promega), as in Shevchenko et al. (1996). Samples were analysed online using a nanoESI Qexactive HF mass spectrometer coupled with an Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific). A gradient consisting of 0–25% B in 100 min, 25–40% B in 20 min, and 40–90% B in 5 min (A = 0.1% formic acid and 2% acetonitrile in water; B = 0.1% formic acid in acetonitrile) at 300 nL/min was used to elute peptides from the capillary reverse-phase column (Pepmap®, Thermo Fisher Scientific). NanoESI was performed with a spray voltage of 2 kV and heated capillary temperature of 270°C. Data were acquired according to Maghames et al. (2018).

2.4 | Identification and quantification of peptides and proteins from tandem mass spectrometry data

Database searches were performed using X!Tandem (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>; 2010.01.01.4). Enzymatic cleavage was

described for trypsin digestion with one possible miscleavage. Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set as static and variable modification, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 10 ppm and 0.5 Da, respectively. Identifications were performed using a concatenated file including the wheat database (IWGSC, v1.0, 110,790 entries, 04/2017), the MDC_Fg1 database (14,157 entries, 07/2018) obtained from an in-lab resequencing (Alouane et al., 2018), and a contaminant database (trypsin, keratins, etc.). Identified proteins were parsed and grouped using the X!TandemPipeline v3.4.3 (Langella et al., 2017). Data filtering was achieved according to a peptide E value <0.01. Proteins were reported when they displayed at least two different peptides in the same sample and when the protein E value was <0.00001. The false discovery rate (FDR) at the peptide level assessed from searches against reversed amino acid sequences for each protein was smaller than 0.8×10^{-6} . Relative quantification of peptides was achieved using the MassChroQ software (Valot, Langella, Nano, & Zivy, 2011) by extracting ion chromatograms as described in Bonhomme et al. (2012). The normalization was performed by dividing ratios by the total peptide abundance value in each liquid chromatography–tandem mass spectrometry run before separation of *Fg* and wheat proteins for statistical analyses (Figure 2a). Subsequent statistical analyses were performed on log₁₀-transformed normalized data.

2.5 | PCR analyses of *F. graminearum*

Quantification of MDC_Fg1 mass was performed on total DNA extracts using 18S gene from three technical of three biological

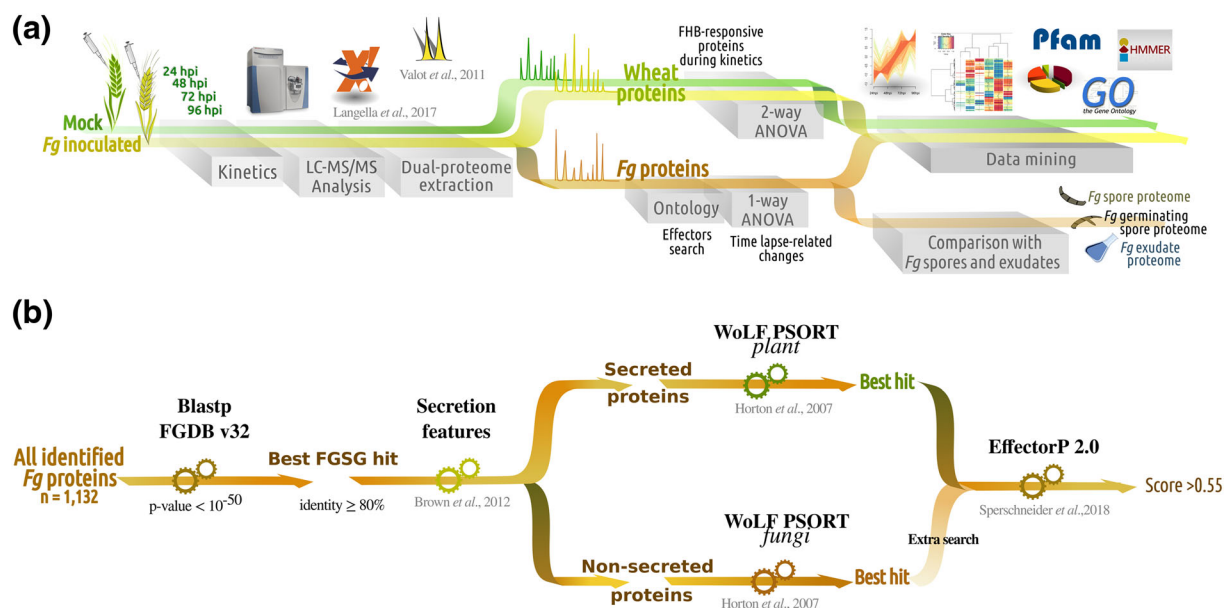


FIGURE 2 Dual proteomics experimental workflow. (a) Experimental procedure performed for the identification, quantification, statistical analyses, and data mining of both fungal and wheat proteins, in Mock and *Fg*-inoculated samples. The workflow is shown for the dual proteomics approach. *Fg* spore proteome, *Fg* germinating spore proteome, and *Fg* exudate proteome were dealt on a qualitative basis. (b) Bioinformatics workflow used for the identification of putative *Fg* protein subcellular localization and *Fg* protein effectors. ANOVA: analysis of variance; FHB: *Fusarium* head blight; hpi: hr postinoculation; LC-MS/MS: liquid chromatography–tandem mass spectrometry

replicates, as described in Pasquet et al. (2016). qRT-PCR analyses were performed on 100 ng of total DNA, and the mass quantification was performed with a standard curve ranging from 0.01 to 100 ng of MDC_Fg1 DNA. Relative quantification of *Tri5* gene expression (Table S1) was performed on total RNA extracts as described in Chetouhi et al. (2016). *Tri5* gene expression was normalized using the total DNA quantification of 18S gene using the Δ ct method (Pfaffl, 2001).

2.6 | Statistical analyses

Results were analysed with the R programming language v3.4.4 (R Core Team, 2018). Regulated *Fg* proteins during the infection progress were traced using a one-way analysis of variance (ANOVA) with the following linear model:

$$Y_{jk} = \mu + d_j + \varepsilon_{jk},$$

where Y_{jk} refers to individual protein abundance, μ is the general mean, d_j is the effect of the duration of the infection, and ε_{jk} is the residual. In wheat spikelets, significance of treatment and ontogeny effects in protein and transcript abundances were tested using a two-way ANOVA with the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + (T_i \times D_j) + \varepsilon_{ijk},$$

where Y_{ijk} refers to individual protein or transcript abundance, T_i is the effect of the treatment, D_j is the effect of the development stage, $T_i \times D_j$ is the infection by development stage interaction, and ε_{ijk} is the residual.

For each individual *Fg* and wheat protein, P values obtained from each effect (d_j and T_i , D_j , and $T_i \times D_j$, respectively) were adjusted to control the FDR for independent test statistics (Benjamini & Hochberg, 1995). The FDR was <0.01 corresponding to P values <0.003 for *Fg* proteins and to P values <0.002, <0.0018, and <0.0006 for wheat proteins in the T , D , and $T \times D$ effects, respectively. Within all significant order 2 interactions, we computed a contrast test procedure to identify significant $T \times D$ interactions (Boussardon et al., 2018). The inoculation effect on protein abundance depending on the development stage was assessed by testing the following difference:

$$\Delta = (\mu_{T_1 - D_1} - \mu_{T_2 - D_1}) - (\mu_{T_1 - D_2} - \mu_{T_2 - D_2}),$$

where Δ refers to a difference of a given comparison, μ is the mean, T_1 and T_2 are the two treatments, and D_1 and D_2 are the two given development stages. Differences were tested with the variance/covariance matrix of the former two-way ANOVA and according to the following model:

$$\Delta = \left\{ (T \times D)_{T_1 - D_1} - (T \times D)_{T_2 - D_1} \right\} - \left\{ (T \times D)_{T_1 - D_2} - (T \times D)_{T_2 - D_2} \right\}.$$

For all tested combinations, the Benjamini and Hochberg adjusted probabilities were calculated and deemed significant when <0.05. A significant adjusted P value depicts that the effect of *Fg* inoculation differed between two time points.

Fuzzy C-means clustering (Kumar & Futschik, 2007) of significantly regulated *Fg* proteins was performed from Z-score transformed values with five clusters and a fuzzification parameter of 2. Hierarchical clustering of significant $T \times D$ contrasts in wheat proteins was performed with the maximum distance as dissimilarity criteria and the McQuitty as agglomeration method (McQuitty, 1966). Relation of wheat protein abundance and development was assessed using Spearman's rank correlation. Protein set enrichment analysis was computed using a chi-squared test between observed and expected protein lists. Adjusted P values were calculated with the FDR procedure for multiple testing under dependency (Benjamini & Yekutieli, 2001) and deemed significant when <0.01.

2.7 | Protein and gene ontology annotations

All identified *Fg* proteins were aligned against the *F. graminearum* genome database (p3_p13839_Fus_grami_v32, release 2013.09.09) in order to get information about their secretion features as described in Brown, Antoniw, and Hammond-Kosack (2012; Figure 2b). Subcellular localization was predicted using WoLF PSORT v0.1 (Horton et al., 2007), specifying "plant organism" for secreted predicted proteins and "fungi organism" for those not predicted as part of the secretome. Putative effectors were traced using the EffectorP v2.0 tool with a score >0.55 (Sperschneider, Dodds, Gardiner, Singh, & Taylor, 2018). GO annotation was performed using HMMER 3.1b2 (February 2015) by comparison of protein sequences with HMM PFAM-A database (01/2017; P value <0.01; dom-evalue <0.01). Only the best result has been kept, and the correspondence between Gene Ontology ID and PFAM ID was performed using PFAM2GO mapping (release 2018/04/21; Mitchell et al., 2015). The *Fg* sequences were also compared with the Pathogen-Host Interaction database of experimentally verified pathogenicity genes (PHI-base v4.6; Urban et al., 2017) using a BLAST analysis (best hit P value <1 $\times 10^{-55}$, identity >80%).

3 | RESULTS

3.1 | Relationships between *Fg* mass, DON biosynthesis, and symptom progress in infected wheat spikelets

Six spikelets on three spikes of each plant were point inoculated at midanthesis using water (Mock) or MDC_Fg1 inoculum. *Fg* mass and *Tri5* gene expression per *Fg* mass unit (coding for the first enzyme of the biosynthetic pathway of DON and its derivatives; Ilgen, Haderler, Maier, & Schäfer, 2009) were detected in infected spikelets as early as 24 hpi, and no symptom was noticed (Figure 1b–d). Afterwards, *Tri5* expression was significantly enhanced during the 24 to 48 hpi transition along with an increasing *Fg* mass and prior to the appearance of a weak yellowing on wheat lemma. Browning of spikelets was then observed at 72 hpi when *Tri5* expression reached its maximum. During the 72 to 96 hpi transition, the fungal mass still

increased, and the symptoms corresponded to a total browning of the inoculated spikelets. By continuing to monitor FHB progress on spikes, symptoms ultimately spread to the whole spike at 15 dpi (Figure 1c).

3.2 | Characterization of the in planta-established *Fg* proteome during the infection process

3.2.1 | Functional categories of the identified *Fg* proteins

Considering all *Fg*-inoculated wheat samples, this study identified 1,132 unique *Fg* proteins. According to the FunCatDB, proteins belonged to 19 different functional categories involving a wide range of functions (Figure S1a). The prevalent ones were “binding proteins” and “metabolism” gathering 18.1% and 14.7% of the identified proteins, respectively. Functions related to host and environment interactions accounted to nearly 6.2%, including proteins belonging to either “cell rescue, defence, and virulence” or “systemic interaction with the environment” categories. They especially involved 11 disease factors, two proteins participating to mycotoxin production (i.e., FGSG_03535 and FGSG_00071; Boenisch et al., 2017), 33 detoxification-related proteins, and two proteins controlling the hormonal regulation of plants (Table S2). About 8% of the identified proteins were of unknown function (“unclassified” category).

3.2.2 | Predicted subcellular targets of the identified *Fg* proteins

To distinguish proteins that could target plant cellular compartments from those that typically reach fungal intracellular localization, we first identified the putative secreted proteins by referring to Brown et al. (2012; Figure 2b and Table S3). One hundred seventy-three putative secreted proteins (15.3%) were evidenced, whereas 959 did not match the distinctive features of the secretion process. As compared with the 4.2% expected in the predicted whole proteome, our study shows a significant enrichment of putative secreted proteins. To gain additional information about the prediction of secretion, we grew MDC_Fg1 in a liquid culture medium containing wheat grains, and we identified all proteins released in the supernatant after removing fungal and plant tissues (exudate proteome). Among the 173 putative secreted proteins found in wheat spikes, 51 were also identified in the supernatant (Table S3). Nonsecreted proteins and putative secreted ones were submitted separately to the WoLF PSORT tools by parameterizing fungi and plant as target organisms, respectively (Figure 2b and Table S3). Cell localization was deemed “unknown” when WoLF PSORT yielded multiple predictions. For all identified proteins, a search for effector proteins using the EffectorP2.0 software evidenced 152 predicted effectors (i.e., 13.4% of all identified proteins; Figure 2b and Table S3), including 10 proteins also found in the exudate analysis.

The targets of the 173 putative secreted proteins showed three main host subcellular localization (Figure 3a). The chloroplast target was predicted for 102 proteins, including 21 putative effectors. The

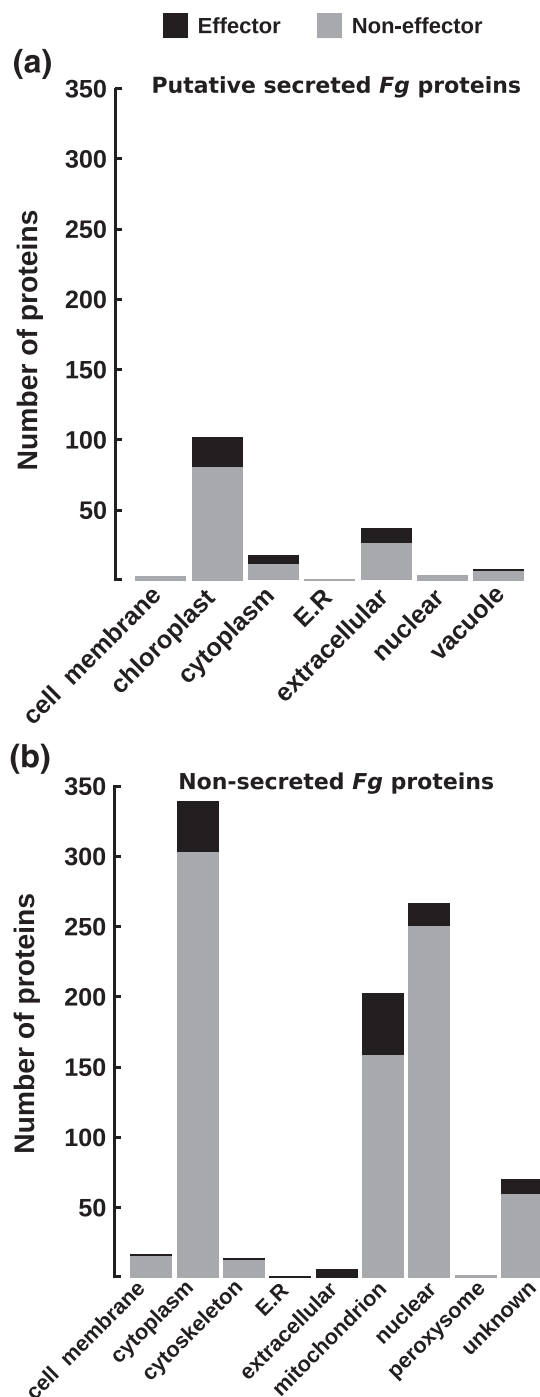


FIGURE 3 Subcellular localization and effector searches of the identified *Fusarium graminearum* proteins. Bar charts represent predicted cellular targets of putative secreted proteins (a) and nonsecreted proteins (b). Tools used for feature's prediction refers to Figure 2. In both bar charts, the proportion of putative effectors is indicated in red. ER: endoplasmic reticulum

extracellular localization, involving apoplastic proteins, was predicted for 37 proteins including 10 putative effectors, whereas cytoplasmic localization concerned 18 proteins including six putative effectors. Four proteins were predicted to reach the plant nucleus, two are glycosyl hydrolases, another is a copper amine oxidase, and the last is a peptidase; none contained a DNA-binding domain. The analysis

of nonsecreted proteins showed also that three main subcellular locations are predominant including 339 cytoplasmic proteins, 267 nuclear proteins, and 203 mitochondrial proteins (Figure 3b). Because the nondetection of any secretory features in a protein is not a sufficient criterion to exclude its possible secretion, an effector search was also performed on this protein set (Figure 3b and Table S3). This yielded 36, 16, and 44 additional putative effectors in cytoplasmic, nuclear, and mitochondrial proteins, respectively. Unknown localization concerned 70 proteins including 10 predicted effectors.

3.3 | Dynamics of the *Fg* proteome during the FHB progress

To accurately assess abundance changes in either fungal or wheat proteins, all shared peptides to both proteomes were discarded, and all proteins quantified with only one peptide were systematically removed. From the 6,728 identified proteins, 1,077 *Fg* proteins were reliably quantified. Adjustments in the *Fg* proteome were screened by assessing abundance changes in inoculated samples that occur independently of the increasing fungal biomass.

3.3.1 | Quantitative changes in the *Fg* proteome during the infection process

Three hundred twenty-one *Fg* proteins (~30% of the quantified *Fg* proteome; Figure 4a) were significantly regulated during the 96 hpi period. The magnitude of the variations ranged from 1.3-fold to 108.9-fold changes with an average of 4.8-fold. Among these regulated proteins, 49 matched with secretion features, including 21 and 2 proteins harbouring a plastid transit peptide (plastidTP) and a plant nuclear localization signal (plant NLS), respectively. Furthermore, they also included 63 proteins deemed to be predicted effectors according to EffectorP2.0 of which six harboured a plastidTP. A fuzzy C-means clustering was computed to identify specific patterns of abundance changes over the infection kinetics. Five consistent clusters (F1 to F5, Figure 5a) were evidenced gathering from 54 to 83 proteins; two contained proteins whose abundance increased over the kinetics (F1 and F5), whereas the three others depicted proteins whose abundance decreased (F2, F3, and F4). About 17% of the whole regulated proteins displayed abundance changes occurring as early as the 24 to 48 hpi transition (Cluster F3 gathering 54 proteins). The other proteins showed that abundance changes were mainly detectable from 48 to 72 hpi transition (Clusters F1, F2, and F4 gathering 207 proteins). Cluster F5 depicted large abundance changes that happened over the 48 to 96 hpi period (60 proteins).

Functional enrichment analysis was performed on each cluster using the MIPS FunCatDB. One hundred four functional annotations were found in the five clusters (Figure 5b and Table S2). Cluster F1 was enriched in proteins mainly involved in "ribosome biogenesis," "nucleic binding acid," "translation," "DNA restriction or modification," "DNA conformation modification," "RNA transport," and "chromosome condensation." Cluster F2 was enriched in proteins involved in "C-compound and carbohydrate metabolism," "nucleotide/nucleoside/

nucleobase metabolism," "metabolism of amines," and "metabolism of secondary products derived from glycine and L-serine." Cluster F4 was enriched in proteins acting in "regulation of protein activity," "protein targeting, sorting and translation," "protein/peptide degradation," "protein processing," and "protein binding." Cluster F5 was enriched in proteins involved in "electron transport and membrane-associated energy conservation," "respiration," and "energy conversion and regeneration." Proteins involved in "stress response" were primarily enriched in Clusters F3 and F4.

3.3.2 | Comparison of the in planta-established *Fg* proteome with pre-existing proteins in *Fg* spores and in germinating *Fg* spores

In this work, we also investigated the discrepancies and similarities between the in planta-established *Fg* proteins with the ones detectable specifically in spores (Sp) and in germinating spores (gSp). Proteomes identified from the isolated fungal Sp and gSp showed extensive differences with the *Fg* proteome interacting with wheat spikelets, making a quantitative analysis inappropriate. The three proteomes were compared on a qualitative basis only. Seven hundred twenty-one proteins were identified in the Sp proteome and 462 in the gSp proteome (Figure 6 and Table S3). The three proteomes shared 296 common proteins, that is, 26%, 41%, and 64% of the in planta-established, Sp, and gSp proteomes, respectively. Sp and in planta proteomes shared the largest number of identical proteins (491 proteins). Both the Sp and gSp proteomes were significantly enriched in proteins involved in ATP synthesis, in cell morphogenesis, and in translation (Table S4). The gSp proteome contained 50 putative secreted proteins that referred to Brown et al. (2012) including 22 also found in the exudate analysis (Table S3). The effector search yielded 101 putative effectors in the Sp proteome and 89 in the gSp proteome (Figure 6 and Table S3). The gSp proteome was significantly enriched in putative effectors as well as the set of proteins common to the three proteomes, which gathered 50 putative effectors. Among *Fg* genes referenced in the PHI-base and that already proved to be involved in virulence, 21, 14, and 44 matched with protein sequences found in the Sp, gSp, and in planta-established proteomes, respectively (Table S3).

3.4 | Adjustments in the wheat spike proteome during *Fg* interaction

In all wheat proteomics data aggregated, 5,596 wheat proteins were reliably quantified. Gene Ontology showed that identified proteins are expected to act in most of the subcellular components of the wheat cell (Figure S2), including primarily energy-producing organelles (mitochondrion and plastids), cytosol, nuclear components, membranes, and storage structures (vacuole). Gene ontology analysis of the total identified wheat proteins revealed an enrichment in 102 biological processes and 151 molecular functions, thus covering a wide range of cell processes (Figures S1b and S2).

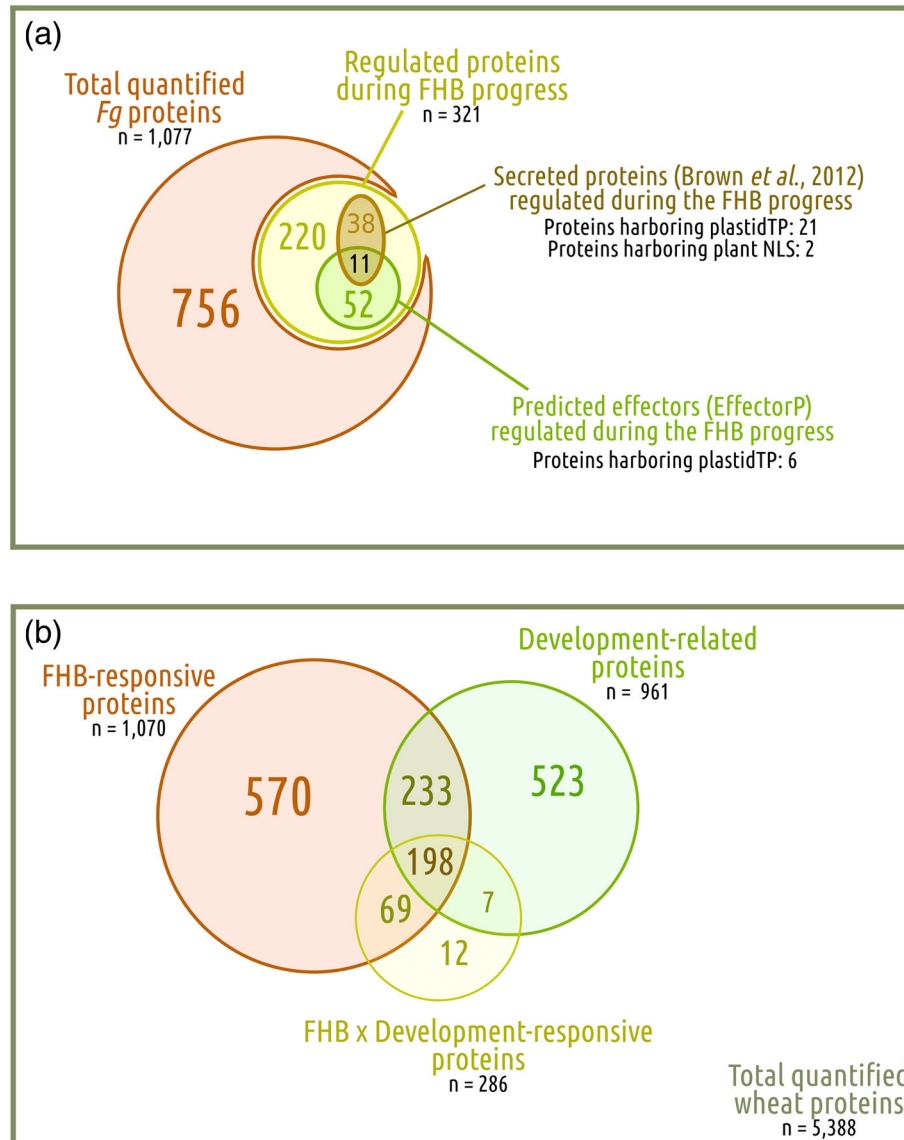


FIGURE 4 Description of analysis of variance (ANOVA) results computed for *Fusarium graminearum* and wheat proteins. (a) The Venn diagram depicts the number of significantly regulated *Fg* proteins (one-way ANOVA test, false discovery rate [FDR] < 1%, *P* value < 0.003). The number of regulated proteins displaying secretion's and effector's distinctive features is specified. PlastidTP and NLS refer to plastid transit peptide and nuclear localization signal, respectively. (b) The Venn diagram shows the number of wheat proteins whose abundance change was deemed significant for each factor of the two-way ANOVA (*Fusarium* head blight [FHB]-responsive proteins: FDR < 1%, *P* value < 0.002; development-related proteins: FDR < 1%, *P* value < 0.0018; and FHB × development-responsive proteins: FDR < 1%, *P* value < 0.0006)

To accurately make the difference between *Fg*-related effect, grain ontogeny effect, and their combination, two-way ANOVAs were computed to assess the significance of the variance specifically associated with *Fg* inoculation (FHB-responsive proteins), with grain developmental processes (development-related proteins) and with their interaction effect (FHB × development-responsive proteins). These analyses enabled a relevant categorization of proteins according to the factor(s) that guide(s) their abundance changes including (a) proteins specifically regulated during *Fg* interaction without any control from grain developmental processes (FHB-regulated proteins), (b) proteins regulated during *Fg* infection along with basal adjustments of grain development (FHB + development-regulated proteins), and (c)

proteins whose *Fg*-induced regulation depended on specific grain developmental processes (FHB × development-regulated proteins).

The two-way ANOVA evidenced 1,612 proteins deemed significant for at least one tested effect, that is, nearly 30% of the detected proteome. Considering each factor individually, 1,070 FHB-responsive proteins, 961 development-related proteins, and 286 FHB × development-responsive proteins were identified (Figure 4b). According to our categorization, these included 570 FHB-regulated proteins, 233 FHB + development-regulated proteins, and 286 FHB × development-regulated proteins (Figure 4b).

Regarding the FHB-regulated proteins, they have been split into two groups, the first one included proteins whose average abundance

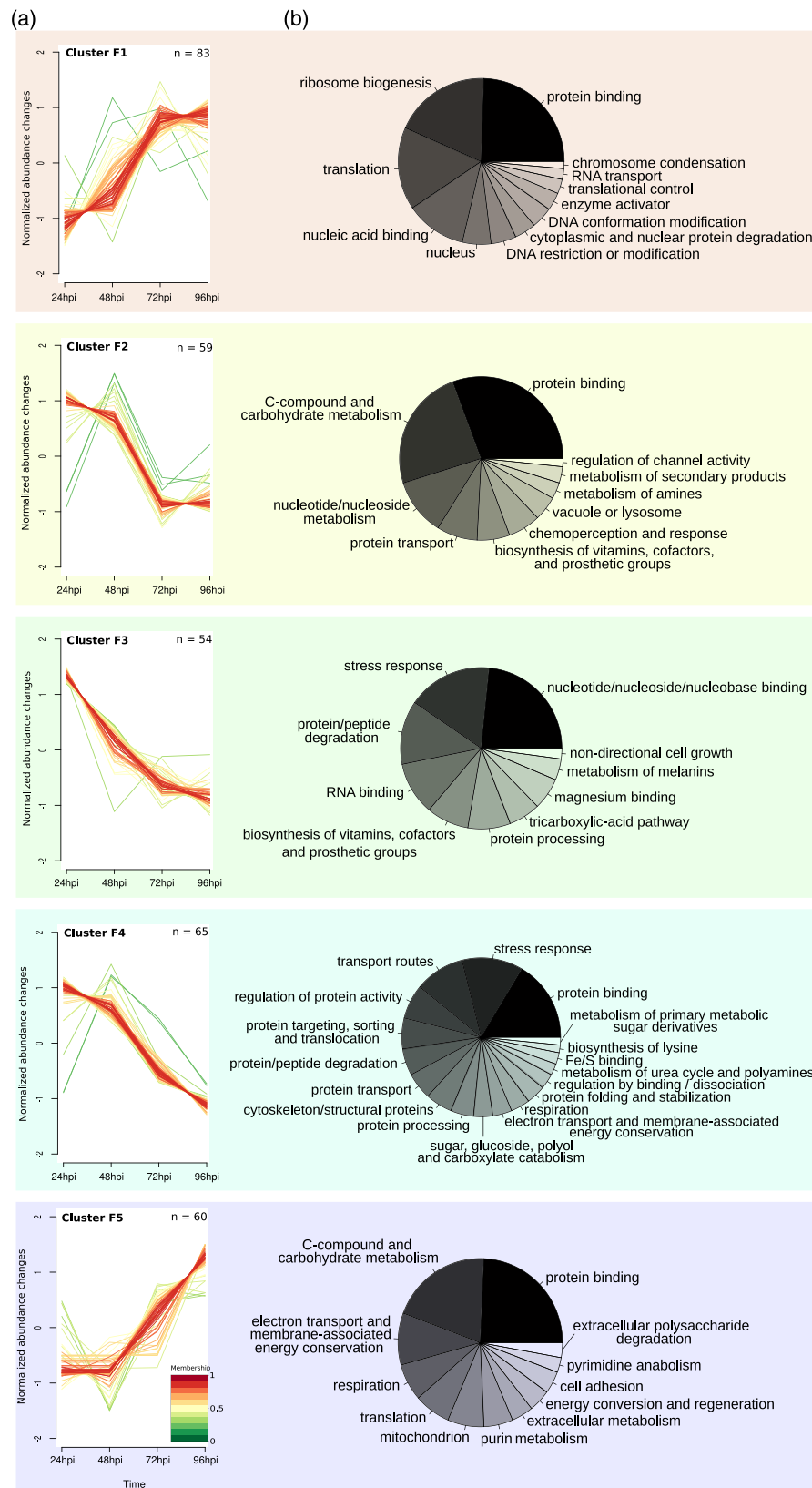


FIGURE 5 Clustering of *Fg* protein regulation patterns and functional category enrichment. Clustering (a) was computed using the fuzzy C-means methods using Z-score transformed values to identify homogeneous pattern of protein abundance changes during the 96-hr-long infection dynamics. The number of proteins included in each cluster are specified in the right upper corner (n). The cluster membership of each protein profile is indicated by a colour code from green to red. The enrichment (b) in biological processes was tested using a chi-squared test for each cluster, and significant ones are represented in the pie charts. hpi: hr postinoculation

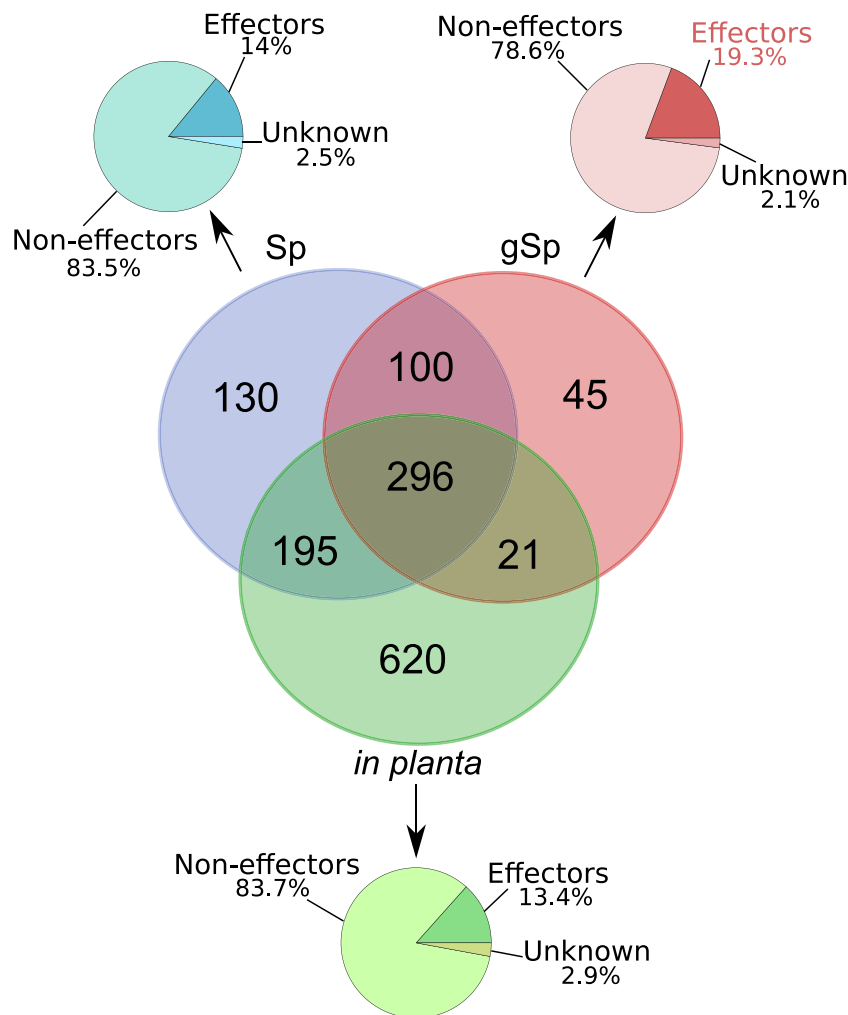


FIGURE 6 Comparison of protein identifications obtained from spore (Sp), germinating spores (gSp), and in planta fungal proteomes. The Venn diagram describes the similarities and specificity in the protein composition of the three proteomes. In blue: spores (Sp) proteome, in red: germinating spores (gSp) proteome, and in green: *Fg* proteome extracted in the wheat spikelets during *Fusarium* head blight infection. Pie charts indicate the proportion of putative effectors found in the three *Fg* proteomes; significant enrichment is depicted by a red font

was systematically lower in the *Fg*-inoculated samples as compared with the control samples, and the second group included proteins with the highest abundance systematically found in response to *Fg* inoculation (Figure 7). Functions associated with “intracellular protein transport,” “DNA repair/recombination,” “proteolysis,” “tRNA aminoacylation,” and “response to oxidative stress” were significantly enriched in the proteins of highest abundance in *Fg*-inoculated samples (Figure 7 and Table S5). FHB-down-regulated proteins gathered functions involved in energy-related processes such as “proton transmembrane transport,” “photosynthetic electron transport chain,” “photosynthesis light reaction,” and “fatty acid metabolism.” They also showed a significant enrichment in membrane, photosystem, and intracellular proteins (Figure 7 and Table S5).

Within the set of FHB + development-regulated proteins, different patterns of protein abundance variation have been observed, making their grouping according to homogeneous criteria difficult. The most relevant way was first to select the proteins showing a significant linear regression with the kinetics factor and then to compute for each protein the Spearman's rank correlations between their abundance and the kinetics factor. Using these criteria, two homogeneous groups were defined (Figure 7). The first group was typified by variation profiles combining a lower abundance upon *Fg* inoculation along with a

decreasing abundance throughout the development kinetics. This group included 47 proteins and was enriched in proteins involved in “transmembrane transport.” The second group gathered proteins combining a higher abundance upon *Fg* inoculation along with an increasing abundance throughout the development kinetics. This second group included 94 proteins and was enriched in proteins involved in “cell wall macromolecule catabolic process” and “chitin catabolic process” (Figure 7 and Table S5).

Regarding the 286 FHB × development-regulated proteins, they were enriched in functions acting in the response to pathogens such as “defence response,” “response to biotic stimulus,” and “chitin catabolic process” (Table S5). We further computed specific statistics to characterize how the spikelet ontogeny determines the response to *Fg* inoculation. All contrasts from the FHB × Development interactions were tested and showed in a hierarchical clustering (Figure 8). Combinations assessed between the earliest and the latest ontogeny stages were those of widest differences (Table S6), whereas consecutive ontogeny stages showed the most similar ones, except for the 48 versus 72 hpi comparison. The number of significant contrasts in this latter comparison was very close to those evidenced in the 24 versus 72 hpi and the 24 versus 96 hpi comparisons (Table S6), depicting that they were mainly guided by those taking place between 48 and 72 hpi

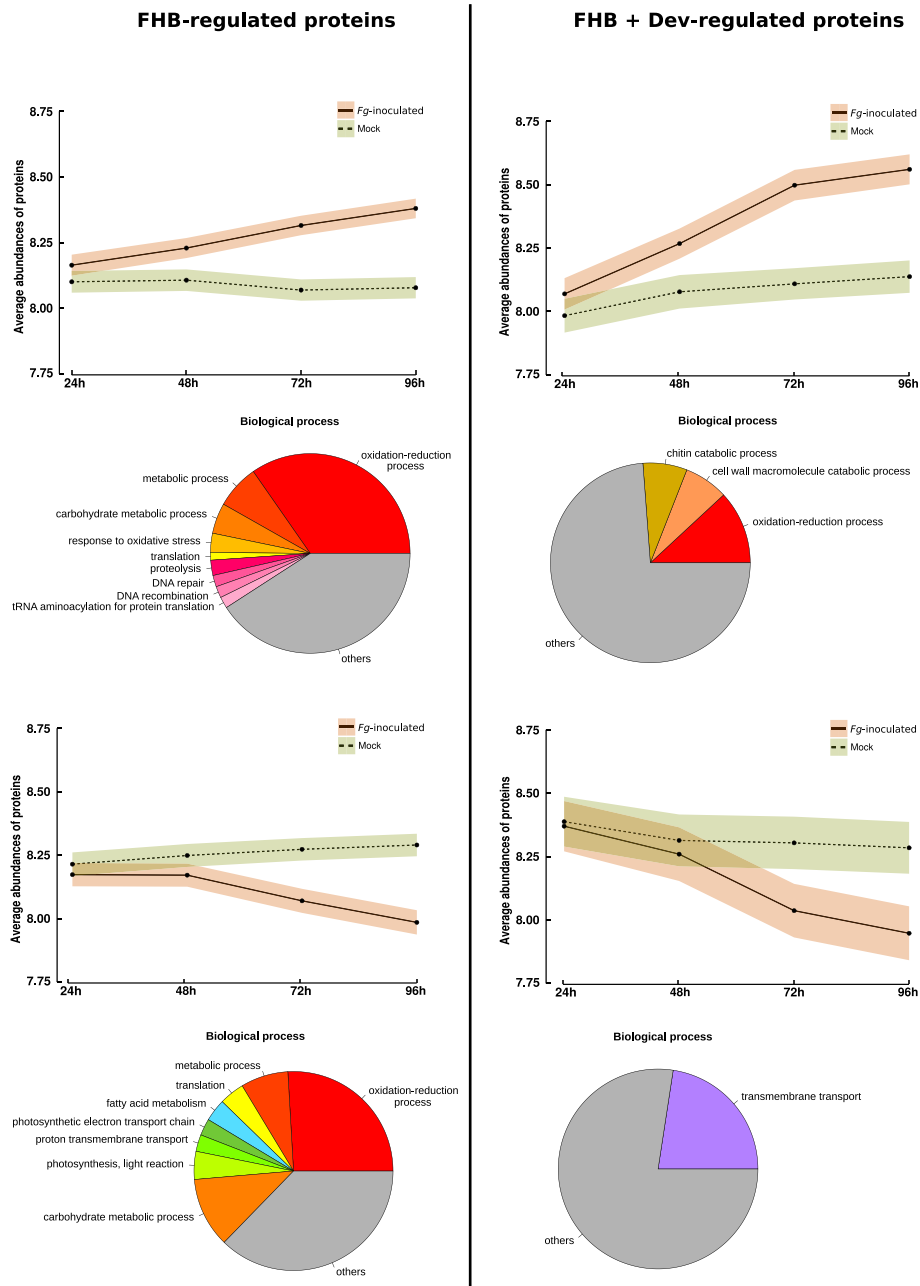


FIGURE 7 Summarized representation of wheat proteins displaying abundance increases or decreases upon *Fg* inoculation. Graphs represent the average abundance pattern of wheat proteins significantly regulated by the treatment factor and by both the treatment and development (Dev) factors. Black lines and dashed lines show the average profiles of each protein set; coloured zone around the lines represents the minimum and maximum values of protein abundance (log₂). Pie charts indicate the biological processes significantly enriched in each graphs. FHB: *Fusarium* head blight; hpi: hr postinoculation

and that FHB-responsive patterns were broadly readjusted at this transition. To identify which FHB-responsive proteins were the most influenced by spikelet ontogeny, we profiled the strongest contrasts computed between two consecutive kinetics points (i.e., 24 vs. 48 hpi, 48 vs. 72 hpi, and 72 vs. 96 hpi; Table S6). By focusing arbitrarily on the quintile strongest contrasts (58 proteins), this revealed proteins already known to be involved in plant defence, such as eight CAP–cysteine-rich secretory proteins, seven cupins, five peroxidases, three glutathione *S*-transferases, two xylanase inhibitors,

two chitinases, and a UDP-glucosyltransferase (Darwiche, Mène-Saffrané, Gfeller, Asojo, & Schneider, 2017; Pasquet et al., 2016; Sun et al., 2018; Wang et al., 2014). Other proteins belonging to carbohydrate metabolism, to enzymatic inhibition, and to signalling processes were also observed. Moreover, three proteins displayed opposite contrasts, depicting that the effect of FHB on their abundance was reversed during the time course of infection. These corresponded to two arogenate dehydratases, chloroplast proteins involved in the shikimate pathway, and a mitochondrial ribosome-recycling factor.

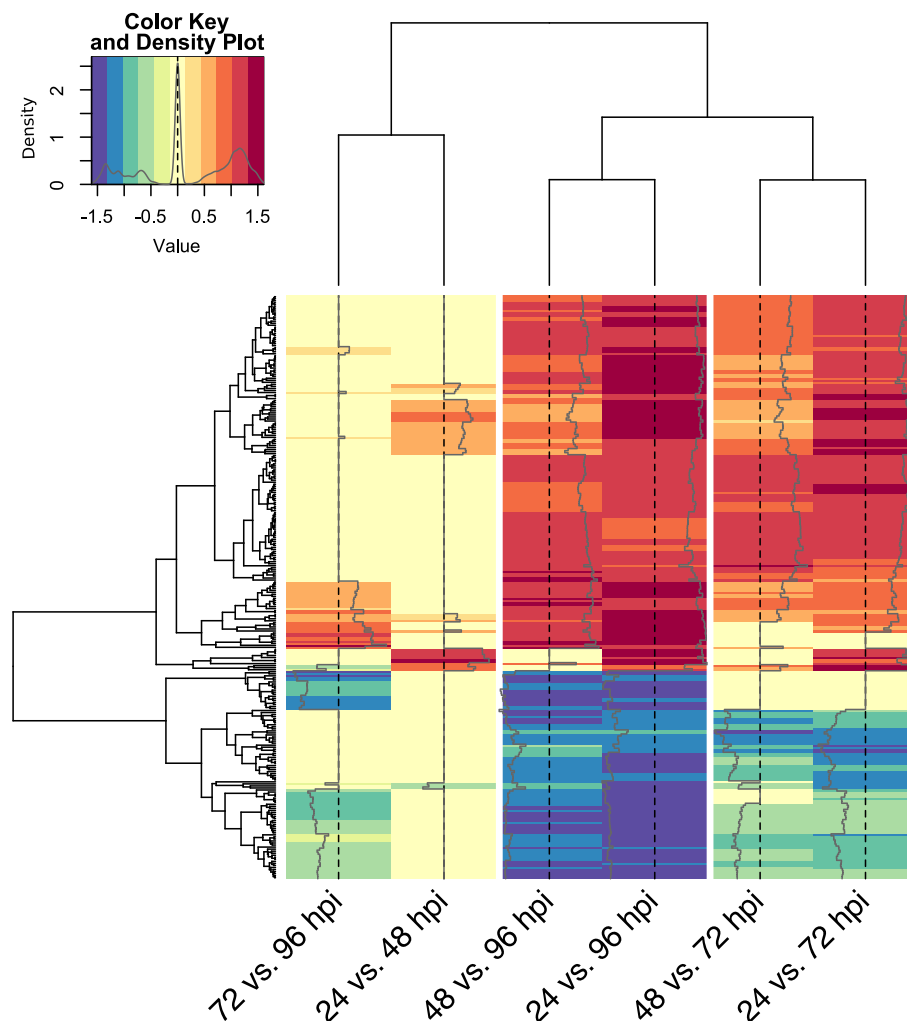


FIGURE 8 Heat map representation of the abundance changes of the *Fusarium* head blight (FHB) × development-regulated proteins in wheat spikelets. Hierarchical clustering is based on the significant contrasts of all significant order 2 interactions ($T \times D$, adjusted P value <0.05) of the two-way analysis of variance (false discovery rate $<1\%$ and P value <0.0006). For each protein, the purple and blue colours indicate that FHB-induced abundance change decreased between two kinetics points (e.g., the 24 vs. 48 hr postinoculation [hpi] column indicates the comparison between the change computed at 24 hpi and the one computed at 48 hpi). The orange and red colours indicate that FHB-induced abundance change increased between two kinetics points. Each line represents one FHB × development-regulated proteins

4 | DISCUSSION

By analysing dual proteomics, we profiled the protein components of the molecular dialogue established in the wheat-*F. graminearum* pathosystem. As shown by the late symptom appearance, the 96-hr-long dynamics corresponds to the setting up of the interaction during which a complex molecular dialogue drives the ultimate fate of the infection process (Cohen, Jacobs, & Leach, 2018). In this study, a particular emphasis was given in the search of candidate *Fg* effectors and putative wheat susceptibility factors. This was primarily probed from a fine characterization of the protein abundance dynamics during the early stages of the interaction and the identification of coregulations between *Fg* candidates and plant responses in a cultivar of extensive FHB susceptibility (Figure 9). This distinctive trait of the host has been chosen as a way to trace the expression of susceptibility factors.

4.1 | Dynamics of the wheat-*F. graminearum* dual proteome illustrates a complex molecular dialogue

The in planta dual proteomics yielded nearly 6,750 protein identifications, of which 83% belonged to wheat (5,596 proteins corresponding to 4.5% of the theoretical predicted proteome, IWGSC, 2018), and 17% belonged to *Fg* (1,132 proteins corresponding to 8% of the theoretical proteome, Cuomo et al., 2007). About 30% and 20% of *Fg* and wheat proteins, respectively, displayed abundance changes during the infection progress. Part of the FHB-responsive proteins overlapped with the development-related ones, indicating synergistic responses that combine processes involved in basal spikelet ontogeny and in FHB response. A quarter of the protein abundance changes induced by *Fg* inoculation displayed development-dependent patterns ($Fg \times$ development-regulated proteins). This emphasizes that wheat

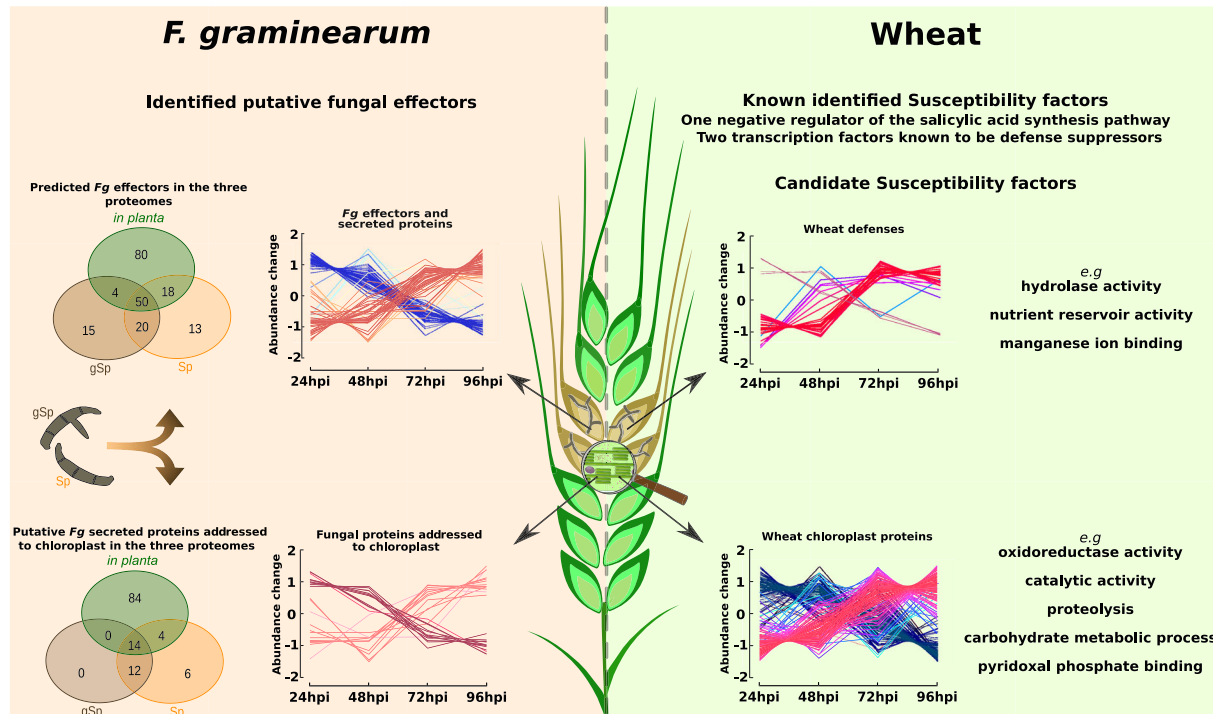


FIGURE 9 Summarized picture of the regulated patterns of putative fungal effectors and candidate wheat susceptibility factors. A summary is shown for both *Fusarium graminearum* and wheat. On *Fg* side, Venn diagrams represent the number of putative effectors and putative secreted proteins that were specific or common to the three *Fg* proteomes. Fuzzy C-means clusterings represent the protein abundance patterns computed for putative *Fg* effector and secreted proteins (upper graph), as well as for putative *Fg* proteins addressed to the wheat chloroplast (bottom graph). On wheat side, abundance patterns computed for defence-related proteins and chloroplast proteins are also represented. For each of these two wheat protein categories, main molecular functions significantly impacted by *Fg* inoculation are indicated as putative susceptibility factors to *Fusarium* head blight. Wheat spike and chloroplast pictures were obtained from <http://www.freepik.com> and <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chloroplast.svg?uselang=fr>, respectively

molecular adjustments to FHB depended on plant development or depended on the set-up of different fungal strategies to fit over the developmental processes (Figure 9). These specific patterns were mainly guided by the extensive remodelling of FHB responses between 48 and 72 hpi, corresponding to the beginning of the grain's cellularization process. Associated with the stiffening of cell walls and intense mitotic activity (Nadaud et al., 2010), this stage could be a key step in the success of the interaction. On the *Fg* side, extensive protein abundance changes were also observed at the 48 to 72 hpi transition. Such dual regulations emphasize that regulated *Fg* proteins may participate not only in the crucial mechanisms of fungal development but also in the processes that may determine the fate of the interaction by dynamically adjusting to the physiological responses of the plant.

In the context of infection, secreted and effector proteins that are regulated in *Fg* are of central interest. Secreted proteins and especially effectors are closely related to the infection success, facilitating pathogen entry into the plant host tissues, suppressing plant immune responses, and manipulating plant physiology for pathogen's benefit (Giraldo & Valent, 2013; Stergiopoulos & de Wit, 2009; Toruño, Stergiopoulos, & Coaker, 2016). Although some effectors and their functions have already been described in several plant-microbe-

interacting systems (Boller & He, 2009; Evangelisti et al., 2017), their diversity and their dynamics during infection are still unknown, especially in filamentous fungi (Alfano, 2009). In this study, one third of the regulated *Fg* proteins harbouring representative domains of effectors proved to be accumulated at specific stages of infection (Figure 9). This depicts that these proteins could be delivered by waves to achieve precise roles in the progress of the interaction, corroborating former reports dealing with other pathogens such as with *Colletotrichum higginsianum* (O'Connell et al., 2012) or *Phytophthora sojae* (Wang et al., 2011).

Effector features are still complicated to evidence because of very few conserved domains (Jones, Bertazzoni, Turo, Syme, & Hane, 2018; Sperschneider et al., 2016). One way to increase the detection of candidate effectors is the analysis of the predicted subcellular compartments the proteins are predicted to be addressed to. For instance, among all the *Fg* putative secreted proteins, four are predicted to be addressed to the plant nucleus but not predicted as effectors. Three of them were also found in the *Fg* exudates (fuGraFG1chr3G262700.1, fuGraFG1chr1G376300.1, and FGS-G_03017) and two showed significant abundance changes during the infection (fuGraFG1chr2G224300.1 and fuGraFG1chr3G262700.1). Fungal proteins can be located in the plant nucleus to drive the

success of the disease (Robin et al., 2018; Vargas et al., 2015). Such *Fg* proteins could partly explain the significant enrichment in wheat of FHB-regulated proteins involved in nucleic acid binding and in translation. For instance, they include two homologs of HvWRKY1 (TraesCS3A01G167200.1 and TraesCS3D01G173300.2), a nuclear transcription factor known to suppress defences to powdery mildew in barley (Shen et al., 2007). This consolidates the hypothesis that wheat nuclear proteins could be special targets of *Fg* effectors as a mean to shape a wide-scale control of cellular plant responses.

In this work, one of our particular findings is the convergent evidences about a relationship between the chloroplast targets and the infection success. A chloroplast transit peptide was predicted in 102 putative secreted *Fg* proteins including 21 putative effectors, and 27 showed significant abundance changes during the infection. Furthermore, 36, 26, and 31 of these proteins were identified in Sp, gSp, and exudate *Fg* proteomes, respectively. This is an interesting finding because *Fg* is supposed to colonize cereal grains (Leonard & Bushnell, 2003) where photosynthesis is not expected. A systemic spreading in the vascular system has already been observed for DON and for fungal effectors (Lievens, Houterman, & Rep, 2009; Moretti, Rossi, Ciuffo, & Turina, 2014). Likewise, *Fg* effector proteins could also be delivered in the xylem to reach particular targets in photosynthetic tissues, thus interrogating the ability of *Fg* to remotely control specific processes in leaves and stems. Chloroplasts are known to be among the most impacted organelles by pathogens as a mean to neutralize part of the plant defences (de Torres Zabala et al., 2015), and a number of chloroplast proteins are known to be direct targets of effectors, especially in viruses and bacteria pathogens (Bobik & Burch-Smith, 2015), or widely repressed 48 hr after DON application on wheat leaves (Pascovici et al., 2013). Our hypothesis is also supported by the wheat responses where chloroplast functions showed to be particularly impacted. Strong decreasing abundance was observed for proteins involved in photosynthesis and light reaction, photosynthetic electron transport chain, proton transmembrane transport, and photosystem processes over the 96-hr period. To our knowledge, no susceptibility factor has been reported in the wheat-*Fg* interaction. However, by taking advantage of the molecular data from both plant and pathogen, our results suggest that chloroplast functions in bread wheat could be one of the main FHB susceptibility factors. Although most of the previous studies have raised the possible involvement of sucrose or glucose metabolism (Chetoui et al., 2016; Erayman et al., 2015), we postulate that major regulations occur upstream through chloroplast molecular adjustments. Two homologs of known susceptibility factors that target plant chloroplasts in other pathosystems substantiate the relevance of this dual proteomics. The first corresponds to OsSSI2 (TraesCS5A01G123600.2), described in rice as a fatty acid/stearoyl-ACP desaturase and known to be a negative regulator of the salicylic acid synthesis pathway (Jiang et al., 2009). The second matches with *DMR6* (TraesCS5D01G233700.1), described as a 2-oxoglutarate-Fe(II) in *Arabidopsis thaliana*, a suppressor of plant immunity to several pathogens (van Damme, Huibers, Elberse, & van den Ackerveken, 2008; Zeilmaier et al., 2014).

4.2 | *Fg* spores accumulate a set of predicted secreted proteins and candidate effectors, which are further regulated during the infection process

In this work, 787 *Fg* proteins were identified from fungal spores (Sp and gSp). According to Brown et al.'s (2012) secretome, about 8% and 11% of the Sp and gSp proteins, respectively, are predicted to be secreted. Among these putative Sp and gSp-secreted proteins, some were also identified in the *Fg* exudate proteome strengthening the confidence in their secretion prediction. This is even more relevant when such proteins also harbour a plant-specific targeting signal. One typical example is fuGraFG1chr2G157700.1 found in the Sp and in the exudate proteomes and bearing a predicted plant NLS. This is a counterpart of the plant PR-1 proteins whose deletion of the related gene is known to reduce *Fg* virulence (Lu & Edwards, 2018). Likewise, a dozen of *Fg* putative secreted proteins found systematically in Sp, in gSp, in exudates, and in planta displayed a predicted chloroplast transit peptide. This is exemplified by fuGraFG1chr2G203100.1 harbouring a homologous domain with a tuberculosis-necrotizing toxin, known to be involved in NAD⁺ hydrolysis (Sun et al., 2015).

Focusing on predicted effectors has also yielded a number of candidates, which were regulated during the infection process and accumulated in spore proteomes. During the infection, 63 predicted effectors displayed abundance changes, corresponding to 20% of the whole set of the regulated *Fg* proteins. Among those, 25 showed to be highly abundant as early as 24 hpi, suggesting either a swift synthesis within the first 24 hr of the interaction or a former accumulation in the spore. Six of these early abundant putative effectors were already accumulated in both Sp and gSp, and four additional ones were specifically found in Sp. These candidate effectors are involved in steroid biosynthesis, in oxido-reductase activity, in electron-carrier activity, and in iron-sulphur binding, only one (fuGraFG1chr2G053400.1) has an unknown function. Steroids are known to act either antagonistically or synergistically with plant defences (Belkhadir et al., 2012), whereas oxido-reductase and electron-carrier activities could be a mean to control host energy (Bobik & Burch-Smith, 2015). Hence, our results suggest that spore effectors could target very early the host energy-related processes and the set-up of immune responses.

As a whole, the identification of several functions already shown to be involved in *Fg* virulence strengthens the value of our dataset in gathering pivotal information about the fungal molecular determinants involved in the FHB disease. This is further substantiated by other *Fg* proteins not predicted to be secreted, including three Sp and four gSp transcription factors controlling *Fg* virulence in wheat spikes (Son et al., 2011). Two of them were also found in planta and had a significant accumulation during the infection progress. Altogether, our data illustrate that virulence factors, including effectors, could be already stored in the spores, swiftly synthesized upon spore germination, and further regulated during the infection, emphasizing that spores might not be just a resistance and dissemination structure but might be also crucial determinants of pathogenicity.

5 | CONCLUSION

In conclusion, this study expands our understanding of the wheat–*F. graminearum* interaction and also provides new data about the protein content of *Fg* spores. Identifying pathogen's effectors and plant susceptibility factors is a challenging task and becomes even more complicated in complex plant tissues such as spikes, where molecular content is continuously fluctuating along with grain maturation. Now, identifying the relationship between putative effectors and candidate susceptibility factors will be one additional ambitious work to understand the determinism of pathogen manipulation in plants, requiring functional validations and experimental evidences of molecular interactions between putative *Fg* effectors and candidate wheat susceptibility factors.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledged Dr Marie-Laure Martin-Magniette from the Applied Mathematics and Computer Research Unit for her very helpful advice on the contrast test procedure. We also thank Tarek Alouane, David Lopez, and Hélène Rimbert for their help in bioinformatics. We also acknowledge Christophe Chambon from the PFEM platform for exudate proteomics.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T. L. and L. B. designed the research; F. F., S. U., and L. B. performed the proteomic measurements; F. F., M. V., and L. B. analysed the data and prepared the figures; L. B. conceived and performed the modelling; and F. F. and L. B. wrote the paper.

FUNDING INFORMATION

This research and FF PhD grant were funded by the Region Auvergne-Rhône-Alpes and the FEDER supports ("Nouveau Chercheur 2016" program).

DATA AVAILABILITY

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaino et al., 2016) partner repository with the dataset identifier PXD010593.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

ORCID

Ludovic Bonhomme  <https://orcid.org/0000-0001-9410-0827>

REFERENCES

- Alfano, J. R. (2009). Roadmap for future research on plant pathogen effectors: Micro-review. *Molecular Plant Pathology*, 10, 805–813. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00588.x>
- Alouane, T., Rimbert, H., Fabre, F., Cambon, F., Langin, T., & Bonhomme, L. (2018). Genome sequence of *Fusarium graminearum* strain MDC_Fg1, isolated from bread wheat grown in France. *Microbiology Resource Announcements*, 7, e01260–18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01260-18>
- Belkhadir, Y., Jaillais, Y., Epple, P., Balsemao-Pires, E., Dangl, J. L., & Chory, J. (2012). Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 297–302.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, B*, 57, 289–300.
- Benjamini, Y., & Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics*, 29, 1165–1188.
- Bobik, K., & Burch-Smith, T. (2015). Chloroplast signaling within, between and beyond cells. *Frontiers in Plant Science*, 6, 781.
- Boenisch, M. J., Broz, K. L., Purvine, S. O., Chrisler, W. B., Nicora, C. D., Connolly, L. R., ... Kistler, H. C. (2017). Structural reorganization of the fungal endoplasmic reticulum upon induction of mycotoxin biosynthesis. *Scientific Reports*, 7, 44296. <https://doi.org/10.1038/srep44296>
- Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Sciences*, 324, 742–744. <https://doi.org/10.1126/science.1171647>
- Bonhomme, L., Valot, B., Tardieu, F., & Zivy, M. (2012). Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, 957–972. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015867>
- Bönnighausen, J., Schauer, N., Schäfer, W., & Bormann, J. (2018). Metabolic profiling of wheat rachis node infection by *Fusarium graminearum*—Decoding deoxynivalenol-dependent susceptibility. *New Phytologist*, 221, 459–469.
- Boussardon, C., Martin-Magniette, M.-L., Godin, B., Benamar, A., Vittrant, B., Citerne, S., ... Budar, F. (2018). Novel cytonuclear combinations modify *Arabidopsis* seed physiology and vigor. *Frontiers in Plant Science*, 10, 32. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00032>
- Brown, N. A., Antoniw, J., & Hammond-Kosack, K. E. (2012). The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: A refined comparative analysis. *PLoS ONE*, 7(4), e33731.
- Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., ... Kroj, T. (2013). The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *The Plant Cell*, 25, 1463–1481. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107201>
- Chetoui, C., Bonhomme, L., Lasserre-Zuber, P., Cambon, F., Pelletier, S., Renou, J.-P., & Langin, T. (2016). Transcriptome dynamics of a susceptible wheat upon *Fusarium* head blight reveals that molecular responses to *Fusarium graminearum* infection fit over the grain development processes. *Functional & Integrative Genomics*, 16, 183–201. <https://doi.org/10.1007/s10142-016-0476-1>
- Chetoui, C., Bonhomme, L., Lecomte, P., Cambon, F., Merlino, M., Biron, D. G., & Langin, T. (2015). A proteomics survey on wheat susceptibility to *Fusarium* head blight during grain development. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 407–418. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0552-0>
- Cohen, S. P., Jacobs, J. M., & Leach, J. E. (2018). In planta bacterial transcriptomics predict plant disease outcomes. *Trends in Plant Science*, 23, 751–753. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.06.008>
- Cuomo, C. A., Guldener, U., Xu, J.-R., Trail, F., Turgeon, B. G., di Pietro, A., ... Kistler, H. C. (2007). The *Fusarium graminearum* genome reveals a

- link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317, 1400–1402. <https://doi.org/10.1126/science.1143708>
- van Damme, M., Huibers, R. P., Elberse, J., & van den Ackerveken, G. (2008). *Arabidopsis* DMR6 encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. *The Plant Journal*, 54, 785–793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03427.x>
- Darwiche, R., Mène-Saffrané, L., Gfeller, D., Asojo, O. A., & Schneiter, R. (2017). The pathogen-related yeast protein Pry1, a member of the CAP protein superfamily, is a fatty acid-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 292, 8304–8314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781880>
- Dhokane, D., Karre, S., Kushalappa, A. C., & McCartney, C. (2016). Integrated metabolo-transcriptomics reveals *Fusarium* head blight candidate resistance genes in wheat QTL-*Fhb2*. *PLoS ONE*, 11(5), e0155851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155851>
- Ding, L., Xu, H., Yi, H., Yang, L., Kong, Z., Zhang, L., ... Ma, Z. (2011). Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS ONE*, 6(4), e19008.
- Dornez, E., Croes, E., Gebruers, K., Carpentier, S., Swennen, R., Laukens, K., ... Courtin, C. M. (2010). 2-D DIGE reveals changes in wheat xylanase inhibitor protein families due to *Fusarium graminearum* Δ Tri5 infection and grain development. *Proteomics*, 10, 2303–2319. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900493>
- Eggert, K., & Pawelzik, E. (2011). Proteome analysis of *Fusarium* head blight in grains of naked barley (*Hordeum vulgare* subsp. *nudum*). *Proteomics*, 11, 972–985. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000322>
- Erayman, M., Turktas, M., Akdogan, G., Gurkok, T., Inal, B., Ishakoglu, E., ... Unver, T. (2015). Transcriptome analysis of wheat inoculated with *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–17.
- Evangelisti, E., Gogleva, A., Hainaux, T., Doumane, M., Tulin, F., Quan, C., ... Schornack, S. (2017). Time-resolved dual transcriptomics reveal early induced *Nicotiana benthamiana* root genes and conserved infection-promoting *Phytophthora palmivora* effectors. *BMC Biology*, 15, 1–24.
- Friesen, T. L., Zhang, Z., Solomon, P. S., Oliver, R. P., & Faris, J. D. (2008). Characterization of the interaction of a novel *Stagonospora nodorum* host-selective toxin with a wheat susceptibility gene. *Plant Physiology*, 146, 682–693. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108761>
- Giraldo, M. C., & Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 800–814. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3119>
- Goswami, R. S., & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515–525. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x>
- Gottwald, S., Samans, B., Lück, S., & Friedt, W. (2012). Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: Two essential mechanisms of *Fusarium* head blight resistance in wheat? *BMC Genomics*, 13, 369. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-369>
- Gunnaiah, R., & Kushalappa, A. C. (2014). Metabolomics deciphers the host resistance mechanisms in wheat cultivar Sumai-3, against trichothecene producing and non-producing isolates of *Fusarium graminearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.07.002>
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S., & 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(7), e40695.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35, 585–587.
- Ilgen, P., Haderler, B., Maier, F. J., & Schäfer, W. (2009). Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 899–908. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0899>
- International Wheat Genome Sequencing Consortium. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361, eaar7191.
- Jiang, C.-J., Shimono, M., Maeda, S., Inoue, H., Mori, M., Hasegawa, M., ... Takatsui, H. (2009). Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene *OsSSI2* enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 820–829. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0820>
- Jones, D. A., Bertazzoni, S., Turo, C. J., Syme, R. A., & Hane, J. K. (2018). Bioinformatic prediction of plant-pathogenicity effector proteins of fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.017>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jørgensen, I. H. (1992). Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 63, 141–152. <https://doi.org/10.1007/BF00023919>
- Kumar, L., & Futschik, M. E. (2007). Mfuzz: A software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics*, 2, 5–7. <https://doi.org/10.6026/97320630002005>
- Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., & Zivy, M. (2017). X!TandemPipeline: A tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification. *Journal of Proteome Research*, 16, 494–503. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00632>
- Lapin, D., & van den Ackerveken, G. (2013). Susceptibility to plant disease: More than a failure of host immunity. *Trends in Plant Science*, 18, 546–554. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.005>
- Leonard, K. J., & Bushnell, W. R. (2003). *Fusarium head blight of wheat and barley*. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press).
- Li, X., Zhong, S., Chen, W., Fatima, S. A., Huang, Q., Li, Q., ... Luo, P. (2018). Transcriptome analysis identifies a 140 kb region of chromosome 3B containing genes specific to *Fusarium* head blight resistance in wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 852. <https://doi.org/10.3390/ijms19030852>
- Lievens, B., Houterman, P. M., & Rep, M. (2009). Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. *FEMS Microbiology Letters*, 300, 201–215. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x>
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., ... Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 513–545.
- Lu, S., & Edwards, M. C. (2018). Molecular characterization and functional analysis of PR-1-like proteins identified from the wheat head blight fungus *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 108, 510–520. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-17-0268-R>
- Ma, H.-X., Bai, G.-H., Gill, B. S., & Hart, L. P. (2006). Deletion of a chromosome arm altered wheat resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in Chinese spring. *Plant Disease*, 90, 1545–1549. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1545>
- Maghames, C. M., Lobato-Gil, S., Perrin, A., Trauchesse, H., Rodriguez, M. S., Urbach, S., ... Xirodimas, D. P. (2018). NEDDylation promotes

- nuclear protein aggregation and protects the ubiquitin proteasome system upon proteotoxic stress. *Nature Communications*, 9, 4376. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06365-0>
- Masci, S., Laino, P., Janni, M., Botticella, E., Di Carli, M., Benvenuto, E., ... D'Ovidio, R. (2015). Analysis of quality-related parameters in mature kernels of polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) transgenic bread wheat infected with *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3962–3969. <https://doi.org/10.1021/jf506003t>
- McQuitty, L. L. (1966). Similarity analysis by reciprocal pairs for discrete and continuous data. *Educational and Psychological Measurement*, 26, 825–831. <https://doi.org/10.1177/001316446602600402>
- Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., ... Finn, R. D. (2015). The InterPro protein families database: The classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research*, 43, 213–221.
- Moretti, M., Rossi, M., Ciuffo, M., & Turina, M. (2014). Functional characterization of the three mitogen-activated protein kinase kinases (MAP2Ks) present in the *Cryphonectria parasitica* genome reveals the necessity of Cpkk1 and Cpkk2, but not Cpkk3, for pathogenesis on chestnut (*Castanea* spp.). *Molecular Plant Pathology*, 15, 500–512. <https://doi.org/10.1111/mpp.12111>
- Nadaud, I., Girousse, C., Debiton, C., Chambon, C., Bouzidi, M. F., Martre, P., & Branlard, G. (2010). Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. *Proteomics*, 10, 2901–2910. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900792>
- Nejat, N., Rookes, J., Mantri, N. L., & Cahill, D. M. (2017). Plant-pathogen interactions: Toward development of next-generation disease-resistant plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37, 229–237. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1134437>
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198, 249–266. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x>
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., ... Vaillancourt, L. J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44, 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/ng.2372>
- Pan, Y., Liu, Z., Rocheleau, H., Fauteux, F., Wang, Y., McCartney, C., & Ouellet, T. (2018). Transcriptome dynamics associated with resistance and susceptibility against *Fusarium* head blight in four wheat genotypes. *BMC Genomics*, 19, 642. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5012-3>
- Pascovici, D., Gardiner, D. M., Song, X., Breen, E., Solomon, P. S., Keighley, T., & Molloy, M. P. (2013). Coverage and consistency: Bioinformatics aspects of the analysis of multirun iTRAQ experiments with wheat leaves. *Journal of Proteome Research*, 12, 4870–4881. <https://doi.org/10.1021/pr400531y>
- Pasquet, J.-C., Changenet, V., Macadré, C., Boex-Fontvieille, E., Soulhat, C., Bouchabké-Coussa, O., ... Dufresne, M. (2016). A *Brachypodium* UDP-glycosyltransferase confers root tolerance to deoxynivalenol and resistance to *Fusarium* infection. *Plant Physiology*, 172, 559–574. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00371>
- Peyraud, R., Dubiella, U., Barbacci, A., Genin, S., Raffaele, S., & Roby, D. (2017). Advances on plant-pathogen interactions from molecular toward systems biology perspectives. *The Plant Journal*, 90, 720–737. <https://doi.org/10.1111/tpj.13429>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 45e–45e. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Puri, K. D., Yan, C., Leng, Y., & Zhong, S. (2016). RNA-Seq revealed differences in transcriptomes between 3ADON and 15ADON populations of *Fusarium graminearum* in vitro and in planta. *PLoS ONE*, 11(10), e0163803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163803>
- Robin, G. P., Kleemann, J., Neumann, U., Cabre, L., Dallery, J.-F., Lapalu, N., & O'Connell, R. J. (2018). Subcellular localization screening of *Colletotrichum higginsianum* effector candidates identifies fungal proteins targeted to plant peroxisomes, Golgi bodies, and microtubules. *Frontiers in Plant Science*, 9, 562. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00562>
- Salcedo, A., Rutter, W., Wang, S., Akhunova, A., Bolus, S., Chao, S., ... Akhunov, E. (2017). Variation in the *AvrSr35* gene determines *Sr35* resistance against wheat stem rust race *Ug99*. *Science*, 358, 1604–1606. <https://doi.org/10.1126/science.aao7294>
- van Schie, C. C. N., & Takken, F. L. W. (2014). Susceptibility genes 101: How to be a good host. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 551–581. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854>
- Shen, Q. H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., ... Schulze-Lefert, P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science*, 315, 1098–1103. <https://doi.org/10.1126/science.1136372>
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., ... Mann, M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 14440–14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14440>
- Son, H., Seo, Y.-S., Min, K., Park, A. R., Lee, J., Jin, J.-M., ... Lee, Y.-W. (2011). A phenome-based functional analysis of transcription factors in the cereal head blight fungus, *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002310. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002310>
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular Plant Pathology*, 19(9), 2094–2110. <https://doi.org/10.1111/mpp.12682>
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Dodds, P. N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K. B., ... Taylor, J. M. (2016). EffectorP: Predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist*, 210, 743–761. <https://doi.org/10.1111/nph.13794>
- Staskawicz, B. J. (2001). Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology*, 125, 73–76. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.73>
- Steiner, B., Buerstmayr, M., Michel, S., Schweiger, W., Lemmens, M., & Buerstmayr, H. (2017). Breeding strategies and advances in line selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Tropical Plant Pathology*, 42, 165–174. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0127-7>
- Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 233–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
- Sun, J., Siroy, A., Lokareddy, R. K., Speer, A., Doornbos, K. S., Cingolani, G., & Niederweis, M. (2015). The tuberculosis necrotizing toxin kills macrophages by hydrolyzing NAD. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22, 672–678. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3064>
- Sun, R.-J., Xu, Y., Hou, C.-X., Zhan, Y.-H., Liu, M.-Q., & Weng, X.-Y. (2018). Expression and characteristics of rice xylanase inhibitor OsXIP, a member of a new class of antifungal proteins. *Biologia Plantarum*, 62, 569–578. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0787-2>
- Thatcher, L. F., Gardiner, D. M., Kazan, K., & Manners, J. M. (2012). A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25, 180–190. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-11-0212>
- de Torres Zabala, M., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., ... Grant, M. (2015). Chloroplasts play a central role in plant

- defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature Plants*, 1, 15074. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.74>
- Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., & Coaker, G. (2016). Plant–pathogen effectors: Cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology*, 54, 419–441. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100204>
- Urban, M., Cuzick, A., Rutherford, K., Irvine, A., Pedro, H., Pant, R., ... Hammond-Kosack, K. E. (2017). PHI-base: A new interface and further additions for the multi-species pathogen–host interactions database. *Nucleic Acids Research*, 45, D604–D610. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1089>
- Valot, B., Langella, O., Nano, E., & Zivy, M. (2011). MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics*, 11, 3572–3577. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100120>
- Vargas, W. A., Sanz-Martín, J. M., Rech, G. E., Armijos-Jaramillo, V. D., Rivera, L. P., Echeverría, M. M., ... Sukno, S. A. (2015). A fungal effector with host nuclear localization and DNA-binding properties is required for maize anthracnose development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29, 83–95.
- Vizcaino, J. A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dienes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., ... Hermjakob, H. (2016). 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Research*, 44, 447–456.
- Voigt, C. A., Schäfer, W., & Salomon, S. (2005). A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal*, 42, 364–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02377.x>
- Wang, Q., Han, C., Ferreira, A. O., Yu, X., Ye, W., Tripathy, S., ... Wang, Y. (2011). Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. *The Plant Cell*, 23, 2064–2086. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.086082>
- Wang, X., Zhang, H., Gao, Y., Sun, G., Zhang, W., & Qiu, L. (2014). A comprehensive analysis of the Cupin gene family in soybean (*Glycine max*). *PLoS ONE*, 9, e110092–e110092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110092>
- Xu, X., & Nicholson, P. (2009). Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 83–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081737>
- Zeilmaker, T., Ludwig, N. R., Elberse, J., Seidl, M. F., Berke, L., van Doorn, A., ... van den Ackerveken, G. (2014). DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 81, 210–222.
- Zhang, X., Fu, J., Hiromasa, Y., Pan, H., & Bai, G. (2013). Differentially expressed proteins associated with *Fusarium* head blight resistance in wheat. *PLoS ONE*, 8(12), e82079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082079>
- Zhou, W., Eudes, F., & Laroche, A. (2006). Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics*, 6, 4599–4609. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600052>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Data S1. Supplementary Materials and Methods

Figure S1. Functional categories of *Fg* and wheat proteomes.

Figure S2. Subcellular localization and molecular functions of wheat proteins.

Table S1. Primers used for RT-qPCR.

Table S2. Functional annotation of wheat and *Fg* proteins.

Table S3. Table summarizing bioinformatics analyses of *Fg* proteins identified in spores, germinating spores and *in planta*.

Table S4. Gene ontology enrichment of spore and germinating spore proteins.

Table S5. Gene ontology results and enrichment of wheat proteins.

Table S6. Table summarizing the wheat protein abundance contrasts and the corresponding gene ontology enrichment.

How to cite this article: Fabre F, Vignassa M, Urbach S, Langin T, Bonhomme L. Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving *Fusarium* head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism. *Plant Cell Environ*. 2019;42:2291–2308. <https://doi.org/10.1111/pce.13549>

Conclusion

L'objectif de cette première partie était d'établir la première cartographie fine des événements moléculaires précoces établis lors de la fusariose de l'épi afin d'identifier des effecteurs fongiques impliqués dans la manipulation parasitaire et des facteurs de sensibilité du blé impliqués dans le succès de la maladie. L'observation des ajustements simultanés dans les protéomes végétal et fongique au cours des 96 premières heures de l'interaction a permis de visualiser une profonde modification des deux protéomes lors de la transition 48 – 72 hpi, complétant ainsi notre connaissance du pathosystème qui n'avait jusqu'à présent été étudié que sur des stades beaucoup plus tardifs du développement de la maladie (Chetouhi *et al.*, 2014 ; Dornez *et al.*, 2010 ; Gunnaiah *et al.*, 2012). D'autre part, la variation d'abondance des protéines fongiques lors de cette transition semble indiquer que les effecteurs fongiques sont exprimés par vagues et qu'ils ont un rôle précis à des moments spécifiques de l'interaction, ce qui sous-entend que la stratégie fongique s'ajuste de manière dynamique au contexte du développement du grain. Parmi ces effecteurs, certains se sont révélés être accumulés rapidement au cours de l'interaction tandis que d'autres étaient déjà stockés dans les spores du champignon suggérant que la spore pourrait ne pas seulement être une structure de résistance et de dissémination, mais qu'elle pourrait également être une structure d'infection. Un autre résultat majeur de cette étude concerne la surreprésentation de motifs d'adressage chloroplastique retrouvée au niveau des séquences protéiques des effecteurs. Les fortes variations d'abondance de ces protéines fongiques, couplées à celles observées des protéines chloroplastiques suggèrent que cet organelle pourrait être une des cibles principales des effecteurs fongiques et un élément clé du processus de manipulation parasitaire. Les fonctions du chloroplaste semblent ainsi être l'un des principaux facteurs de sensibilité du blé tendre à la fusariose de l'épi.

Une des principales limites concernant cette étude est qu'elle ne tient pas compte de la diversité génétique du blé ni de celle de *Fusarium graminearum*. En effet, l'exploration du dialogue moléculaire présentée au cours de cet objectif a été réalisée lors de l'interaction entre une souche agressive (*i.e.* MDC_Fg1) et un cultivar de blé sensible au FHB (*i.e.* Récital) afin de maximiser les chances de détection des effecteurs fongiques et des facteurs de sensibilité impliqués dans le

développement de la maladie. L'utilisation de plusieurs cultivars de blé tendre et de plusieurs souches de *F. graminearum*, pourrait ainsi permettre l'identification des acteurs moléculaires spécifiques aux fonds génétiques expliquant les différences de sensibilité et d'agressivité observées.

Chapitre II – Impact des fonds génétiques de l’agent pathogène et de l’hôte sur le déterminisme de la maladie

Introduction

Dans le cas de la fusariose de l’épi, la compréhension des spécificités moléculaires permettant de discriminer différentes souches et cultivars de blé d’agressivité et de sensibilité contrastées pourrait apporter des informations originales sur les acteurs protéiques participant au succès de la maladie. En effet, il est non seulement établi que les souches de *Fusarium graminearum* ne sont pas toutes identiques dans leur capacité à induire une maladie (Carter *et al.*, 2000 ; Goswami and Kistler, 2005 ; Malbrán *et al.*, 2012 ; Talas *et al.*, 2012 ; Xue *et al.*, 2004), mais également que les différentes variétés de blé tendre possèdent des niveaux de « tolérance » plus ou moins marqués lors de leur interaction avec l’agent pathogène (Fall *et al.*, 2019 ; Gervais *et al.*, 2003 ; Steiner *et al.*, 2019 ; Zhu *et al.*, 2019). La description de la diversité génétique parmi les isolats de *F. graminearum* dans le but de comprendre les liens entre spécificité génomique et agressivité a fait l’objet d’un grand nombre de publications (Bai and Shanner, 1996 ; Carter *et al.*, 2000 ; Garmendia *et al.*, 2018 ; Goswami and Kistler, 2005 ; Shin *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2011b) qui ont, pour certaines d’entre elles, clairement montré que l’agressivité de *Fusarium graminearum* était une caractéristique intrinsèque de la souche (Goswami and Kistler, 2005 ; Shin *et al.*, 2018 ; Xue *et al.*, 2004). Plus récemment, les récents travaux de thèse de Tarek Alouane, menés au sein de l’équipe MDC, ont également montré l’existence d’une variabilité génétique chez différentes souches de *Fusarium graminearum* présentant une agressivité plus ou moins marquée (Alouane *et al.* en préparation). L’ensemble de ces observations bibliographiques ouvrent ainsi de nouvelles pistes pour compléter nos connaissances sur le dialogue moléculaire impliqué dans le succès de la maladie *via* le rôle des gènes spécifiques aux souches et/ou aux différents cultivars de blé identifiés au sein des différents génomes. Afin de mieux appréhender les spécificités moléculaires impliquées dans l’agressivité de *F. graminearum* et dans la sensibilité du blé tendre à la maladie, nous avons étudié simultanément les dual-protéomes établis lors de l’interaction entre trois cultivars de blé de sensibilité contrastée inoculés avec trois souches fongiques présentant différents degrés d’agressivité lors d’expérimentation au champ.

La première étape consistait à comprendre les mécanismes impliqués dans le déterminisme de l'agressivité des souches *via* l'analyse de trois paramètres classiquement utilisés pour le phénotypage de *F. graminearum*, (i) l'analyse de la sévérité des symptômes induits par chacune des souches sur les trois fonds génétiques de blé, (ii) le développement de la masse fongique à l'intérieur des épis et (iii) la production instantanée des DON par nos trois souches en fonction du cultivar de blé infecté. Les résultats obtenus lors de ce phénotypage ont ainsi permis de valider le gradient d'agressivité de nos souches observé lors de précédentes expérimentations. Conjointement à la caractérisation phénotypique des différents traits d'agressivité du champignon, l'analyse exploratoire du dual-protéome mise au point lors du premier objectif a été réalisée afin d'identifier les spécificités moléculaires établies lors de l'interaction entre les différents fonds génétiques à la fois dans la composante fongique et végétale du dual-protéome. Cette analyse a été réalisée à 72 hpi qui, lors du premier objectif, s'est révélé être un point de cinétique au cours duquel avait été identifiée une importante covariation des protéomes des deux protagonistes. Un intérêt particulier a été consacré à la recherche des facteurs expliquant les variances observées dans les abondances des protéines fongiques et végétales afin d'identifier les événements moléculaires spécifiques aux fonds génétiques permettant d'expliquer les différences d'agressivité et de sensibilité observées. L'intégration de l'ensemble de ces données permettra d'initier la reconstruction des réseaux de régulation mis en œuvre dans les différents contextes d'agressivité et de sensibilité en établissant les connexions possibles entre la sensibilité de la plante et les effecteurs fongiques exprimés au même stade ontogénique. Outre l'apport de nouvelles connaissances sur le pathosystème, la compréhension des mécanismes spécifiques et génériques impliqués dans la création d'un état de sensibilité à la fusariose de l'épi servira comme base de réflexion sur leur réelle valeur pour des applications futures plus appliquées.

Axe 1 – Analyse du déterminisme de l’agressivité de *Fusarium graminearum* en interaction avec le blé tendre

Article 2 – Unbalanced roles of fungal aggressiveness and host cultivars in the establishment of the Fusarium head blight in bread wheat



Unbalanced Roles of Fungal Aggressiveness and Host Cultivars in the Establishment of the Fusarium Head Blight in Bread Wheat

Francis Fabre¹, Joerg Bormann², Serge Urbach³, Sylvie Roche⁴, Thierry Langin¹ and Ludovic Bonhomme^{1*}

¹ Université Clermont Auvergne, INRAE, UMR 1095 Genetics, Diversity and Ecophysiology of Cereals, Clermont-Ferrand, France, ² Department of Molecular Phytopathology, Institute of Plant Science and Microbiology, University of Hamburg, Hamburg, Germany, ³ Functional Proteomics Platform, Institute of Functional Genomics, CNRS UMR 5203 INSERM U661, Montpellier, France, ⁴ INRAE, Unité Expérimentale 1375, Phénotypage au Champs des Céréales (PHACC), Clermont-Ferrand, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Fred Asiegbo,
University of Helsinki, Finland

Reviewed by:

Therese Ouellet,
Agriculture and Agri-Food Canada
(AAFC), Canada
Thomas Miedaner,
University of Hohenheim, Germany
Christina Cowger,
Plant Science Research Unit
(USDA-ARS), United States

*Correspondence:

Ludovic Bonhomme
ludovic.bonhomme@inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 30 August 2019

Accepted: 25 November 2019

Published: 11 December 2019

Citation:

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

Fusarium head blight (FHB), caused mainly by *Fusarium graminearum*, is the foremost destructive disease of cereals worldwide. Effector-like molecules produced by *F. graminearum* play key roles in the infection process and are assumed to be one of the essential components of the pathogen's aggressiveness. However, their nature and role in the disease are still largely misunderstood. As a mean to provide relevant information about the molecular determinism of *F. graminearum* aggressiveness, we surveyed three *F. graminearum* strains on three wheat cultivars contrasted by their susceptibility to FHB. *F. graminearum* strains revealed large differences in aggressiveness which were mostly unchanged when facing hosts of contrasted susceptibility, suggesting that their behavior rely on intrinsic determinants. Surveying the fungal mass progress and the mycotoxin production rate in the spikes did not evidence any simple relationship with aggressiveness differences, while clues were found through a qualitative and quantitative characterization of the three strain proteomes established *in planta* especially with regards to early synthesized putative effectors. Independently of the wheat cultivar, the three *F. graminearum* strains produced systematically the same protein set during the infection but substantial differences in their abundance enabled the categorization of fungal aggressiveness. Overall, our findings show that the contrasts in *F. graminearum* aggressiveness were not based on the existence of strain-specific molecules but rather on the ability of the strain to ensure their sufficient accumulation. Protein abundance variance was mostly driven by the strain genetics and part was also influenced by the host cultivar but strain by cultivar interactions were marginally detected, depicting that strain-specific protein accumulations did not depend on the host cultivar. All these data provide new knowledge on fungal aggressiveness determinants and provide a resourceful repertoire of candidate effector proteins to guide further research.

Keywords: *Fusarium graminearum*, *Gibberella zeae*, aggressiveness, proteomics, effector proteins, plant-pathogen interactions, bread wheat

INTRODUCTION

Plants are constantly subjected to biological pressures that could compromise their development. Plant and pathogen interests are antagonist, thus generating an evolutionary dynamic between the two, promoted by the confrontation of the plant resistance with the ability of the pathogen to induce disease through an important variety of pathogenicity factors. Aggressiveness constitutes the quantitative component of pathogenicity and is defined as the degree of damage caused by the pathogen to the host (Van der Plank, 1968; Pariaud et al., 2009; Delmas et al., 2016). When a plant-pathogen interaction is established, proteins called effectors are synthesized to promote pathogenicity by suppressing the host's immune response and inducing physiological manipulation of the plant (Kamoun, 2006). Effector proteins can be localized in the cell wall surface or secreted directly into the plant cells to target specific host functions (Kamoun, 2006; Lo Presti et al., 2015; Sperschneider et al., 2016; Jones et al., 2018). They can also play crucial roles in the degradation of complex compounds like the plant cell wall, in the initiation of infection and for obtaining nutrients from plant host reserves (Hao et al., 2019). Effector proteins are probably an essential component of the pathogen's aggressiveness, nevertheless the molecular mechanisms underlying their functions are for the most part unknown, especially in fungus (Yi and Valent, 2013; van Schie and Takken, 2014; Jia and Tang, 2015; Lo Presti et al., 2015).

One relevant pathosystem for assessing the importance of pathogen's aggressiveness during the interaction with the host is the relationship between bread wheat and *Fusarium graminearum* Schwabe (*Hypocreales: Nectriaceae*) (teleomorph: *Gibberella zeae*). *F. graminearum* is the most prominent causal agent of the FHB in Europe, Canada, and United States (McMullen et al., 1997; Brennan et al., 2003; Steiner et al., 2017). Severe outbreaks regularly result in significant yield losses (Parry et al., 1995; Xu and Nicholson, 2009; McMullen et al., 2012; Chen et al., 2019), as well as altering nutritional grain quality and inducing a major health problem throughout the food chain *via* grain contamination by mycotoxins (Liu et al., 2019). DON is the most commonly found toxin in cereals (Placinta et al., 1999). Previous works showed that DON could have a role in fungal spread beyond the initial infection (Bai et al., 2002) by facilitating the spreading of *F. graminearum* from spikelets into the rachis which might induce the switch from biotrophy to necrotrophy (Bönnighausen et al., 2018). DON is also known to allow the inhibition of host protein synthesis (Walter et al., 2010), and is believed to be an aggressiveness factor rather than a pathogenicity factor (Proctor et al., 1995; Pasquet et al., 2016).

Although *F. graminearum* strains are not all identical in their ability to induce disease (Carter et al., 2002; Goswami and Kistler, 2005), the molecular mechanisms and life traits

that determine the fungal aggressiveness level are always very controversial according to the authors. Classically, *F. graminearum* variation in aggressiveness is measured with severity variables such as the percentage of spikelets infected or the size of the visual symptom (Cumagun et al., 2004; Saville et al., 2012). Mycotoxins production is also considered as a FHB aggressiveness component (Proctor et al., 1997, 2002; Mesterházy, 2002; Burlakoti et al., 2007; Shin et al., 2018). Molecular approaches have also been used to characterize differences in *F. graminearum* strain aggressiveness at the genome (Carter et al., 2002; Gale et al., 2002; Cumagun et al., 2004; Laurent et al., 2017, 2018) or at the transcriptome scale (Harris et al., 2016; Puri et al., 2016). Many other studies have also identified *F. graminearum* genes involved in pathogenicity and some appeared to have only a quantitative effect (i.e., aggressiveness-related genes) (Pariaud et al., 2009). These genes encode secreted proteins and effectors that may play roles in the infection course (Krijger et al., 2014; Lu and Edwards, 2015; Chetouhi et al., 2016; Fabre et al., 2019). Furthermore, previous genomics studies have identified more than 600 genes coding for secreted proteins (Brown et al., 2012; King et al., 2015). Some have been identified at the proteome level (Lowe et al., 2015; Fabre et al., 2019) suggesting that *F. graminearum* could synthesize a large number of proteinous effectors.

In a previous study, we investigated the molecular dialogue dynamics taking place during the early stages of the FHB progress in bread wheat (Fabre et al., 2019). This has highlighted dual protein regulations between 48 hpi and 72 hpi both in *F. graminearum* and in wheat, emphasizing that regulated *F. graminearum* proteins could dynamically adjust to the plant physiological responses (Fabre et al., 2019). *Fusarium graminearum* effectors have been shown to be accumulated at specific stages of infection to achieve precise roles in the progress of the interaction, especially at 72 hpi during symptoms appearance (Fabre et al., 2019). However, this previous study was carried out on only one aggressive strain and one susceptible wheat cultivar. Evaluating the specificity of these proteome adjustments in hosts and pathogens contrasting for their susceptibility and aggressiveness, respectively, represents a powerful lever to identify the molecular determinants that drive the development of the disease.

The aim of this work is to question the potential links between the intrinsic characteristics of different *F. graminearum* strain proteomes with their respective aggressiveness *in planta*, as well as the impact of different wheat genetic backgrounds on the accumulation of the pathogen proteins. The qualitative and quantitative characterizations of the three *F. graminearum* proteomes at 72 hpi were performed with a special interest on effectors and proteins coded by known *F. graminearum* aggressiveness-related genes. In addition, three variables classically used for the *F. graminearum* aggressiveness determination were described, (i) the severity of symptoms induced by the strains, (ii) the fungal mass development *in planta*, and, (iii) the DON synthesis rate of each strain. The joint analysis of all these data provide new insights into the determinism of *F. graminearum* aggressiveness at the early stage of the disease progress.

Abbreviations: ANOVA, Analysis of variance; Cv, Cultivar effect; DON, Deoxynivalenol; FDR, False discovery rate; FHB, Fusarium head blight; hpi, hours post-inoculation; S+Cv, Strain+Cultivar effect; S×Cv, Strain×Cultivar effect; S, Strain_effect.

MATERIALS AND METHODS

Plant Growth and *Fusarium graminearum* Inoculation

Experiments were conducted on three wheat cultivars of contrasting susceptibility to FHB, including in decreasing order of susceptibility cv. Recital, cv. Cadenza and cv. Renan as ranked from previous field observations. Recital and Renan are among the most contrasted cultivars of the french wheat collections (Gervais et al., 2003) while Cadenza is considered as intermediate. For each wheat cultivar, seeds were sown in buckets and kept at 20°C to allow germination. Vernalization was performed at 4°C for 8 weeks, then plantlets were transplanted in 4-L pots and transferred in a growth cabinet with optimal conditions to allow tillering and synchronized flowering. Twenty four plants per wheat cultivar were prepared for a total of 72 wheat plants divided in three randomized complete blocks in the growth cabinet and surrounded by additional plants to control any edge effects. Automatic watering was installed, and the daily photoperiod was set at 16-h daylight for a temperature of 20°C and 8-h darkness at 18°C. Relative humidity was maintain at 80% during day and night.

Fusarium graminearum strains MDC_Fg1, MDC_Fg13, and MDC_FgU1, all originating from France, were selected for their contrasting aggressiveness (based on field observations). The preparation of the *F. graminearum* inocula was performed as described in Fabre et al. (2019). The three strains were individually inoculated in six plants of each wheat cultivar i.e., six plants $\times$ 3 *F. graminearum* strains for a total of 18 plants per cultivar. For each cultivar, inoculation was performed at the mid-anthesis stage by depositing 10 μ l of inoculum in the floral cavity of six contiguous spikelets located in the middle zone of three synchronized spikes per plant. The last six plants were inoculated with water and were used as control. For each cultivar $\times$ strain combination, the point-inoculated spikelets of the three spikes of three independent plants were specifically collected 72 h after the inoculation (hpi), while the ones of the three remaining plants were collected at 168 hpi. For each cultivar $\times$ strain combination, three biological replicates were designed at both time points; they corresponded to one individual plant which was characterized by the pool of all inoculated spikelets from three spikes. Fungal mass quantification in wheat spikes, *F. graminearum* DON synthesis rate and proteomics were performed on the same plant material.

Symptom and Fungal Development Monitoring

Symptoms were monitored by visual inspection and scored every 24 h from 0 to 168 hpi (hours post-inoculation) using a 5-level rating scale (Figure 1). A score of 0 was given to spikelets which had no visible symptom, a score of 1 was given when the first yellowing spot appeared, a score of 2 when a brown spot was visible, a score of 3 when browning gained the whole spikelet and a score of 4 when aerial mycelium became visible. Until 72 hpi, symptom monitoring was profiled on the whole set of plants

(six plants for each cultivar $\times$ strain combination) while the range 96 hpi to 168 hpi was monitored from the remaining unsampled plants (three plants for each cultivar $\times$ strain combination).

Fungal mass was assessed at 72 and 168 hpi from the three biological replicates of each cultivar $\times$ strain combination, using qPCR method. For each biological replicate, the measurements made for each sample were performed nine times and were considered as technical replicates. Water-inoculated spikes were used as control. Frozen spikes from the same plant were mixed and finely ground under liquid nitrogen using pestle and mortar. The DNA-isolation was performed on 100 mg of ground material (i.e., 72 and 168 hpi) using CTAB buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA and 2% cetyltrimethyl ammonium bromide). Samples were incubated at 65°C during 1 h and centrifuged at 10 000 g for 10 minutes at room temperature. DNA was recovered by adding 1 volume of chloroform and centrifuged as described above. Precipitation of the nucleic acids was performed using 1 volume of isopropanol and a centrifugation at 12 000 g for 20 minutes at 4°C. DNA has been cleaned with 70% ethanol and dissolved in 100 μ l TE buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). The DNA concentrations of each sample were measured with the Tecan's high performance Safire2TM microplate reader. Concentrations of each sample were normalized by dilution to 100 ng/ μ l, 1 μ l was used for qPCR using Roche LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master for each samples. Amplification was performed on the *F. graminearum* β -tubulin gene (Forward: TGCTGTTCTGGTCGATCTTG/Reverse: GACGGAAGTTTGGACGTTG) as described in Nguyen et al. (2013). Fungal DNA mass was estimated using a *F. graminearum* DNA dilution range (0.1–100 ng).

DON Synthesis Rate by the Three *F. graminearum* Strains

DON synthesis rate per fungal mass unit was measured following the methodology described by Nguyen et al. (2013). DON measurement was realized at 72 and 168 hpi from the three biological replicates of each cultivar $\times$ strain combination and using water-inoculated samples as control. Each measurement was repeated nine times as technical replicates. For each sample, 50 mg of fresh ground material was suspended in 500 μ l of distilled water and the extract was vortexed and centrifuged. A volume of 50 μ l of the supernatant was used for DON quantification using the DON ELISA technique (RIDAscreen DON kits; R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany. Detection range: 0.2 ppm to 6 ppm) and following the manufacturer's instructions. In order to estimate the DON synthesis rate by fungal mass unit, each DON quantity determined by the ELISA method was subsequently normalized with the mass of mycelium quantified in the sample. Milligrams of mycelium per gram of fresh ground sample were computed by referring to the number of β -tubulin gene copies per milligram mycelium of the *F. graminearum* DNA dilution range (0.1–100 ng) as described in Voigt et al. (2007).

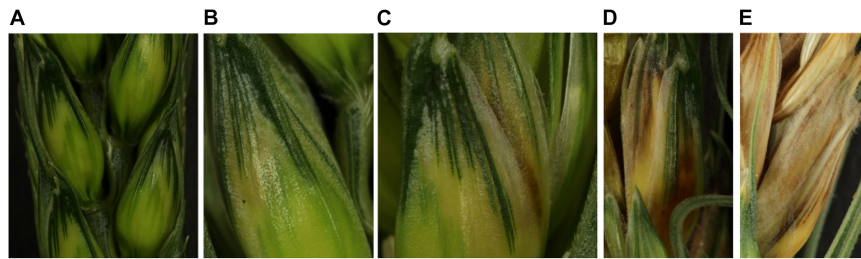


FIGURE 1 | Determination of the symptom severity scale. **(A)** The picture represents spikelets with type-0 symptoms corresponding to asymptomatic spikelets. **(B)** Representation of type-1 symptoms on spikelet with the first yellowing spot. **(C)** The picture illustrates the type-2 symptoms characterized by a spikelet harboring the first browning spot. **(D)** The picture illustrates the type-3 symptoms characterized by a fully burnished spikelet. **(E)** The picture illustrates the type-4 symptoms characterized by a total drying of the spikelet with the visible mycelium outside the plant organ.

Protein Extraction and LC-MS/MS Procedures

Denaturing protein extraction was achieved from the three biological replicates of each cultivar×strain combination collected at 72 hpi using the TCA/acetone procedure as described in Bonhomme et al. (2012). Protein solubilization was performed in an urea-thiourea buffer [6 M urea; 2 M thiourea; 100 mM ammonium bicarbonate; 1% Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X (Thermo Fisher Scientific 78429); 0.1% ProteaseMAX™ Surfactant (Promega V2071)] by following the ratio 10 µL per mg of dry matter. Protein digestion were performed as described in Fabre et al. (2019). Tandem mass spectrometry analyses were achieved using a nanoESI Q Exactive™ HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific 0726042) coupled with an Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific). HPLC gradients and data acquisition parameters were set as described in Fabre et al. (2019).

Identification and Quantification of Peptides and Proteins From MS/MS Data

Database searches were performed using X!Tandem¹; 2010.01.01.4) specifying one possible miscleavage. Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set as static and variable modification, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 10 ppm and 0.5 Da, respectively. Identifications were performed using a concatenated file including a contaminant database (trypsin, keratins, etc.), the MDC_Fg1 (13166 entries, 01/2019), MDC_Fg13 (13297 entries, 01/2019), and MDC_FgU1 (13014 entries, 01/2019) databases obtained from an in-lab re-sequencing of each *F. graminearum* strain (Alouane et al., 2018). To prevent peptides derived from plant proteins from being assigned to fungal proteins, a wheat database (IWGSC, v1.0 269472 entries, 04/2017) was also used for the identification. Identified proteins were parsed and grouped using the X!TandemPipeline v0.2.35 c++ (Langella et al., 2017). Data filtering was achieved according to a peptide *E*-value < 0.05. Proteins were reported when they displayed at least two different peptides in the same sample and when the protein *E*-value < 0.0001. The FDR (False Discovery Rate) at the

peptide level assessed from searches against reversed amino acid sequences for each protein was smaller than 0.8×10^{-6} . Protein and gene ontology annotations of the identified *F. graminearum* proteins were performed following the same methodology described in Fabre et al. (2019). Secretion features, subcellular localization predictions and functional annotations of identified proteins were conducted as described in Fabre et al. (2019). Relative quantification of peptides was achieved using the MassChroQ software (Valot et al., 2011) by extracting ion chromatograms as described in Bonhomme et al. (2012). The normalization was performed by dividing ratios by the total peptide abundance value in each LC-MS/MS run. Subsequent statistical analyses were performed on log10-transformed normalized data.

Statistical Analyses

Results were analyzed with the R programming language v3.4.4 (R Core Team, 2018). For each time point and after validating the absence of any block/replicate effect, symptom severity monitoring were performed using generalized linear model following Poisson distribution:

$$\log(Y_{ijk}) = \mu + S_i + C_vj + (S_i \times C_vj) + \varepsilon_{ijk},$$

while fungal mass, DON synthesis rate and abundance variations of *F. graminearum* proteins were traced using two-way ANOVA with following linear model, after checking the absence of any block/replicate effect:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + C_vj + (S_i \times C_vj) + \varepsilon_{ijk},$$

where Y_{ijk} refers to individual values, μ is the general mean of the variable considered, S_i is the effect of the *F. graminearum* strain inoculated, C_vj is the effect of the wheat cultivar infected, $S_i \times C_vj$ is the interaction of the strain effect by the C_v , and ε_{ijk} is the residual.

For each individual *F. graminearum* protein, *p*-values obtained from each effect were adjusted to control the FDR for independent test statistics (Benjamini and Hochberg, 1995). The FDR was < 0.05 corresponding, respectively, to *p*-values < 0.022, < 0.017, and < 0.00005 in the S , C_v and $S \times C_v$ effects, respectively. Fuzzy C-means clustering (Kumar and Futschik, 2007) of *F. graminearum* proteins showing significant

¹<http://www.thegpm.org/TANDEM/>

abundance changes according to each effect tested (i.e., S and Cv) and their addition (i.e., S+Cv) was performed from Z-score transformed values and a fuzzification parameter of 2.

RESULTS

Fusarium graminearum Strains Characterization Through Their Ability to Induce Symptoms, to Produce DON and Their Development *in planta*

In this work, the evaluation of the aggressiveness of three *F. graminearum* strains were at first measured *via* three parameters: (i) the induction of symptoms, (ii) the development of the fungus in spike tissues, and (iii) the DON synthesis rate. Overall, these three parameters distinguished the three strains. MDC_Fg1 strain induced systematically the most intense symptoms, MDC_Fg13 strain induced intermediate ones while MDC_FgU1 strain produced the weakest ones (Figure 2). The earliest significant difference between strains were observed at 72 hpi and concerned the symptom appearance (Supplementary Table S1). At this time, wheat samples inoculated with MDC_Fg1 strain showed more severe symptoms than MDC_Fg13 and MDC_FgU1 with an average score of 1.33, 0.32, and 0.31, respectively, while fungal mass monitoring by qPCR did not identify any significant difference between the three strains (Figure 3). Concerning DON synthesis rate, MDC_Fg1 strain appeared to be the highest producer at 72 hpi with an average of 21.48 g per kg⁻¹ of mycelium, 11.81 and 1.18 g.kg⁻¹ for MDC_Fg13 and MDC_FgU1, respectively (Figure 4). At the end of the experimentation, symptom severity was significantly different between the three strains with an average score of 3.44, 2.88, and 1.18 that were monitored for MDC_Fg1, MDC_Fg13 and MDC_FgU1, respectively (Figure 2). At this stage, fungal mass monitoring showed different mean fungal development with an average of 31.91, 10.96, and 2.45 ng of mycelium for MDC_Fg1, MDC_Fg13 and MDC_FgU1, respectively. DON synthesis rate was also significantly different with 2.85, 10.74, and 17.12 g.kg⁻¹ for MDC_Fg1, MDC_Fg13 and MDC_FgU1, respectively (Figure 4).

In planta Characterization of the Three *F. graminearum* Strain Proteomes

Proteomics analyses were performed at 72 hpi on the three wheat cultivars samples (i.e., Recital, Cadenza and Renan) inoculated with the three *F. graminearum* strains thus forming 9 *F. graminearum* strain×wheat cultivar combinations. Considering all *F. graminearum*-inoculated wheat samples, this study identified 615 unique *F. graminearum* proteins. Among all the identified proteins, 612 were shared by the three strains (Figure 5), two were identified in two different strains and only one was strain specific: FG001_00345, predicted to be a thioredoxin. Noteworthy, this protein has been identified in very low abundance in only two biological replicates of Recital samples inoculated with strain MDC_FG1.

Previous work has shown co-variations of fungal and wheat protein abundances between 48 and 72 hpi, suggesting that *F. graminearum* proteins and especially effectors, could participate in molecular mechanisms determining the fate of the interaction (Fabre et al., 2019). In order to better understand the specificity of these molecular mechanisms, here we performed a proteomics analysis at the end of this turning point (i.e., 72 hpi) to identify the proteins produced by three *F. graminearum* strains contrasted by their aggressiveness with a particular interest for predicted *F. graminearum* effectors. In all infected-wheat proteomics data aggregated, a total of 493 fungal proteins (corresponding to nearly 80% of the total identified proteins) were already identified in our previous work (Fabre et al., 2019). Similarly, 61 of the 72 predicted effectors identified during this work are common to both experiments. Regarding protein quantification, 340 (≈55% of all identified proteins) displayed significant abundance differences between *F. graminearum* strains. Two-way ANOVA were computed to evaluate the contribution of the “Strain” and “Cultivar” factors on the *F. graminearum* protein abundances. Abundances that were deemed significant to each factor enabled a categorization of the proteins according to the factor(s) that drive(s) the abundance differences. This included: (i) *F. graminearum* proteins whose abundance differences were specifically explained by the genetic background of the strain (Strain factor, *Strain_effect* proteins), (ii) *F. graminearum* proteins whose abundance differences were only explained by the host plant (Cultivar factor, *Cultivar_effect* proteins), (iii) *F. graminearum* proteins whose abundance differences were explained by both factors (*Strain+Cultivar_effect* proteins), and (iv) *F. graminearum* proteins whose abundance differences observed between strains were dependent on the host cultivar (*Strain×Cultivar_effect* proteins). Considering each factor individually, a total of 138 *Strain_effect* proteins, 82 *Cultivar_effect* proteins and 117 *Strain+Cultivar_effect* proteins and 2 *Strain×Cultivar_effect* proteins were identified (Figure 6 and Supplementary Table S2).

How Does Fungal Genetics Shape the Protein Abundance Patterns?

Two-way ANOVAs computed to evaluate the significant differences in protein abundance between strains allowed the identification of 255 proteins (i.e., *Strain_effect* proteins and *Strain+Cultivar_effect* proteins; Figure 6). Among these proteins, 24 matched with predicted secretion features, including 15 proteins harboring a plastid transit peptide (Supplementary Table S2). In addition, 35 *F. graminearum* proteins were predicted to be effectors according to EffectorP2.0 among which three were also predicted to target the wheat chloroplast or vacuole. A fuzzy C-means clustering of the whole set of these proteins evidenced five consistent clusters (S1–S5; Figure 7A) including 8–49 proteins for *Strain_effect* proteins and six clusters including 7–40 proteins for the *Strain+Cultivar_effect* proteins (S+Cv1 to S+Cv6; Figure 8). Six clusters (i.e., Clusters S1, S2, S5, S+Cv1, S+Cv2 and S+Cv3) containing a total of 187 proteins (i.e., nearly 65%) showed abundance that was significantly higher in the strain MDC_Fg1 than in the two other strains. Clusters

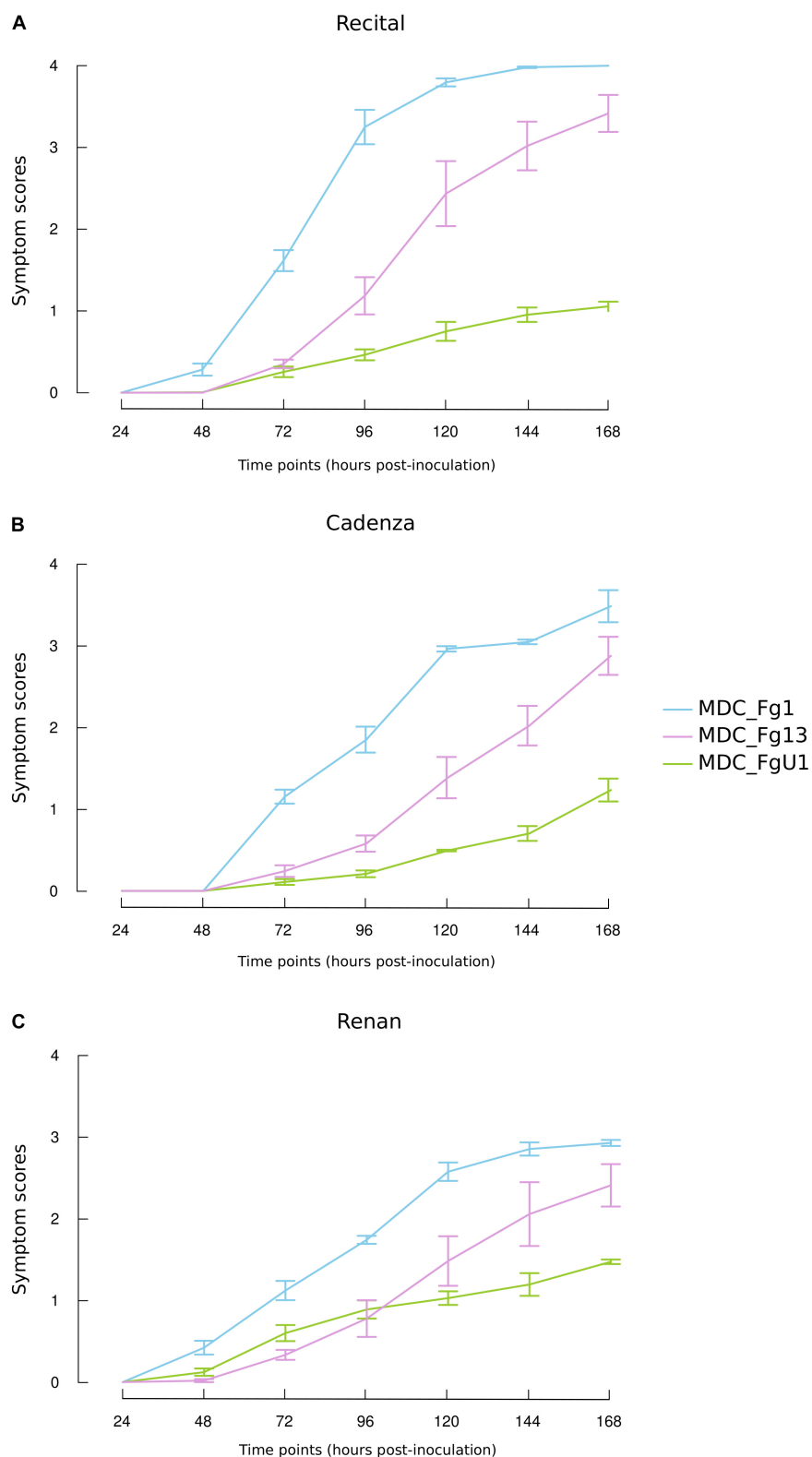
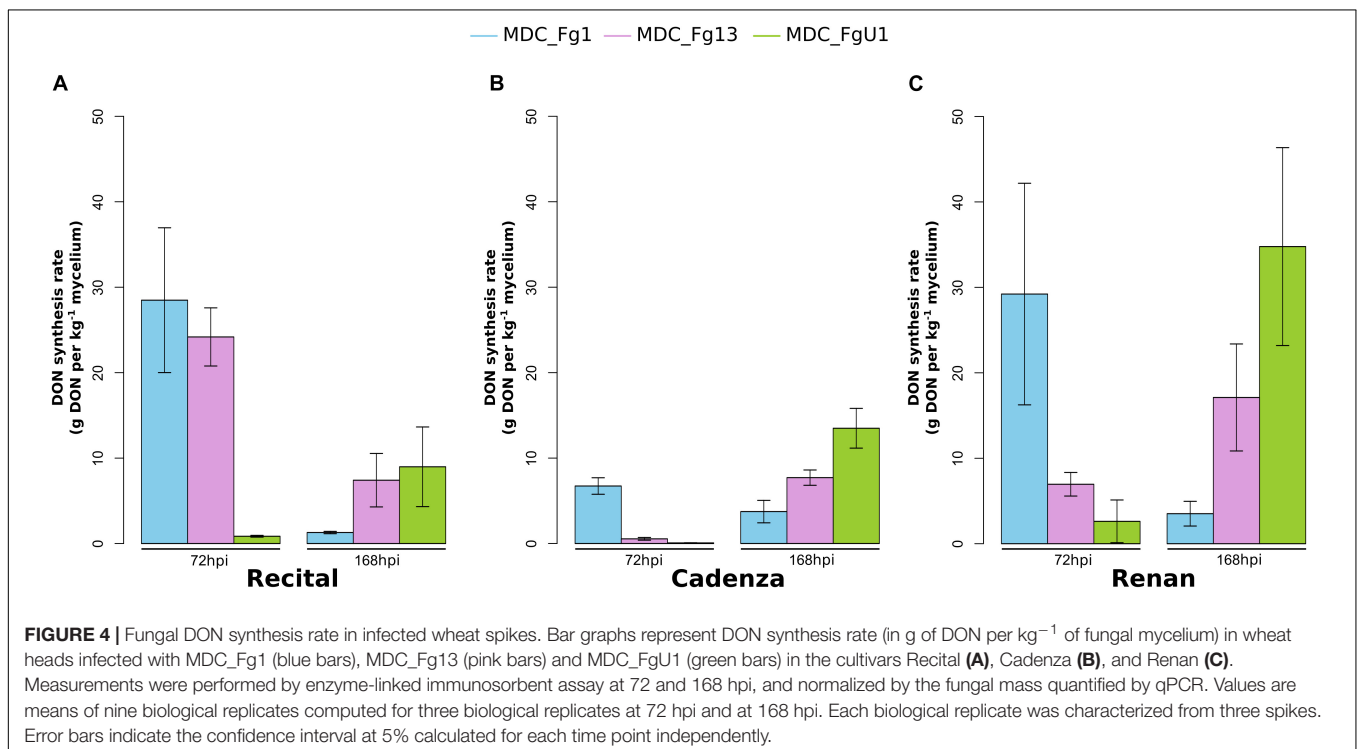
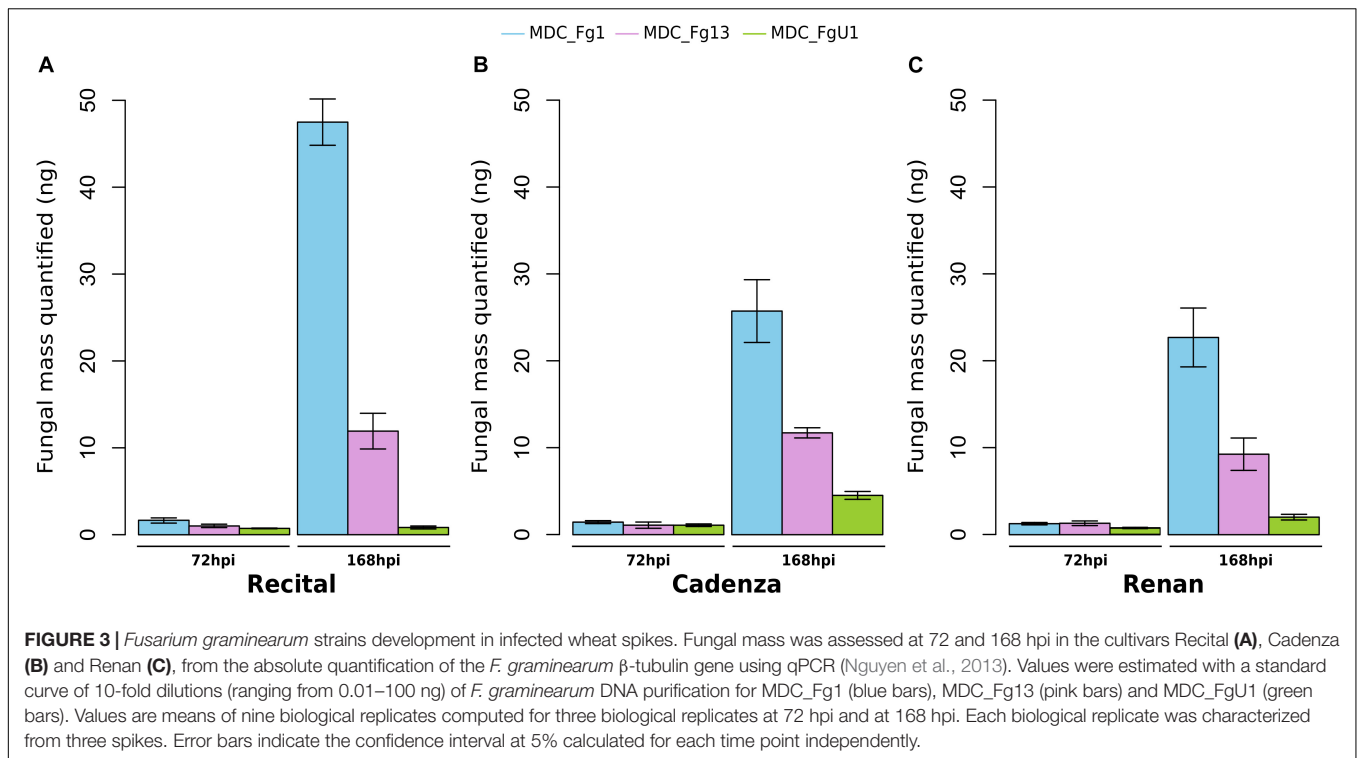
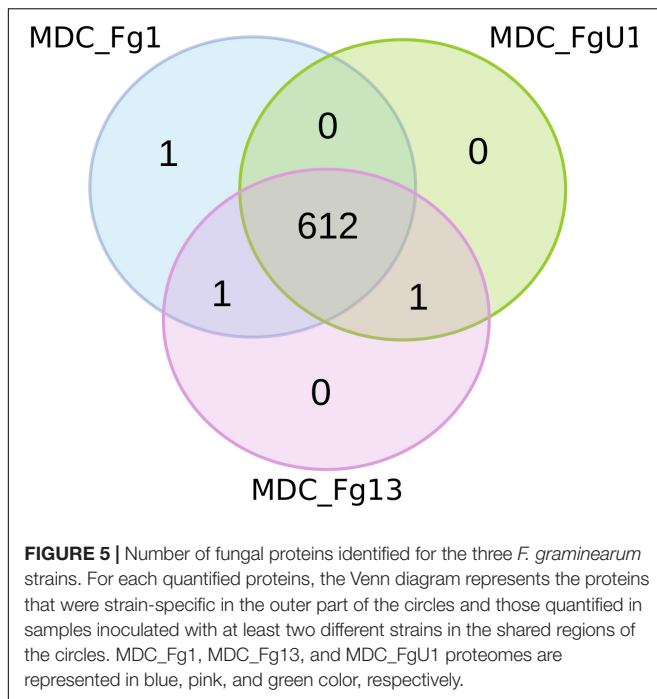


FIGURE 2 | Symptom dynamics induced by the three *F. graminearum* strains on the three studied wheat cultivars **(A)** Recital, **(B)** Cadenza, and **(C)** Renan. Line plots show the course of the symptom severity observed for MDC_Fg1 (blue lines), MDC_Fg13 (pink lines), and MDC_FgU1 (green lines) on the three wheat cultivars. Values are means of six biological replicates until 72 hpi and means of three biological replicates from 96 hpi to 168 hpi. Each biological replicate was characterized from three spikes. Error bars indicate the confidence interval at 5% calculated for each time point independently.



S2 and S+Cv2 appeared to be enriched in proteins involved in “translation,” “ribosome” and “Protein synthesis” functions and Cluster S5 in proteins involved in “ATP binding” and “carbohydrate metabolic process” functions. These three clusters were also enriched in predicted effector proteins. In all other

clusters, fungal protein abundances were lower in MDC_Fg1 than in the two others strains. Cluster S+Cv4 included proteins systematically of higher abundance for MDC_Fg13 while in the cluster S3 no significant difference was found between MDC_Fg13 and MDC_FgU1 protein abundances. No significant

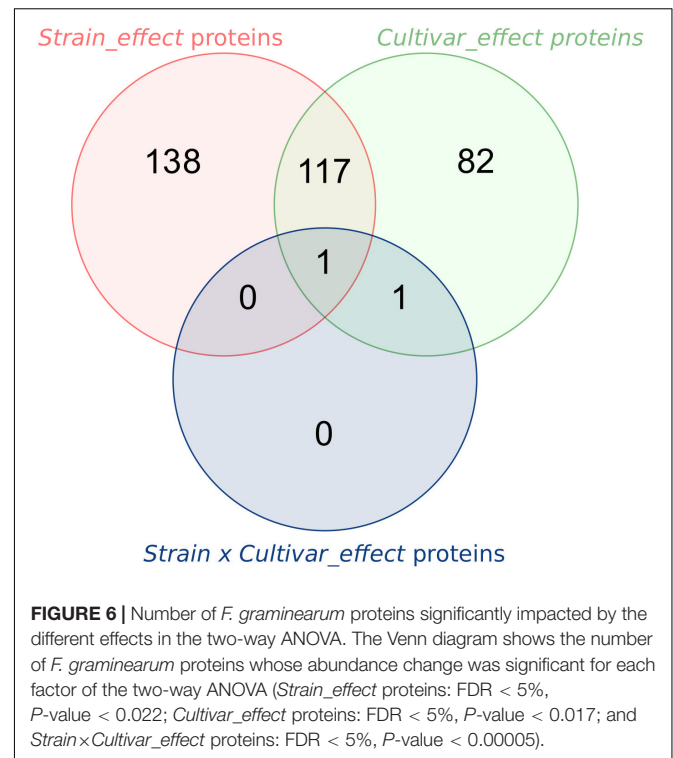


protein function enrichment was found in the cluster S+Cv4 while enrichments in “GTP binding,” “GTPase activity,” “ATP binding” and “protein binding” were found in cluster S3. Cluster S4 contained eight proteins whose abundance was the highest in MDC_FgU1, intermediate in MDC_Fg1 and the lowest in MDC_Fg13. No significant enrichment was found in this cluster.

Does the Host Cultivar Modulate Fungal Protein Abundance Profiles?

Overall, in this experiment the wheat cultivar had a lower effect on the observed variances than the “Strain” factor. For symptoms severity, the percentage of the variance explained by the “Cultivar” factor was not significant regardless of the time point, while it was between 55 and 83% for the “Strain” factor (**Supplementary Table S1**). The same observation was made for fungal mass monitoring, when the strain genetic background used for infection accounted for 31 and 66.5% of the observed variance at 72 and 168 hpi, respectively, no significant differences between the three wheat cultivars were found with 1.4 and 5.8% of the explained variance (**Supplementary Table S1**). Concerning DON synthesis rate, significant effects of the “Cultivar” factor were found with nearly 19.5 and 22% of the explained variance at 72 and 168 hpi, respectively (**Supplementary Table S1**). For these three variables, no specific interaction was found between *F. graminearum* strains and wheat cultivars (**Supplementary Table S1**).

At the proteomic scale, all proteins whose abundance variations were explained at least in part by the Cv were considered here. This allowed for the identification of 199 fungal proteins including 82 proteins whose abundance changes were explained only by the wheat cultivar (*Cultivar_effect* proteins) and 117 whose abundance changes were explained both by



strain and cultivar genetic backgrounds (*Strain*+*Cultivar_effect* proteins, **Figure 6**). Two proteins showed an effect of the interaction (*Strain*×*Cultivar* proteins). Clustering of these proteins allowed the construction of four consistent clusters (Cv1 to Cv4; **Figure 7B**) including from 14 to 24 proteins for *Cultivar_effect* proteins and the six *Strain*+*Cultivar_effect* proteins clusters already described (S+Cv1 to S+Cv6; **Figure 8**). Analysis of the abundance changes revealed that clusters Cv2 and S+Cv6 grouped *F. graminearum* proteins whose abundances were maximal on the low susceptible cultivar Renan and minimal in the highly susceptible cultivar Recital. Clusters Cv1 and S+Cv5 contained *F. graminearum* proteins whose abundance was higher in the cultivar Cadenza than the two others. In contrast, all other clusters (i.e., Cv3, Cv4, S+Cv1, S+Cv2, S+Cv3, and S+Cv4) were characterized by proteins displaying weaker abundances in Cadenza samples than in the two others. Indeed, a total of 20 candidate effectors and 21 putative secreted proteins including 14 proteins harboring a plastid transit peptide were found in these protein clusters for which no significant enrichment was detected.

DISCUSSION

During this work, we evaluated the aggressiveness of three strains of *F. graminearum* by analyzing three variables conventionally used to explain the disease severity (i.e., symptom severity, DON synthesis rate, and fungal mass) and by investigating their proteomes. For the three variables, significant differences between *F. graminearum* strains were found. This result was mostly discriminating for symptom severity monitoring which

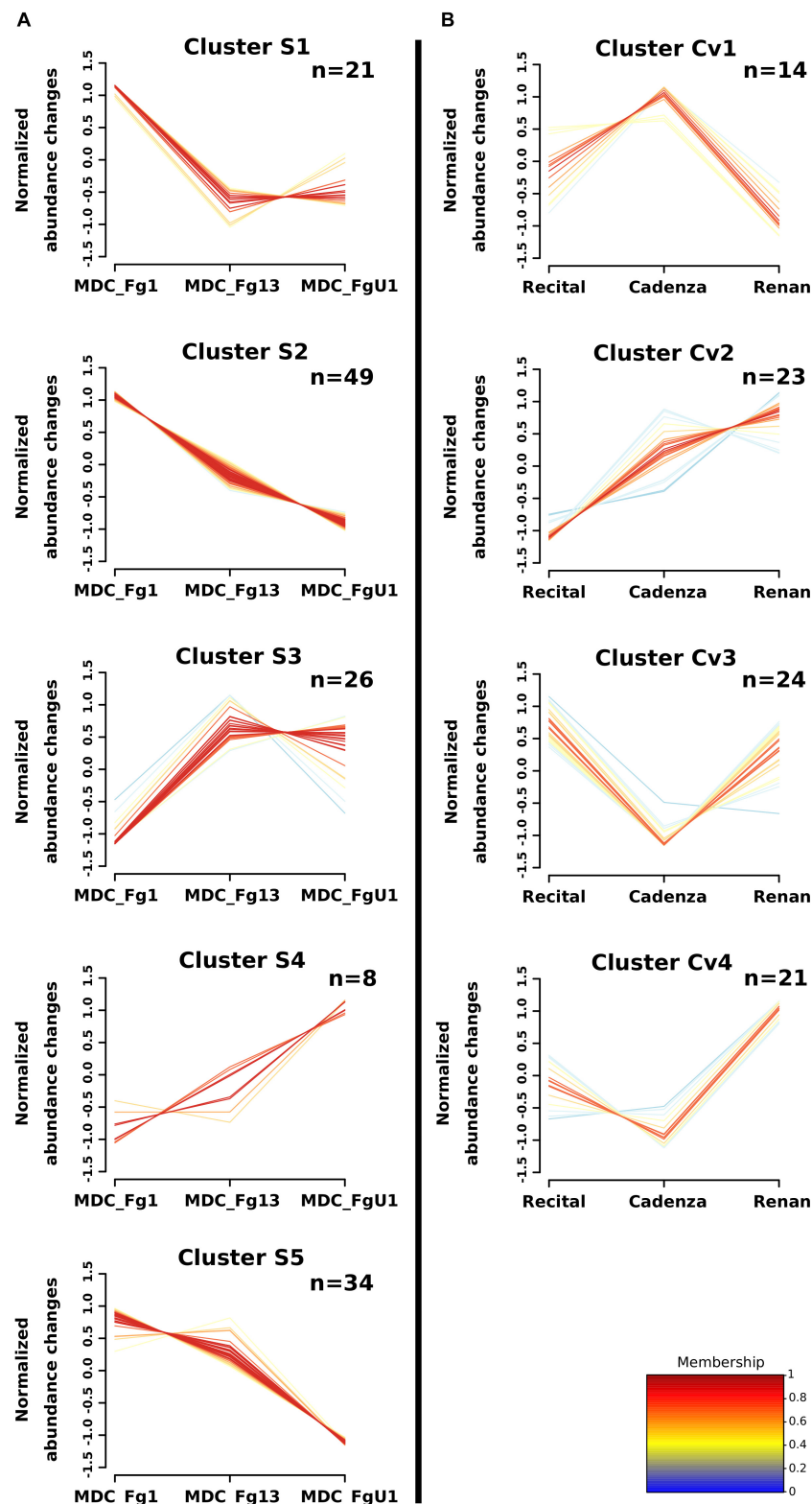
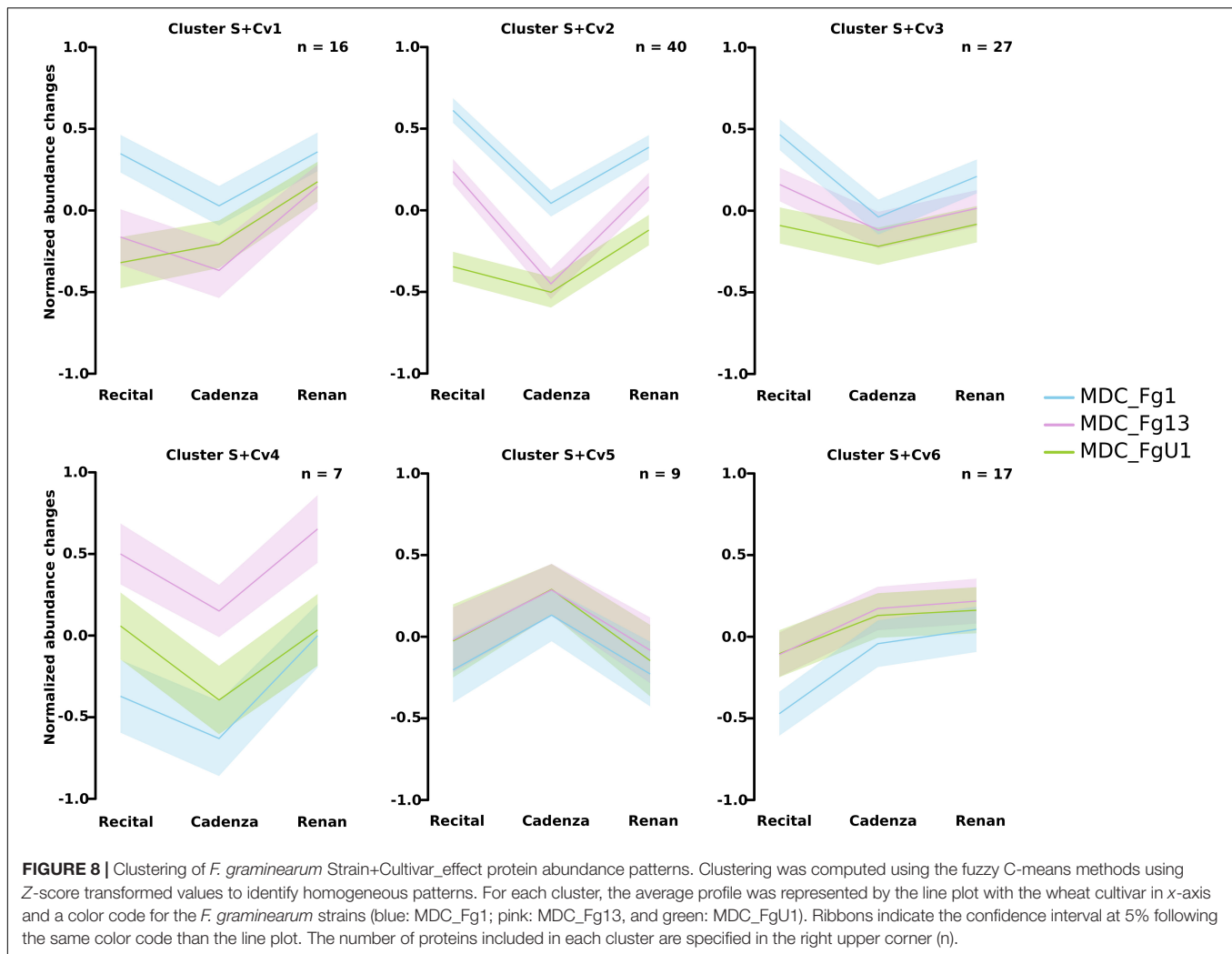


FIGURE 7 | Clustering of *F. graminearum* *Strain_effect* and *Cultivar_effect* protein abundance patterns. Clustering was computed using the fuzzy C-means methods using Z-score transformed values to identify homogeneous patterns of protein abundance changes in **(A)** the *Strain_effect* proteins and in **(B)** the *Cultivar_effect* proteins. The number of proteins included in each cluster are specified in the right upper corner (n). The cluster membership of each protein profile is indicated by a color code from blue to red.



allowed for the establishment of a clear ranking of our strains on the three wheat cultivars. However, neither the strain's level of DON synthesis rate nor the fungal mass quantified *in planta* seems to explain the differences in symptom severity. For example, DON synthesis rate measured in the Recital samples inoculated with MDC_Fg13 was significantly higher than that measured in MDC_FgU1 samples while the symptom severity was not different at the same time. Several studies had already made the same observation (Bai et al., 2001; Birzele et al., 2002; Gilbert et al., 2002; Champeil et al., 2004; Alvarez et al., 2010; Hallen-Adams et al., 2011; He et al., 2019). We can also wonder about the links between the DON synthesis rate and symptom severity with the fungal mass present in the wheat spike. Previous studies showed a strong correlation between fungal biomass and DON production (Lamper et al., 2000; Bai et al., 2001) and between fungal development and symptom severity (Burlakoti et al., 2007) while other studies have not shown any obvious relationship between these parameters (Nicholson et al., 1998; Paul et al., 2005; Alvarez et al., 2010; Hallen-Adams et al., 2011). In this work, no clear correlation between fungal mass, DON

synthesis rate and symptom severity was found. The same fungal mass quantified in the three strains at 72 hpi produced different DON amount and induced different symptom severity in the three wheat cultivars. Moreover, in agreement with a previous study showing that the *F. graminearum* genes involved in DON synthesis were highly expressed in the early stages of fungus development (Hallen-Adams et al., 2011), our results suggest that in the most aggressive strain MDC_Fg1, a small amount of mycelium at 72 hpi produced a large amount of DON while a larger quantity of mycelium (168 hpi) resulted in a lower production. Individually, these parameters allow us to efficiently distinguish the different strains but they do not seem to be sufficient to explain their respective aggressiveness.

***Fusarium graminearum* Strains Express the Same Genetic Program During Wheat Infection**

The study of proteins, molecules directly responsible for cell activity, is essential for understanding plant-pathogen

interactions (Quirino et al., 2010) and particularly the proteinous effectors that are known to be closely related to the infection success. They are defined as molecules that modify host cell structure and function, allowing the pathogen penetration into host tissues, inhibiting the plant immune responses and manipulating plant physiology for the pathogen's benefit (Stergiopoulos and de Wit, 2009; Giraldo and Valent, 2013; Selin et al., 2016; Toruño et al., 2016). Comparison of proteins identified in this experiment with those identified in our previous work conducted with the most aggressive strain MDC_Fg1 (Fabre et al., 2019) showed that 85% of the total proteins including 80% of the effectors are common to both experiments. These results highlight the high reproducibility of this analytical method and suggest that there may be a core proteome expressed during the interaction with wheat. This assumption is supported by the fact that nearly 100% of the identified proteins were found in the theoretical proteomes of the three *F. graminearum* strains including all the predicted *F. graminearum* effectors. A similar observation was already made during the analysis of seven strain proteomes of *Mycobacterium tuberculosis* (Peters et al., 2016). This is an interesting result because it suggests that the three *F. graminearum* strains use the same protein set during the early stage of wheat infection and that differences in aggressiveness observed are probably not due to strain-specific proteins but could rather be due to differences in proteins accumulation.

***Fusarium graminearum* Aggressiveness Could Be Linked to Protein Synthesis and Accumulation During Wheat Infection**

Among all the fungal proteins quantified, nearly 76% showed significant abundance differences between the three *F. graminearum* strains. Fungal mass quantification by qPCR at this stage of infection did not identify any differences between the three strains implying that the variations in protein abundance observed are not due to differences in development but rather to a consequence of differential gene expression or protein synthesis. This hypothesis is supported by the significant enrichment in proteins involved in "Protein biosynthesis," "Ribosome" and "translation" found in the clusters containing proteins whose abundance is maximal for MDC_Fg1. This suggests that the most aggressive strain could have a more efficient protein biosynthesis machinery than the other two strains, which could have a significant effect on the effector abundance produced by this strain. Observation of the predicted effector distribution in the different abundance pattern clusters supports this hypothesis since 67% of them were located in clusters whose abundance is maximal in the MDC_Fg1 strain, intermediate or weak in the MDC_Fg13 and always weak in the MDC_FgU1 strain (Supplementary Table S2). In order to confirm the impact of protein abundance variations on the *F. graminearum* strains aggressiveness, an additional search for proteins already described in the literature was carried out. A total of 16 proteins showing significant abundance changes were matched with proteins

encoded by genes known to have a role in *F. graminearum* aggressiveness toward bread wheat (Supplementary Table S2). Among them, all proteins whose abundance was significantly different between the three strains showed higher abundance in samples infected with the most aggressive strain MDC_Fg1 than with the two others strains (i.e., Clusters S1, S2, S+Cv2, and S+Cv3) with the exception of two proteins (FG001_12286 and FG001_06046; Cluster_S5) for which no difference in abundance was observed between MDC_Fg1 and MDC_Fg13. For example, FGSG_07329 included in cluster S2 is a glycogen synthase kinase involved in the activation of many stress-related genes. Mutation of this gene is known to cause a total loss of virulence in *F. graminearum* as well as many pleiotropic effects such as the inability to produce DON (Qin et al., 2015). The presence of this protein in the cluster S2 can be related to the DON synthesis rate results which showed that MDC_Fg1 was the one that globally had the highest production at 72 hpi. This is consistent with the presence of the protein FGSG_07896 in the cluster S5 known to be a Trichothecene 3-O-acetyltransferase involved in the DON self-protection mechanism in *F. graminearum* (Kimura et al., 1998; McCormick et al., 1999). These results agree with those obtained for the analysis of the effector distribution within the different clusters and show a strong correlation with the symptom severity and linked with the DON synthesis rate observed *in planta*. The differences in aggressiveness might not be explainable by strain-specific proteins, but rather by abundance differences in common proteins and effectors having a quantitative effect on the *F. graminearum* pathogenicity at the same development stage.

Host Cultivar Drives Part of the Fungal Protein Regulations

While many studies have demonstrated that wheat cultivars could strongly differ in their response to FHB (Mesterházy et al., 1999; Mesterházy, 2002; Bai and Shaner, 2004), our results indicate that the fungal genetic background is the main factor explaining the differences in aggressiveness during the early disease development. At the molecular level, the additional power provided by proteomics has made it possible to identify a Cv on the abundance variations of 199 proteins (i.e., 82 *Cultivar_effect* proteins and 117 *Strain+Cultivar_effect* proteins). Concerning the *Strain+Cultivar_effect* proteins, the *F. graminearum* protein abundance level was mainly determined by the genetic background of *F. graminearum* while differences were amplified when facing different host cultivars. The analysis of the diversity of the *Cultivar_effect* proteins did not reveal significant effector enrichment in the different clusters but five proteins known to be important for *F. graminearum* virulence were found in clusters Cv2 and Cv4. Among these five proteins, we found an arabinanase (FGSG_03598) known to enhance wheat susceptibility by suppressing plant immunity (Hao et al., 2019) and FgTRI14 protein (FGSG_03543) involved in DON synthesis (Dyer et al., 2005). Furthermore, no specific *Strain*×*Cultivar* interactions (called *Strain*×*Cultivar_effect* in this work) were found neither in symptom severity, DON

synthesis rate and fungal mass monitoring, nor at the proteomics level where only two *Strain*×*Cultivar* effect proteins were detected. Although the use of only three wheat cultivars cannot represent the whole genetic variability for FHB susceptibility, this illustrates the pivotal role of the fungal component in the disease. *F. graminearum* is a broad-host pathogen (Harris et al., 2016) and it is known that pathogens able to infect multiple hosts have a reduced selection pressure to co-evolve with a particular host, especially when the hosts belong to the same species (Woolhouse et al., 2002). Previous work done on the interaction between a generalist pathogen and cereals has shown that *Strain*×*Cultivar* interactions could have only a minor effect, for example in *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*/*Avena sativa* interaction (Bruns et al., 2012), in *Septoria tritici*/*Triticum aestivum* interaction (van Ginkel and Scharen, 1988) or in *Fusarium graminearum*/*Triticum aestivum* interaction (Bai and Shaner, 1996; Xue et al., 2004; Mesterházy et al., 2005). All together, these results indicate that the host cultivars similarly influence the three *F. graminearum* proteomes and that strain-specific protein accumulations did not depend on the host cultivar.

CONCLUSION

This study expands our understanding of the determinants of *F. graminearum* aggressiveness during the early stage of bread wheat infection. Three *F. graminearum* strains express the same proteome *in planta* while differences were only detectable in protein abundance. Host background effect was only shown at the protein abundance level and in the DON synthesis rate without any change in the strain ranking. In addition, the absence of *Strain*×*Cultivar* specific interaction suggests a common infection strategy of the three strains and modulated identically by wheat cultivars of contrasted FHB susceptibility. Now, confirming these results using more strains and cultivars on a longer infection dynamics will be an additional work in order to understand the determinism of pathogen's aggressiveness during the interaction.

REFERENCES

- Alouane, T., Rimbart, H., Fabre, F., Cambon, F., Langin, T., and Bonhomme, L. (2018). Genome sequence of *Fusarium graminearum* strain MDC_Fg1, isolated from bread wheat grown in France. *Microbiol. Resour. Announc.* 7:e01260-18. doi: 10.1128/MRA.01260-18
- Alvarez, C. L., Somma, S., Moretti, A., and Fernández Pinto, V. (2010). Aggressiveness of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates in wheat kernels in Argentina. *J. Phytopathol.* 158, 173–181. doi: 10.1111/j.1439-0434.2009.01596.x
- Bai, G.-H., Desjardins, A. E., and Plattner, R. D. (2002). Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153, 91–98. doi: 10.1023/A:1014419323550
- Bai, G.-H., Plattner, R., Desjardins, A., Kolb, F., and McIntosh, R. A. (2001). Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breed.* 120, 1–6. doi: 10.1046/j.1439-0523.2001.00562.x

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaíno et al., 2016) partner repository with the dataset identifier PXD015139.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TL and LB designed the research. FF and SR prepared the samples. FF, SU, and LB performed the proteomic experimentation. JB involved in deoxynivalenol synthesis rate measurements. FF and JB involved in qPCR measurements. FF and LB analyzed the data, prepared the figures, and wrote the manuscript. LB conceived and performed modeling.

FUNDING

This research and FF Ph.D. grant were supported by the Region Auvergne-Rhône-Alpes and the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER support: Nouveau Chercheur 2016 program).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Tarek Alouane, David Lopez, and Hélène Rimbart for their valuable help in bioinformatics. We thank Marie Dufresne (Institut of Plant Sciences – Paris-Saclay) for her helpful comments on our manuscript and Christopher Smith for his proofreading. We also thank Richard Blanc for his help in the plant cultivation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02857/full#supplementary-material>

- Bai, G.-H., and Shaner, G. (1996). Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Dis.* 80, 975–979. doi: 10.1094/PD-80-0975
- Bai, G.-H., and Shaner, G. (2004). Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 135–161. doi: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140340
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57, 289–300. doi: 10.2307/2346101
- Birzele, B., Meier, A., Hindorf, H., Krämer, J., and Dehne, H.-W. (2002). Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 667–673. doi: 10.1023/A:1020632816441
- Bonhomme, L., Valot, B., Tardieu, F., and Zivy, M. (2012). Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 957–972. doi: 10.1074/mcp.M111.015867
- Bönnighausen, J., Schauer, N., Schäfer, W., and Bormann, J. (2018). Metabolic profiling of wheat rachis node infection by *Fusarium graminearum* – decoding

- deoxynivalenol-dependent susceptibility. *New Phytol.* 22, 459–469. doi: 10.1111/nph.15377
- Brennan, J. M., Fagan, B., van Maanen, A., Cooke, B. M., and Doohan, F. M. (2003). Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 577–587. doi: 10.1023/A:1024712415326
- Brown, N. A., Antoniw, J., and Hammond-Kosack, K. E. (2012). The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis. *PLoS One* 7:e33731. doi: 10.1371/journal.pone.0033731
- Bruns, E., Carson, M., and May, G. (2012). Pathogen and host genotype differently affect pathogen fitness through their effects on different life-history stages. *BMC Evol. Biol.* 12:135. doi: 10.1186/1471-2148-12-135
- Burlakoti, R. R., Estrada, R., Rivera, V. V., Boddada, A., Secor, G. A., and Adhikari, T. B. (2007). Real-time PCR quantification and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet, and wheat. *Phytopathology* 97, 835–841. doi: 10.1094/PHYTO-97-7-0835
- Carter, J. P., Rezanoor, H. N., Holden, D., Desjardins, A. E., Plattner, R. D., and Nicholson, P. (2002). Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 573–583. doi: 10.1023/A:1019921203161
- Champeil, A., Fourbet, J. F., Doré, T., and Rossignol, L. (2004). Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Prot.* 23, 531–537. doi: 10.1016/j.cropro.2003.10.011
- Chen, Y., Kistler, H. C., and Ma, Z. (2019). *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: biosynthesis, regulation, and management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57, 15–39. doi: 10.1146/annurev-phyto-082718-100318
- Chetoui, C., Bonhomme, L., Lasserre-Zuber, P., Cambon, F., Pelletier, S., Renou, J.-P., et al. (2016). Transcriptome dynamics of a susceptible wheat upon *Fusarium* head blight reveals that molecular responses to *Fusarium graminearum* infection fit over the grain development processes. *Funct. Integr. Genomics* 16, 183–201. doi: 10.1007/s10142-016-0476-1
- Cumagun, C. J. R., Bowden, R. L., Jurgenson, J. E., Leslie, J. F., and Miedaner, T. (2004). Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* 94, 520–526. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.5.520
- Delmas, C. E. L., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I. D., Richart Cervera, S., Delière, L., et al. (2016). Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evol. Appl.* 9, 709–725. doi: 10.1111/eva.12368
- Dyer, R. B., Plattner, R. D., Kendra, D. F., and Brown, D. W. (2005). *Fusarium graminearum* TRI14 is required for high virulence and DON production on wheat but not for DON synthesis *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9281–9287. doi: 10.1021/jf051441a
- Fabre, F., Vignassa, M., Urbach, S., Langin, T., and Bonhomme, L. (2019). Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving *Fusarium* head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism. *Plant Cell Environ.* 42, 2291–2308. doi: 10.1111/pce.13549
- Gale, L. R., Chen, L.-F., Hernick, C. A., Takamura, K., and Kistler, H. C. (2002). Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in eastern China. *Phytopathology* 92, 1315–1322. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.12.1315
- Gervais, L., Dedryver, F., Morlais, J.-Y., Bodusseau, V., Negre, S., Bilous, M., et al. (2003). Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 106, 961–970. doi: 10.1007/s00122-002-1160-5
- Gilbert, J., Abramson, D., McCallum, B., and Clear, R. (2002). Comparison of Canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia* 153, 209–215. doi: 10.1023/A:1014940523921
- Giraldo, M. C., and Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 800–814. doi: 10.1038/nrmicro3119
- Goswami, R. S., and Kistler, H. C. (2005). Pathogenicity and *in planta* mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* 95, 1397–1404. doi: 10.1094/PHYTO-95-1397
- Hallen-Adams, H. E., Wenner, N., Kulda, G. A., and Trail, F. (2011). Deoxynivalenol biosynthesis-related gene expression during wheat kernel colonization by *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 101, 1091–1096. doi: 10.1094/PHYTO-01-11-0023
- Hao, G., McCormick, S., Vaughan, M., Naumann, T., Kim, H.-S., Proctor, R. H., et al. (2019). *Fusarium graminearum* arabinanase (Arb93B) enhances wheat head blight susceptibility by suppressing plant immunity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 32, 888–898. doi: 10.1094/MPMI-06-18-0170-R
- Harris, L. J., Balcerzak, M., Johnston, A., Schneiderman, D., and Ouellet, T. (2016). Host-preferential *Fusarium graminearum* gene expression during infection of wheat, barley, and maize. *Fungal Biol.* 120, 111–123. doi: 10.1016/j.funbio.2015.10.010
- He, X., Dreisigacker, S., Singh, R. P., and Singh, P. K. (2019). Genetics for low correlation between *Fusarium* head blight disease and deoxynivalenol (DON) content in a bread wheat mapping population. *Theor. Appl. Genet.* 132, 2401–2411. doi: 10.1007/s00122-019-03362-9
- Jia, L.-J., and Tang, W.-H. (2015). The omics era of *Fusarium graminearum*: opportunities and challenges. *New Phytol.* 207, 1–3. doi: 10.1111/nph.13457
- Jones, D. A., Bertazzoni, S., Turo, C. J., Syme, R. A., and Hane, J. K. (2018). Bioinformatic prediction of plant-pathogenicity effector proteins of fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 46, 43–49. doi: 10.1016/j.mib.2018.01.017
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 41–60. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436
- Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K., et al. (1998). Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101. *J. Biol. Chem.* 273, 1654–1661. doi: 10.1074/jbc.273.3.1654
- King, R., Urban, M., Hammond-Kosack, M. C. U., Hassani-Pak, K., and Hammond-Kosack, K. E. (2015). The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics* 16:544. doi: 10.1186/s12864-015-1756-1
- Krijger, J.-J., Thon, M. R., Deising, H. B., and Wiersel, S. G. R. (2014). Compositions of fungal secretomes indicate a greater impact of phylogenetic history than lifestyle adaptation. *BMC Genomics* 15:722. doi: 10.1186/1471-2164-15-722
- Kumar, L., and Futschik, M. E. (2007). Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformatics* 2, 5–7. doi: 10.6026/97320630002005
- Lamper, C., Téren, J., Bartók, T., Komoróczy, R., Mesterházy, Á., and Sági, F. (2000). Predicting DON contamination in *Fusarium*-infected wheat grains via determination of the ergosterol content. *Cereal Res. Commun.* 28, 337–344.
- Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., and Zivy, M. (2017). XiTandemPipeline: a tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification. *J. Proteome Res.* 16, 494–503. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00632
- Laurent, B., Moinard, M., Spataro, C., Ponts, N., Barreau, C., and Foulongne-Oriol, M. (2017). Landscape of genomic diversity and host adaptation in *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics* 18:203. doi: 10.1186/s12864-017-3524-x
- Laurent, B., Palaiokostas, C., Spataro, C., Moinard, M., Zehraoui, E., Houston, R. D., et al. (2018). High-resolution mapping of the recombination landscape of the phytopathogen *Fusarium graminearum* suggests two-speed genome evolution. *Mol. Plant Pathol.* 19, 341–354. doi: 10.1111/mpp.12524
- Liu, Y., Li, M., Bian, K., Guan, E., Liu, Y., and Lu, Y. (2019). Reduction of deoxynivalenol in wheat with superheated steam and its effects on wheat quality. *Toxins* 11:E414. doi: 10.3390/toxins11070414
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., et al. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 513–545. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623
- Lowe, R. G. T., McCorkelle, O., Bleackley, M., Collins, C., Faou, P., Mathivanan, S., et al. (2015). Extracellular peptidases of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Front. Plant Sci.* 6:962. doi: 10.3389/fpls.2015.00962
- Lu, S., and Edwards, M. C. (2015). Genome-wide analysis of small secreted cysteine-rich proteins identifies candidate effector proteins potentially involved in *Fusarium graminearum*-wheat interactions. *Phytopathology* 106, 166–176. doi: 10.1094/PHYTO-09-15-0215-R
- McCormick, S. P., Alexander, N. J., Trapp, S. E., and Hohn, T. M. (1999). Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5252–5256.
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., et al. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Dis.* 96, 1712–1728. doi: 10.1094/PDIS-03-12-0291-FE

- McMullen, M., Jones, R., and Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81, 1340–1348. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.12.1340
- Mesterházy, Á. (2002). Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to Fusarium head blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 675–684. doi: 10.1023/A:1020631114063
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Kászonyi, G., Varga, M., Tóth, B., and Varga, J. (2005). Common resistance to different *Fusarium* spp. causing Fusarium head blight in wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 112, 267–281. doi: 10.1007/s10658-005-2853-9
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Mirocha, C. G., and Komoróczy, R. (1999). Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breed.* 118, 97–110. doi: 10.1046/j.1439-0523.1999.118002097.x
- Nguyen, T., Kröger, C., Bönnighausen, J., Schäfer, W., and Bormann, J. (2013). The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production, and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 1378–1394. doi: 10.1094/MPMI-04-13-0125-R
- Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., et al. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53, 17–37. doi: 10.1006/pmpp.1998.0170
- Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.* 58, 409–424. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x
- Parry, D. W., Jenkinson, P., and McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathol.* 44, 207–238. doi: 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x
- Pasquet, J.-C., Changenet, V., Macadré, C., Boex-Fontvieille, E., Soulhat, C., Bouchabké-Coussa, O., et al. (2016). A *Brachypodium* UDP-Glycosyltransferase confers root tolerance to deoxynivalenol and resistance to *Fusarium* infection. *Plant Physiol.* 172, 559–574. doi: 10.1104/pp.16.00371
- Paul, P. A., Lipps, P. E., and Madden, L. V. (2005). Relationship between visual estimates of Fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grain: a meta-analysis. *Phytopathology* 95, 1225–1236. doi: 10.1094/PHYTO-95-1225
- Peters, J. S., Calder, B., Gonnelli, G., Degroove, S., Rajanarifara, E., Mulder, N., et al. (2016). Identification of quantitative proteomic differences between *Mycobacterium tuberculosis* lineages with altered virulence. *Front. Microbiol.* 7:813. doi: 10.3389/fmicb.2016.00813
- Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F., and Macdonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 78, 21–37. doi: 10.1016/S0377-8401(98)00278-8
- Proctor, R. H., Desjardins, A. E., McCormick, S. P., Plattner, R. D., Alexander, N. J., and Brown, D. W. (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 691–698. doi: 10.1023/A:1020637832371
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., and McCormick, S. P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 593–601. doi: 10.1094/MPMI-8-0593
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., and McCormick, S. P. (1997). Restoration of wild-type virulence to *Tris* disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology* 143, 2583–2591. doi: 10.1099/0022287-143-8-2583
- Puri, K. D., Yan, C., Leng, Y., and Zhong, S. (2016). RNA-Seq revealed differences in transcriptomes between 3ADON and 15ADON populations of *Fusarium graminearum* in vitro and in planta. *PLoS One* 11:e0163803. doi: 10.1371/journal.pone.0163803
- Qin, J., Wang, G., Jiang, C., Xu, J.-R., and Wang, C. (2015). Fgk3 glycogen synthase kinase is important for development, pathogenesis, and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Sci. Rep.* 5:8504. doi: 10.1038/srep08504
- Quirino, B. F., Candido, E. S., Campos, P. F., Franco, O. L., and Krüger, R. H. (2010). Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. *Phytochemistry* 71, 351–362. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.11.005
- R Core Team, (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Saville, R. J., Gosman, N., Burt, C. J., Makepeace, J., Steed, A., Corbitt, M., et al. (2012). The “Green Revolution” dwarfing genes play a role in disease resistance in *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *J. Exp. Bot.* 63, 1271–1283. doi: 10.1093/jxb/err350
- Selin, C., de Kievit, T. R., Belmonte, M. F., and Fernando, W. G. D. (2016). Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges. *Front. Microbiol.* 7:600. doi: 10.3389/fmicb.2016.00600
- Shin, S., Son, J.-H., Park, J.-C., Kim, K.-H., Yoon, Y.-M., Cheong, Y.-K., et al. (2018). Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from wheat kernels in Korea. *Plant Pathol.* J. 34, 347–355. doi: 10.5423/PPJ.OA.01.2018.0013
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Dodds, P. N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K. B., et al. (2016). EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol.* 210, 743–761. doi: 10.1111/nph.13794
- Steiner, B., Buerstmayr, M., Michel, S., Schweiger, W., Lemmens, M., and Buerstmayr, H. (2017). Breeding strategies and advances in line selection for Fusarium head blight resistance in wheat. *Trop. Plant Pathol.* 42, 165–174. doi: 10.1007/s40858-017-0127-7
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 233–263. doi: 10.1146/annurev.phyto.112408.132637
- Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., and Coaker, G. (2016). Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 419–441. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100204
- Valot, B., Langella, O., Nano, E., and Zivy, M. (2011). MassChroQ: a versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics* 11, 3572–3577. doi: 10.1002/pmic.201100120
- Van der Plank, J. E. (1968). *Disease Resistance in Plants*. New York, NY: Academic Press.
- van Ginkel, M., and Scharen, A. L. (1988). Host-pathogen relationships of wheat and *Septoria tritici*. *Phytopathology* 78, 762–766. doi: 10.1094/Phyto-78-762
- van Schie, C. C. N., and Takken, F. L. W. (2014). Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 551–581. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045854
- Vizcaino, J. A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dianes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., et al. (2016). 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44, D447–D456. doi: 10.1093/nar/gkv1145
- Voigt, C. A., von Scheidt, B., Gácsér, A., Kassner, H., Lieberei, R., Schäfer, W., et al. (2007). Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression. *Eur. J. Plant Pathol.* 117, 1–12. doi: 10.1007/s10658-006-9063-y
- Walter, S., Nicholson, P., and Doohan, F. M. (2010). Action and reaction of host and pathogen during Fusarium head blight disease. *New Phytol.* 185, 54–66. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03041.x
- Woolhouse, M. E. J., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., and Levin, B. R. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat. Genet.* 32, 569–577. doi: 10.1038/ng1202-569
- Xu, X., and Nicholson, P. (2009). Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 83–103. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081737
- Xue, A. G., Armstrong, K. C., Voldeng, H. D., Fedak, G., and Babcock, C. (2004). Comparative aggressiveness of isolates of *Fusarium* spp. causing head blight on wheat in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 26, 81–88. doi: 10.1080/07060660409507117
- Yi, M., and Valent, B. (2013). Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 587–611. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-172916

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.

Copyright © 2019 Fabre, Bormann, Urbach, Roche, Langin and Bonhomme. 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.

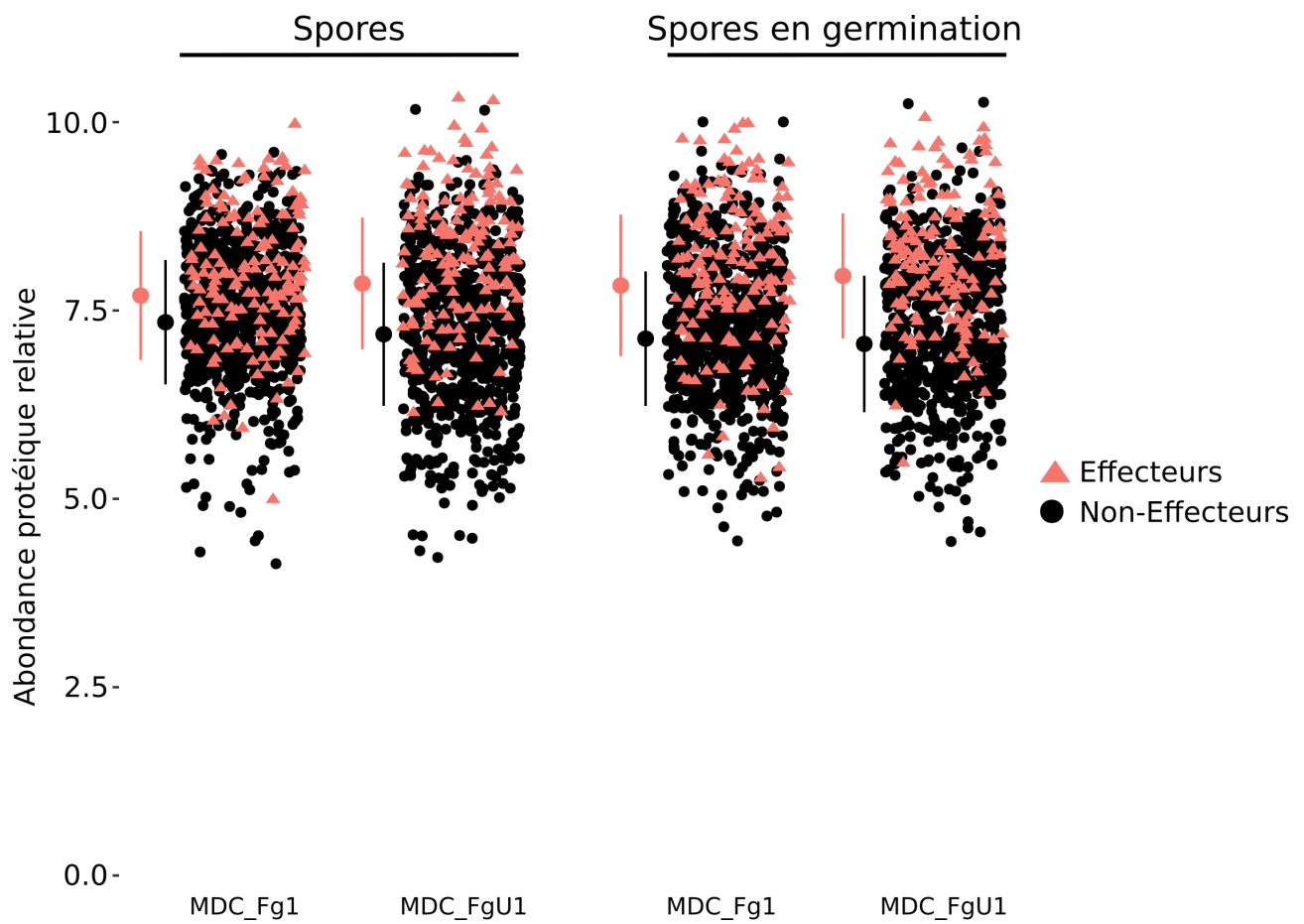


Figure 1 : Représentation des abondances relatives des protéines quantifiées dans les spores et spores en germination des souches MDC_Fg1 et MDC_FgU1. Les protéines prédites comme étant des effecteurs sont représentées par des triangles rouges et les protéines non prédites comme effecteurs sont indiquées par des noirs. L'abondance moyenne pour chacun des deux groupes est indiquée sur la gauche de chaque graphique en conservant le même code couleur.

Résultats complémentaires

*a) Analyse des spécificités protéomiques des spores de deux souches de *F. graminearum* d'agressivité contrastée*

Afin d'apporter des résultats complémentaires concernant les spécificités protéomiques liées aux fonds génétiques fongiques, l'analyse du contenu protéique des spores des deux souches les plus contrastées en termes d'agressivité a été réalisée. La procédure expérimentale de cette analyse est décrite dans le Matériels et Méthodes supplémentaire 1.

En premier lieu, l'analyse du contenu protéique des spores de MDC_Fg1 a permis l'identification de 986 protéines contre 891 pour les spores de MDC_FgU1, ce qui correspond à 7,5 % et 6,8 % de leur protéome théorique respectif. Dans les spores en germination, 959 et 869 protéines ont pu être identifiées pour MDC_Fg1 et MDC_FgU1 respectivement. L'évaluation des effectomes des deux souches a permis l'identification de 157 et 156 effecteurs dans les spores des de MDC_Fg1 et MDC_FgU1 et de 163 et 157 effecteurs dans les spores en germination. Les contenus protéiques totaux ainsi que les premiers quartiles protéiques en termes d'abondance des deux stades ontogéniques des deux souches se sont révélés enrichis en effecteurs (E-value < 10E-80 pour chaque test effectué) (Figure_1). En second lieu, la recherche de protéines souches-spécifiques a permis l'identification d'un total de 117 et 22 protéines identifiées uniquement dans les spores de la souche MDC_Fg1 et MDC_FgU1 contre 122 et 32 protéines dans les spores en germination. La même analyse effectuée sur les effectomes des spores des deux souches a permis d'identifier 10 effecteurs spécifiques à MDC_Fg1 contre 9 spécifiques des spores de MDC_FgU1. Pour les spores en germination, 6 effecteurs n'ont été identifiés que dans les échantillons MDC_Fg1 et 1 uniquement dans les échantillons MDC_FgU1.

L'expérimentation présentée au cours de cette partie présente plusieurs limites notables qu'il est important de considérer avant l'exploitation des résultats. La première limite réside dans la distinction même des spores et des spores en germination qui est une étape critique de l'analyse et très difficilement maîtrisable. Dans les conditions dans lesquelles cette étude a été effectuée, le temps d'incubation des spores pour obtenir nos échantillons de spores en germination a été déterminé en

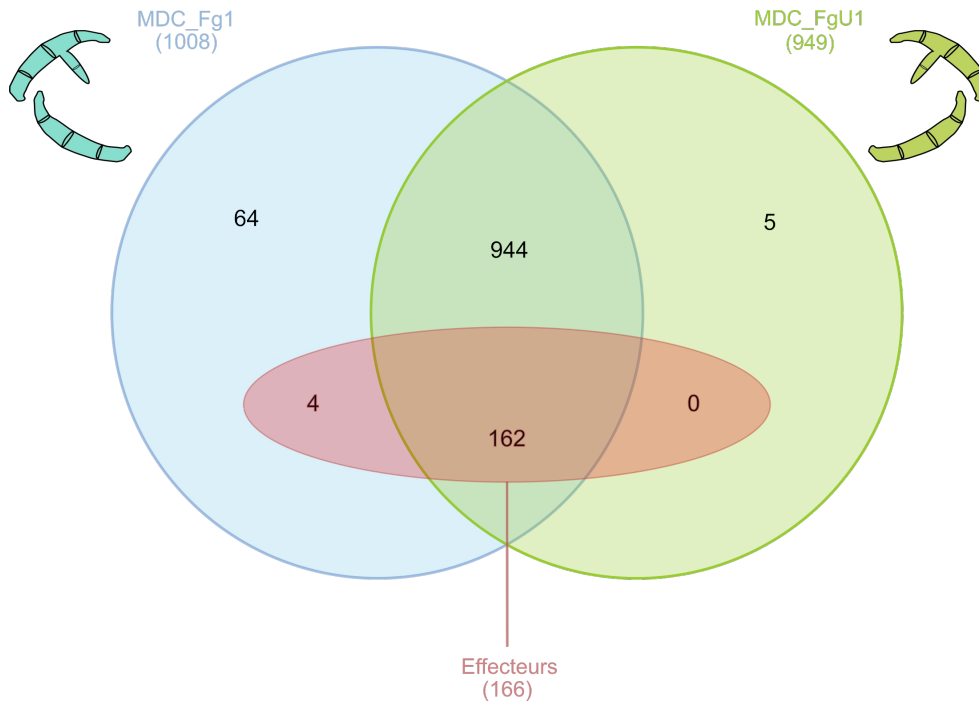


Figure 2 : Nombre de protéines identifiées dans les protéomes des spores et spores en germination des souches MDC_Fg1 et MDC_FgU1. Pour chaque protéine identifiée, le diagramme de Venn représente le nombre de protéines spécifiques de la souche dans la partie externe des cercles et celles identifiées comme communes aux deux souches dans l'intersection des deux cercles. Sans distinction du stade de développement de l'agent pathogène, les protéomes de MDC_Fg1 et MDC_FgU1 sont indiqués en bleu et en vert respectivement tandis que les effecteurs identifiés dans les deux protéomes ont été indiqués en rouge.

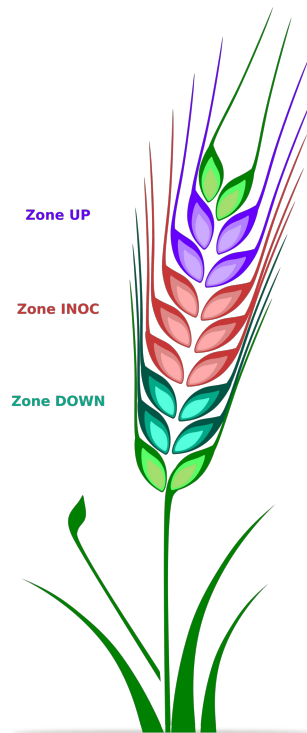


Figure 3 : Représentation schématique des différentes zones de l'épi de blé analysées. La zone rouge, constituée de trois épillets de chaque côté de l'épi, constitue la zone inoculée avec les spores de *F. graminearum* (Zone INOC). Les zones en violet et en bleu constituent les zones périphériques UP et DOWN respectivement pour lesquelles aucune inoculation n'a été réalisée. Chacune de ces deux zones est constituée de deux épillets de chaque côté de l'épi.

fonction du pourcentage de germination visible en microscopie. Cette méthode est très critiquable puisque les spores d'une même souche ne germent pas toutes à la même vitesse. De manière totalement arbitraire, nous avons donc choisi de débiter l'extraction des protéines lorsque plus de 80 % des spores étaient en germination afin d'avoir le meilleur compromis possible entre le taux de spores non germées dans nos échantillons et celui des spores en germination sans pour autant qu'elles aient atteint le stade de formation de leur mycélium. Ainsi, en combinant les deux stades ontogéniques pour la comparaison des souches, on observe que sur les 1013 protéines identifiées au total, 944 (≈ 93 % des protéines totales) se sont révélées communes aux deux souches (Figure_2). Seules 64 protéines n'ont été identifiées que dans les échantillons MDC_Fg1 et 5 uniquement dans les échantillons MDC_FgU1. Ce premier résultat laisse supposer que la grande majorité du contenu protéique stockée dans la spore est identique entre les deux souches d'agressivité contrastée. Cette observation est appuyée par la répartition des effecteurs dans les deux protéomes puisque sur les 166 effecteurs prédits identifiés dans les échantillons, 162 (≈ 97 %) sont communs entre les deux souches sans distinction de leur stade de développement (Figure_2). Enfin, la seconde limite notable provient de la nature même des spores qui sont des structures difficiles à briser pour l'extraction des protéines. Techniquement, cela se traduit par une importante difficulté à obtenir de fortes concentrations protéiques qui peut être à l'origine de variances très importantes rendant difficile la détection des protéines de faibles abondances. Par exemple, plusieurs effecteurs spécifiques à la spore de MDC_Fg1 n'ont pas été identifiés dans la spore en germination de cette même souche, quand d'autres effecteurs identifiés dans les spores de MDC_Fg1 et non dans les spores de MDC_FgU1 ont été trouvés dans les spores en germination de cette dernière souche. Cette observation nous permet ainsi de nous questionner sur la valeur réelle à accorder aux protéines souches-spécifiques identifiées étant donné que ces dernières correspondent systématiquement aux protéines présentant les plus faibles abondances détectées lors de l'analyse.

Ces résultats permettent ainsi de supposer que le contenu protéique des spores est très similaire entre les deux souches testées au cours de cette expérimentation, notamment vis-à-vis des effecteurs et que ces derniers sont non seulement surreprésentés numériquement dans les contenus des spores et

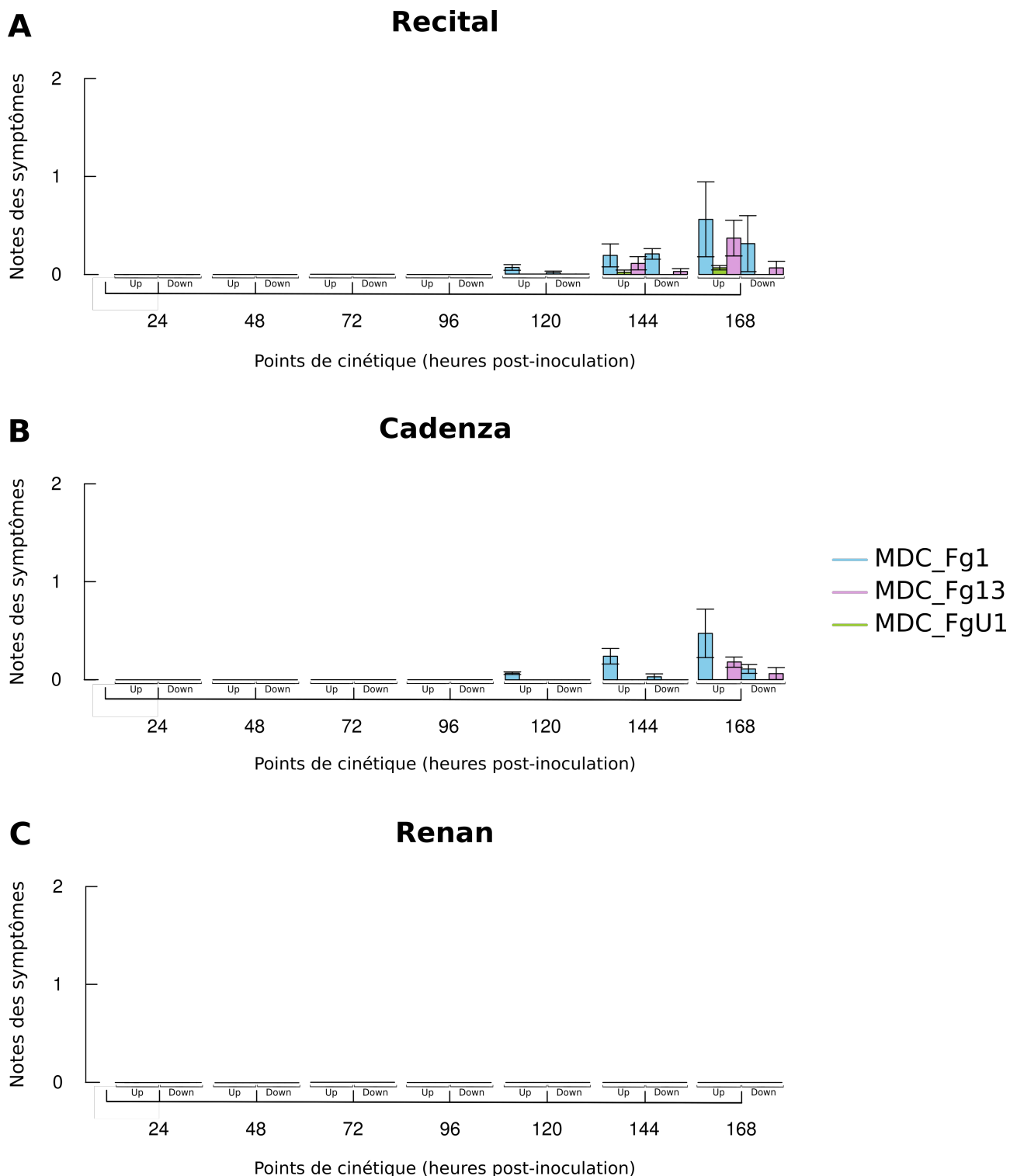


Figure 4 : Dynamique de l'évolution de la sévérité des symptômes induits par les trois souches de *F. graminearum* au niveau des deux zones périphériques des trois cultivars de blé étudiés. Les graphiques en bâton représentent l'évolution de la sévérité des symptômes observée pour MDC_Fg1 (barres bleues), MDC_Fg13 (barres roses) et MDC_FgU1 (barres vertes) sur les trois variétés de blé. Les valeurs correspondent aux moyennes des scores de symptômes de six réplicats biologiques jusqu'à 72hpi et aux moyennes de trois réplicats biologiques de 96hpi à 168hpi. Chaque réplicat biologique a été caractérisé à partir de trois épis. Les barres d'erreur indiquent l'intervalle de confiance à 95% calculé pour chaque point dans le temps indépendamment.

spores en germination des deux souches, mais qu'ils sont également significativement distribués parmi les protéines les plus abondantes (Figure_2). Conjointement, ces résultats permettent d'appuyer notre hypothèse de départ selon laquelle les spores de *Fusarium graminearum* contiennent un bagage protéique complet pour initier l'infection de la plante et la compléter en révélant qu'elle reste valable lors de l'étude de deux souches d'agressivité très contrastée.

b) Analyse de la sévérité des symptômes en zones non-inoculées des épis

Les résultats concernant la notation des symptômes décrits au cours de ce chapitre ont été générés à partir de l'analyse des épillets inoculés avec les différentes souches de *F. graminearum*. Or, lors de la notation des symptômes au niveau des zones inoculées (Zone INOC), l'apparition de symptômes a également pu être observée sur les épillets périphériques situés juste au-dessus (Zone UP) et juste au-dessous (Zone DOWN) de cette zone inoculée (Figure_3). Pour ces deux zones, la notation des symptômes a été réalisée en suivant la même méthodologie que celle précédemment décrite pour la zone INOC. Les premiers symptômes visibles ont été observés à partir de 120 hpi en zone UP et DOWN lors de l'interaction entre la souche MDC_Fg1 et Récital et au même point de cinétique uniquement en zone UP lors de l'interaction de cette même souche avec le cultivar Cadenza (Figure_4). Concernant la souche MDC_Fg13, les premiers symptômes ont été notés dans les deux zones périphériques à 144 hpi et 168 hpi sur les cultivars Récital et Cadenza respectivement (Figure_4). Pour la souche MDC_FgU1, l'apparition de symptômes hors zone INOC n'a été observée que sur la zone UP du cultivar Récital à partir de 144 hpi. Aucun symptôme n'a pu être observé au niveau de ces deux zones pour le cultivar Renan (Figure_4). Sur les deux cultivars présentant des symptômes en zones UP et DOWN, la souche MDC_Fg1 induit non seulement les réponses symptomatiques les plus précoces, mais c'est également la souche qui induit la plus forte sévérité de symptômes. De plus, pour les trois souches fongiques, la zone UP semble présenter une sévérité de symptômes plus importante que la zone DOWN.

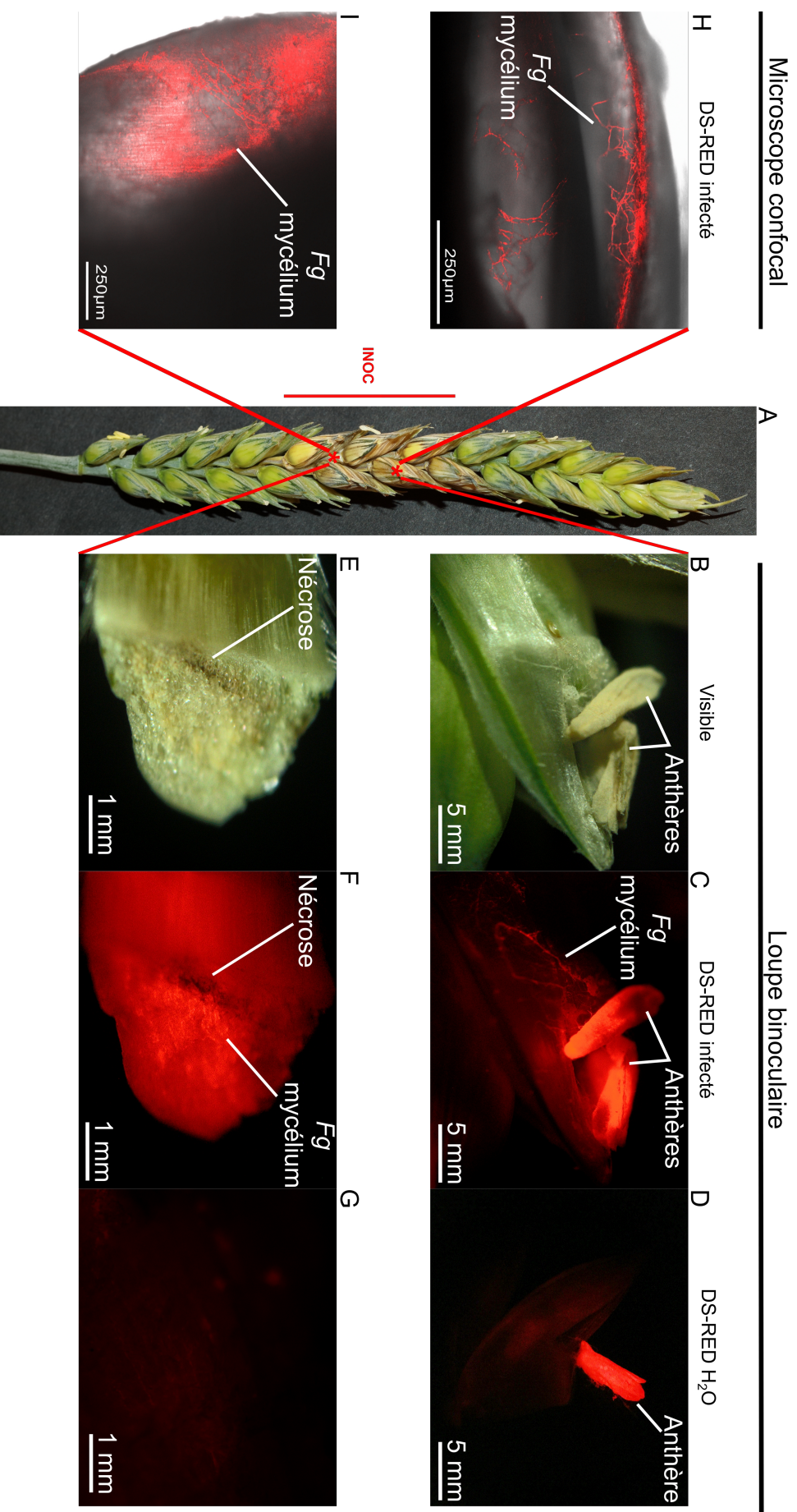


Figure 5 : Observations à la loupe binoculaire et au microscope confocal de l'épillet et du rachis de la zone inoculée avec une souche de *F. graminearum* marquée DsRed à 168 hpi. (A) Photographie d'un épi de blé inoculé avec *Fusarium graminearum* illustrant la zone INOC observée et les étoiles rouges indiquent les tissus observés avec la loupe binoculaire et le microscope confocale. (B) Photographie en lumière blanche de l'épillet infecté et observée avec la loupe binoculaire. (C) Photographie en lumière verte (583 nm) de l'épillet infecté et observée à la loupe binoculaire. (D) Photographie en lumière verte (583 nm) d'un épillet de blé inoculé à l'eau et observé à la loupe binoculaire. (E) Photographie en lumière blanche de la section infectée du rachis située dans la zone INOC observée à la loupe binoculaire. (F) Photographie en lumière verte (583 nm) du grain infecté observé en microscopie confocale. (G) Photographie en lumière verte (583 nm) de la section du rachis située dans la zone INOC et observée au microscope confocal. (H) Photographie en lumière verte (583 nm) du rachis infecté observé en microscopie confocale. (I) Photographie en lumière verte (583 nm) de la section du rachis située dans la zone INOC et observée au microscope confocal.

c) Analyse de la colonisation de l'épi par le mycélium fongique

L'apparition de symptômes au niveau des épillets non inoculés pose ainsi question sur les causes de cette réponse symptomatique. Une analyse qPCR, réalisée en suivant la même procédure que celle décrite précédemment, a été effectuée sur les zones UP et DOWN des échantillons récoltés à 168 hpi. Cette analyse n'a pas été en mesure de détecter la présence du champignon dans les deux zones périphériques. Pour aller plus loin, une analyse complémentaire de microscopie dont la procédure expérimentale est décrite dans le Matériels et Méthodes Supplémentaire 2, a été réalisée à 168 hpi au niveau des épillets inoculés pour identifier la localisation du champignon dans les différents tissus de la plante (*i.e.* glume, embryon, rachis) et à 240 hpi au niveau des Zone UP et DOWN du cultivar de blé Cadenza inoculé avec une souche marquée Ds-Red d'agressivité comparable à MDC_Fgl (Quarantin *et al.*, 2016).

La première observation, réalisée à 168 hpi sur les épillets inoculés, a permis d'observer du mycélium fongique situé sur le grain des épillets inoculés (Figure_5, B-H). À ce même stade ontogénique, l'observation du rachis par microscopie confocale sur une coupe longitudinale a révélé la présence du champignon à l'intérieur du rachis entre deux épillets inoculés (Figure_5, I). La même analyse réalisée à l'aide de la loupe binoculaire sur une coupe transversale du rachis a permis de visualiser une zone symptomatique à l'intérieur du rachis dans laquelle le champignon n'a pas été détecté (Figure_5, F). Cette première observation a ainsi permis d'identifier plus précisément la localisation du champignon au sein des différents tissus de la zone inoculée. À ce point de cinétique, le champignon n'a pas été observé dans les épillets ni dans le rachis des zones UP et DOWN, confirmant les résultats obtenus par qPCR. La même analyse, réalisée sur les zones de l'épi non-inoculées et sur la zone inoculée (données non présentées) à 240 hpi a permis l'observation d'un signal de fluorescence à l'intérieur du rachis en zone DOWN (Figure_6, F), mais pas dans la zone UP (Figure_6, C) ni à l'intérieur des épillets pour ces deux zones (données non présentées).

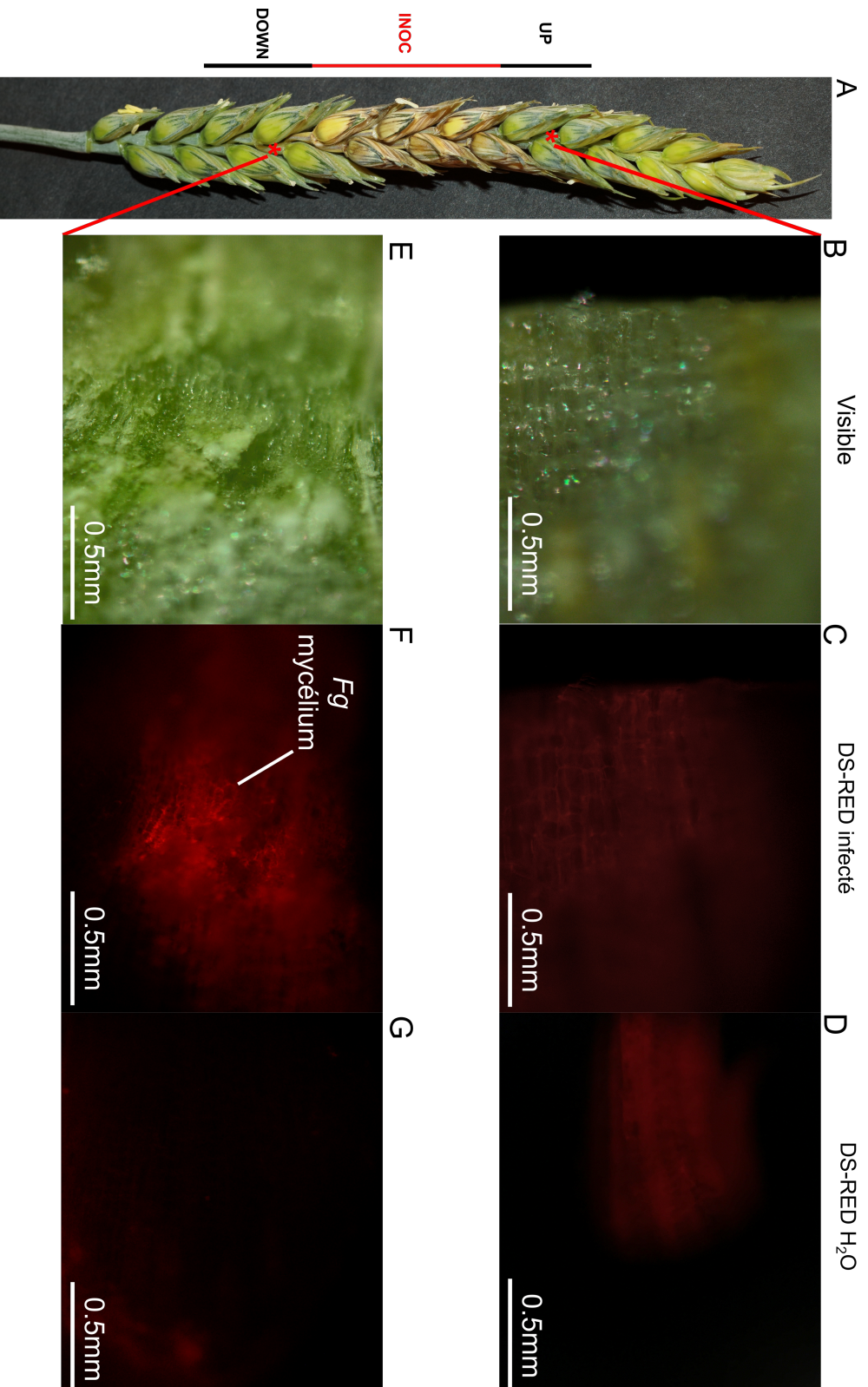


Figure 6 : Observations à la loupe binoculaire du rachis en zones non inocuées UP et DOWN à 240 hpi. (A) Photographie d'un épi de blé inoculé avec *Fusarium graminearum* illustrant les trois zones d'analyse UP, DOWN et INOC. Les étoiles rouges indiquent les tissus de l'épi de blé qui ont été observés. (B) Photographie en lumière blanche de la section du rachis située dans la zone UP de l'épi inoculé avec *F. graminearum* et observée avec la loupe binoculaire. (C) Photographie en lumière verte (583 nm) de la section du rachis située dans la zone UP de l'épi inoculé avec *F. graminearum* et observée avec la loupe binoculaire. (D) Photographie en lumière blanche de la section du rachis située dans la zone DOWN de l'épi inoculé avec *F. graminearum* et observée avec la loupe binoculaire. (E) Photographie en lumière verte (583 nm) de la section du rachis située dans la zone DOWN de l'épi inoculé avec *F. graminearum* et observée avec la loupe binoculaire. (F) Photographie en lumière verte (583 nm) de la section du rachis située dans la zone DOWN de l'épi inoculé avec *F. graminearum* et observée avec la loupe binoculaire. (G) Photographie en lumière verte (583 nm) de la section du rachis située dans la zone DOWN de l'épi inoculé avec de l'eau et observée avec la loupe binoculaire.

Conclusion

L'objectif de cet axe était d'apporter de nouvelles informations sur le déterminisme de l'agressivité de *Fusarium graminearum* lors de son interaction avec le blé tendre en questionnant les liens potentiels entre les caractéristiques intrinsèques aux trois souches de *F. graminearum* avec leur agressivité respective, en tenant compte de l'impact du fond génétique de blé inoculé. Cette analyse a tout d'abord été réalisée via le suivi de trois variables classiquement utilisées pour la détermination de l'agressivité de *F. graminearum* (i.e. la sévérité des symptômes induits par les souches, le développement de la masse fongique *in planta* et la dynamique de production des DON des différentes souches). Individuellement, ces trois variables ont permis d'obtenir le même classement des trois souches, mais aucune corrélation évidente n'a pu être trouvée entre elles. À titre d'exemple, une même quantité de masse fongique des trois souches à 72 hpi semblait produire une quantité de DON et une sévérité de symptômes différente chez les trois cultivars de blé. La faible corrélation de ces trois paramètres avait déjà été identifiée par un grand nombre d'études antérieures (Alvarez *et al.*, 2010 ; Bai *et al.*, 2001 ; Birzele *et al.*, 2002 ; Champeil *et al.*, 2004 ; Hallen-Adams *et al.*, 2011 ; He *et al.*, 2019), suggérant que la production de mycotoxines et la quantité de masse fongique au sein des tissus de blé ne sont pas des paramètres suffisants pour expliquer finement ce qui détermine la sévérité des symptômes. Cette observation est appuyée par la non-détection de matériel fongique en microscopie et en qPCR dans les zones non inoculées qui présentaient toutefois des symptômes visibles. Concernant les zones non inoculées, les expérimentations effectuées au cours de ce travail ne permettent pas de déterminer les causes de l'apparition des symptômes. Une explication pourrait provenir de la diffusion des DON et/ou des effecteurs fongiques de la zone inoculée jusque dans les zones périphériques via la montée de sève ou en passant par le compartiment apoplastique. Cette hypothèse pourrait apporter une explication au fait que la sévérité des symptômes dans les Zone UP soit systématiquement supérieure à celle observée en Zone DOWN alors que le champignon semble plutôt migrer vers la base de l'épi.

Les variations au sein des protéomes respectifs des trois souches en contexte d'infection semblent être un facteur explicatif plus pertinent vis-à-vis du développement de la maladie. Le premier résultat original obtenu lors de cette analyse réside dans la très forte similarité qualitative des protéomes fongiques, que ce soit *in planta* ou dans les spores du champignon. Pour l'ensemble des combinaisons souches / cultivars, près de 100% des protéines identifiées, comprenant l'ensemble des effecteurs prédits, se sont révélées communes aux différents échantillons. Ce résultat suggère ainsi que les trois souches utilisent le même ensemble de protéines lors de l'initiation de l'infection des trois cultivars de blé et que les différences d'agressivité observées pour les trois souches ne sont pas dues à l'existence de protéines spécifiques à un fond génétique donné. Seule l'analyse quantitative des protéomes a permis de différencier les trois souches. En effet, près de 80 % des protéines identifiées présentaient des variations d'abondance significatives expliquées par au moins un des facteurs testés. Les effecteurs fongiques prédits se sont révélés particulièrement bien corrélés à l'agressivité des souches puisque l'ensemble des protéines effectrices a été identifié comme plus abondant dans les échantillons inoculés avec la souche la plus agressive MDC_Fg1. Ce résultat suggère ainsi que les différences d'agressivité observées pourraient s'expliquer par les différences d'abondance de protéines communes aux trois souches et plus particulièrement à celles des effecteurs ayant un effet quantitatif sur la pathogénicité de *F. graminearum* au même stade de développement.

Concernant, l'effet du fond génétique de l'hôte infecté, ce dernier s'est révélé très faible, voire non significatif vis-à-vis des variances observées dans l'agressivité des souches. Seule l'analyse de l'apparition des symptômes dans les zones périphériques a montré un fort effet du fond génétique de blé. En effet, le cultivar le plus tolérant Renan est le seul pour lequel aucun symptôme n'a pu être observé en dehors de la zone inoculée, ce qui peut questionner sur l'impact de la méthode d'inoculation utilisée lors de cette expérimentation. Mis à part cette observation, quel que soit son degré de sensibilité à la fusariose, le fond génétique de l'hôte n'a qu'un effet mineur sur les variances observées en termes de sévérité des symptômes, de développement de la masse fongique et de production des DON par les différentes souches au niveau des zones inoculées. À l'échelle moléculaire, la puissance supplémentaire fournie par la protéomique a toutefois permis d'identifier

un effet du cultivar sur la variation d'abondance d'environ 200 protéines fongiques. Cependant, l'absence d'effet significatif de l'interaction des facteurs « Souche » et « Cultivar » (appelé *Strain*×*Cultivar*_effect dans ce travail) semble indiquer que les variations des abondances protéiques imputables au fond génétique de l'hôte sont identiques chez les trois souches de *F. graminearum*. Autrement dit, l'effet « Cultivar » induit, soit une amplification ou une diminution de différences d'accumulation déjà existantes entre les souches (*Strain*+*Cultivar*_effect_proteins), soit un effet identique sur la variation d'abondance des protéines des trois souches (*Cultivar*_effect_protein). Ainsi, bien que l'utilisation de seulement trois cultivars de blé et trois souches de *F. graminearum* ne puisse pas représenter toute la variabilité génétique de la sensibilité de l'hôte et de l'agressivité de l'agent pathogène, cette absence d'interaction spécifique, déjà observée dans de précédents travaux (Bruns *et al.*, 2012 ; Ginkel and Scharen, 1988 ; Mesterházy *et al.*, 2005) suggère que les différents fonds génétiques de l'hôte ont une influence similaire sur les trois protéomes de *F. graminearum* et que les spécificités en termes d'accumulation de protéines fongiques et plus particulièrement des effecteurs ne dépendent pas du cultivar hôte.

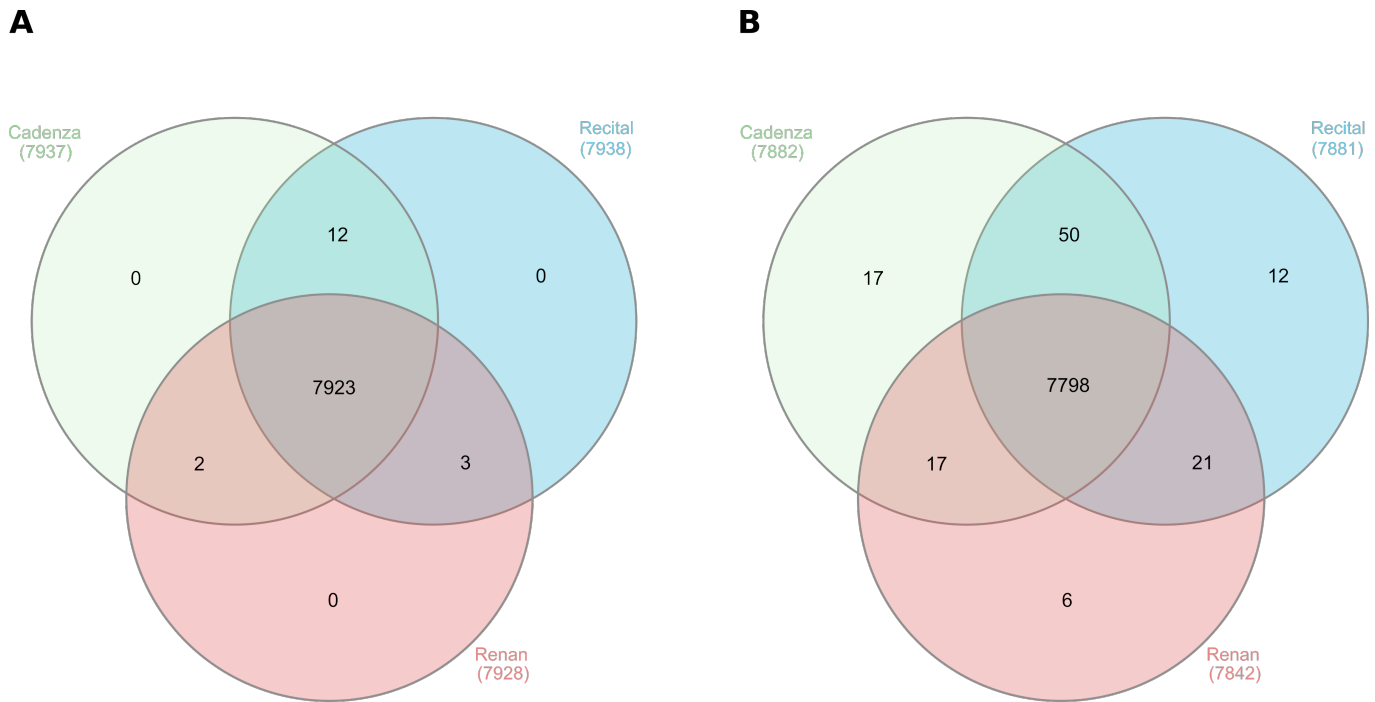


Figure 7 : Nombre de protéines identifiées dans les protéomes des trois cultivars de blé. (A) Pour chaque protéine identifiée dans les échantillons inoculés avec de l'eau, la partie externe des cercles composant le diagramme de Venn représente le nombre de protéines identifiées dans un seul cultivar, l'intersection de deux cercles indique les protéines identifiées dans les protéomes de deux cultivars et l'intersection des trois cercles celles identifiées dans les protéomes des trois cultivars. **(B)** Pour chaque protéine identifiée dans les échantillons inoculés avec *F. graminearum* sans distinction du fond génétique de la souche, la partie externe des cercles composant le diagramme de Venn représente le nombre de protéines identifiées dans un seul cultivar, l'intersection de deux cercles indique les protéines identifiées dans les protéomes de deux cultivars et l'intersection des trois cercles celles identifiées dans les protéomes des trois cultivars. Le cultivar Recital est indiqué en bleu, Cadenza en vert et Renan en rouge.

Axe 2 – Spécificité des réponses de différents fonds génétiques du blé tendre à l'infection de différentes souches de *Fusarium graminearum*

L'étude de la composante protéomique du blé a été réalisée sur les mêmes échantillons que ceux ayant préalablement servi dans la première partie de ce chapitre afin que son analyse puisse être effectuée au regard des observations effectuées pour la composante fongique. Le protocole expérimental utilisé pour l'ensemble des données de cet axe est disponible dans le Matériels et Méthodes supplémentaire 3.

Résultats

a) Caractérisation des protéomes des trois cultivars de blé

Les analyses protéomiques réalisées sur l'ensemble des échantillons inoculés avec *F. graminearum* et témoins ont permis l'identification d'un total de 8577 protéines de blé correspondant approximativement à 8 % du protéome théorique de la plante. Au cours de cette étude, l'analyse qualitative des protéines identifiées révèle que 99,8 % et 98,4 % des protéines sont communes aux trois cultivars de blé dans les échantillons infectés et témoin respectivement (Figure_7). Dans les échantillons inoculés avec *F. graminearum*, aucune protéine spécifique à un cultivar n'a pu être identifiée (Figure_7-A) tandis que 12, 17 et 6 protéines spécifiques ont été identifiées dans les échantillons témoins Récital, Cadenza et Renan respectivement (Figure_7-B).

Parmi l'ensemble des protéines identifiées, 7942 protéines ($\approx 92,6\%$) ont pu être quantifiées. Une analyse en composante principale (ACP) sur l'ensemble des valeurs de quantification de chaque protéine a été réalisée afin d'identifier les facteurs principaux expliquant les différences entre échantillons. La première composante principale de l'analyse, expliquait 35,6 % de l'inertie du nuage tandis que la structuration des données expliquées par le second axe correspondait à 17,1 % de la variance totale. La représentation des échantillons sur un plan à deux dimensions tracé à partir de ces deux composantes a permis de très clairement discriminer les échantillons en fonction du traitement (inoculation avec des spores de *Fusarium graminearum* ou avec de l'eau) et en fonction

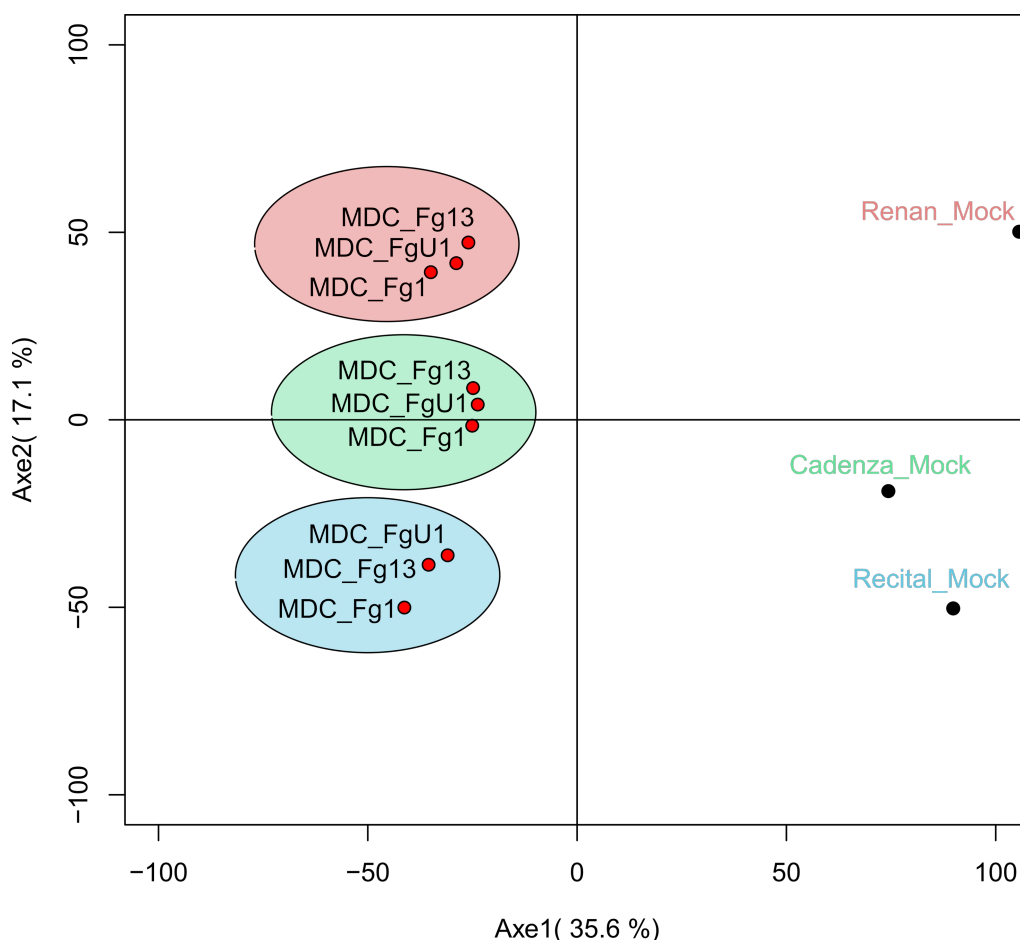


Figure 8 : Représentation de la dispersion des échantillons issue de l'analyse en composante principale. Pour chaque groupe d'échantillon, l'analyse en composantes principales a été réalisée à partir de l'ensemble des valeurs de quantification des protéines de blé. Toutes les valeurs de quantification protéiques ont été rassemblées pour les trois réplicats biologiques de chaque combinaison et les valeurs moyennes ont été utilisées. Le nom de chaque groupe a été indiqué en bleu pour le cultivar Recital, en vert pour le cultivar Cadenza et en rouge pour le cultivar Renan. Les points noirs correspondent aux échantillons témoins inoculés avec de l'eau et les points rouges aux échantillons inoculés avec *F. graminearum*.

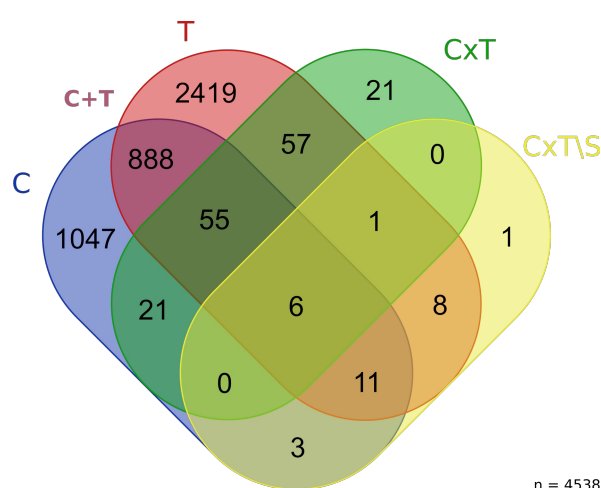


Figure 9 : Nombre de protéines de blé significativement impactées par les différents facteurs de l'ANOVA. Le diagramme de Venn indique le nombre de protéines de blé dont la variation d'abondance est significative pour chaque facteur de l'ANOVA, en bleu (*Cultivar_effect* proteins, FDR < 5 %, p-values > 0.00026), en rouge (*Treatment_effect* proteins : FDR < 5 %, p-values < 0.00045), en violet (*Cultivar+Treatment_effect* proteins : FDR < 5 %, p-values < 0.00002) et en jaune (*Cultivar×Treatment{Strain}_effect* proteins : FDR < 5 %, p-values < 0.000003).

de leur niveau de sensibilité au FHB (Figure_8). L'axe trois expliquant 13,8 % de la variance, discriminait les variétés de blé d'hiver (Récital et Renan) de la variété de printemps (Cadenza).

Plus spécifiquement, une analyse ANOVA a été réalisée afin d'évaluer la contribution des différents facteurs dans les variations d'abondance des protéines de blé. Cette analyse a permis d'identifier, (i) les protéines de blé dont la variation d'abondance était expliquée uniquement par le facteur « Cultivar », (ii) uniquement par le facteur « Traitement », (iii) par l'addition des deux facteurs principaux « Cultivar » et « Traitement », (iv) par l'interaction de ces deux facteurs et, (v) par l'interaction des deux facteurs principaux en tenant compte du facteur « Souche » niché dans le facteur principal « Traitement ». Parmi les 7942 protéines quantifiées, 4538 ($\approx 53\%$) présentaient une variation significative d'abondance expliquée par au moins un des facteurs testés ou leur interaction. En considérant chaque facteur individuellement, un total de 1047 protéines de blé présentaient une variation d'abondance expliquée uniquement par le facteur « Cultivar » (*i.e.* *Cultivar_effect* proteins), 2419 uniquement par le facteur « Traitement » (*i.e.* *Treatment_effect* proteins), 888 par l'addition des deux facteurs principaux (*i.e.* *Cultivar+Treatment_effect* proteins), 154 par l'interaction des deux facteurs principaux (*i.e.* *Cultivar* $\times$ *Treatment_effect* proteins) et 30 par l'interaction des deux facteurs principaux et présentant un effet significatif expliqué par le fond génétique de la souche de *F. graminearum* inoculée (*i.e.* *Cultivar* $\times$ *Treatment*{*Strain*}_effect proteins) (Figure_9).

En considérant l'ensemble des protéines présentant un effet significatif, l'interprétation des résultats de l'ANOVA a permis l'identification de 2119 protéines ($\approx 46,7\%$ des protéines significatives) dont la variation d'abondance est expliquée au moins en partie par le fond génétique du blé (*i.e.* *Cultivar_effect* proteins ; *Cultivar+Treatment_effect* proteins ; *Cultivar* $\times$ *Treatment_effect* proteins et *Cultivar* $\times$ *Treatment*{*Strain*}_effect proteins) et 3491 protéines ($\approx 77\%$) dont la variation d'abondance est expliquée au moins en partie par le facteur « Traitement » (*i.e.* *Treatment_effect* proteins ; *Cultivar+Treatment_effect* proteins ; *Cultivar* $\times$ *Treatment_effect* proteins et *Cultivar* $\times$ *Treatment*{*Strain*}_effect proteins).

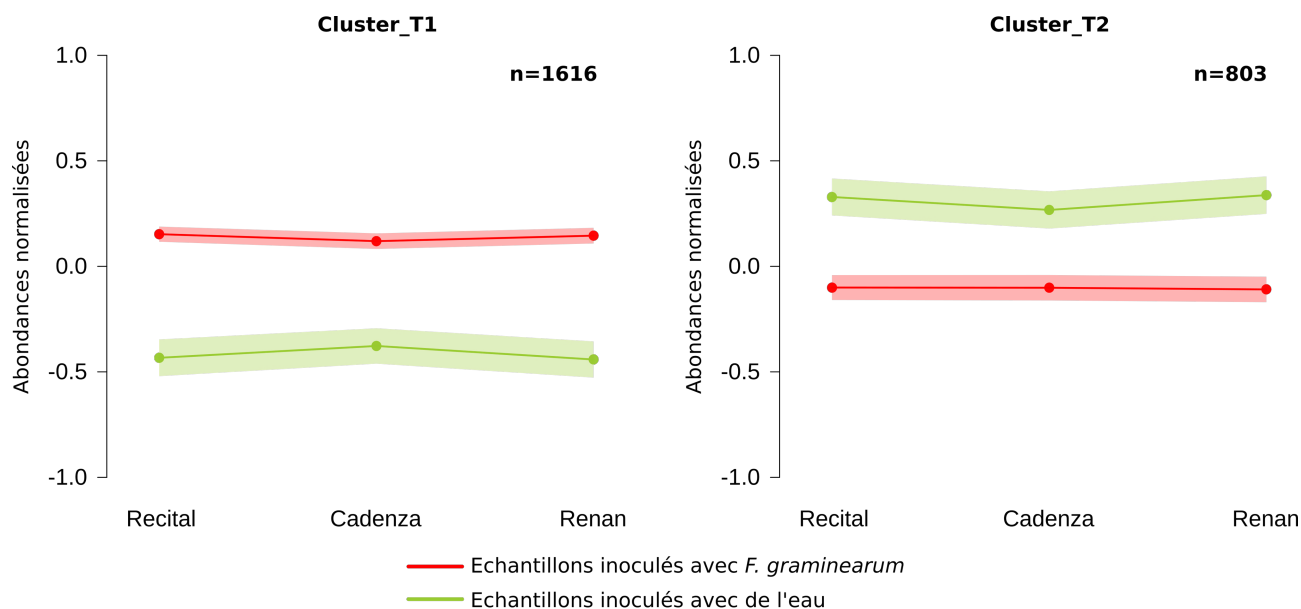


Figure 10 : Représentation des clusters moyens de variation d'abondance des protéines de blé significativement impactées par le facteur « Traitement ». Le clustering a été calculé à l'aide de la méthode fuzzy C-means en utilisant les valeurs z-score d'abondance de chaque protéine. Pour chaque cluster, le profil moyen a été représenté par un graphique linéaire avec le cultivar de blé en axe des abscisse et le code couleur correspond au traitement (rouge : Échantillons inoculés avec *F. graminearum* et vert : Échantillons inoculés avec de l'eau). Le nombre de protéines regroupées dans chaque cluster est indiqué en haut à droite de chaque graphique. Les rubans indiquent l'intervalle de confiance à 95 % et conservent le même code couleur que le tracé de la ligne.

b) Caractérisation des réponses génériques du blé à l'infection par *Fusarium graminearum*

À partir des résultats de l'ANOVA les réponses génériques de la plante à l'infection par *F. graminearum* peuvent être caractérisées par, (i) les *Treatment_effect* proteins, qui correspondent aux protéines présentant une variation d'abondance expliquée par la présence de l'agent pathogène et identique quel que soit le fond génétique du champignon ou du cultivar de blé et (ii) les *Cultivar+Treatment_effect* proteins qui correspondent aux protéines végétales présentant une variation d'abondance significative expliquée par la présence de *F. graminearum* tout en conservant les différences de base en termes d'abondances protéiques entre les cultivars de blé.

Au total, 2419 *Treatment_effect* proteins ont pu être identifiées (Figure_9). La clusterisation de ces protéines a permis la formation de deux clusters cohérents, le premier correspond aux 1616 protéines dont l'abondance augmentait significativement en présence de l'agent phytopathogène (*i.e.* Cluster_T1 ; Figure_10) tandis que le second contenait les 803 protéines dont l'abondance diminuait significativement lors de l'infection (*i.e.* Cluster_T2 ; Figure_10). L'analyse de ces deux clusters a permis l'identification de 117 et 81 fonctions significativement enrichies dans les clusters T1 et T2 respectivement (Table_Supplémentaire_1). En choisissant un seuil d'enrichissement arbitraire (*i.e.* $\text{Log}_2(\text{Abondance}) > 4$), les plus forts enrichissements identifiés dans le cluster_T1 concernaient les fonctions « glutamate-ammonia ligase activity » ; « alpha-mannosidase activity » ; « mannose metabolic process », « metallopeptidase activity » et « malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD⁺) activity » ($\text{adjusted p_value} < 10^{-80}$; $\text{log2Ratio} > 4.5$; Table_Supplémentaire_1). Dans le cluster_T2, les plus forts enrichissements identifiés correspondaient aux fonctions « fructose-bisphosphate aldolase activity », « nucleoside metabolic process » et « peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity » ($\text{adjusted p_value} < 10^{-80}$; $\text{log2Ratio} > 4.1$; Table_Supplémentaire_1).

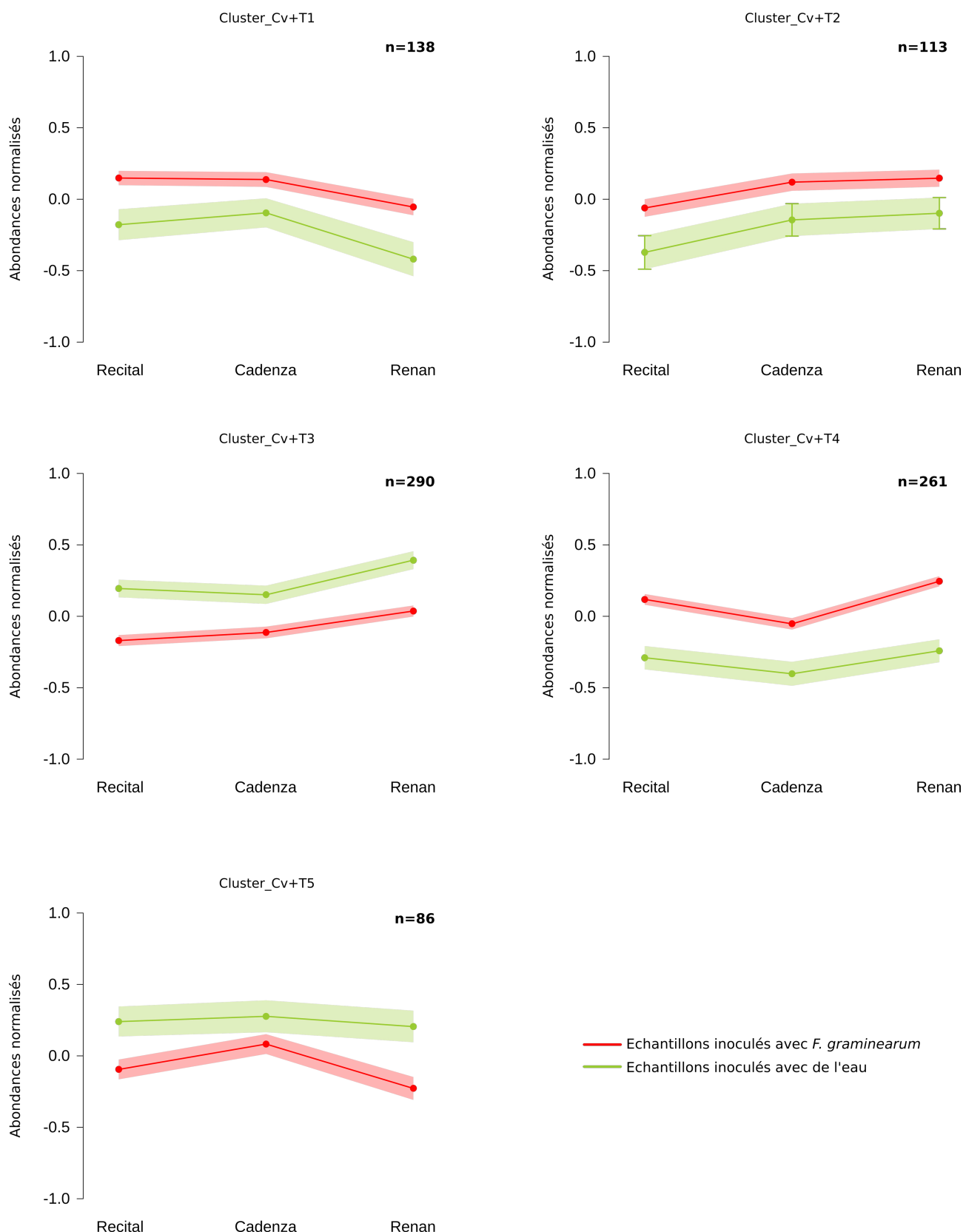


Figure 11 : Représentation des clusters moyens de variation d'abondance des protéines de blé significativement impactées par l'addition des facteurs « Cultivar » et « Traitement ». Le clustering a été calculé à l'aide de la méthode fuzzy C-means en utilisant les valeurs z-score d'abondance de chaque protéine. Pour chaque cluster, le profil moyen a été représenté par un graphique linéaire avec le cultivar de blé en axe des abscisse et le code couleur correspond au traitement (rouge : Échantillons inoculés avec *F. graminearum* et vert : Échantillons inoculés avec de l'eau). Le nombre de protéines regroupées dans chaque cluster est indiqué en haut à droite de chaque graphique. Les rubans indiquent l'intervalle de confiance à 95 % et conservent le même code couleur que le tracé de la ligne.

Concernant les *Cultivar+Treatment_effect* proteins, cinq clusters de variation d'abondance ont pu être identifiés (Cluster_Cv+T1 à Cluster_Cv+T5) contenant entre 86 et 290 protéines (Figure_11). Les protéines contenues dans ces clusters se caractérisaient par une augmentation ou une diminution d'abondance des protéines du blé en présence de *F. graminearum* tout en conservant les différences de base présentes dans les échantillons non-inoculés avec l'agent pathogène. Les clusters Cv+T1, Cv+T2 et Cv+T4, contenant un total de 562 protéines se caractérisaient par une abondance supérieure des protéines dans les échantillons infectés par rapport à celles observées dans les échantillons témoins avec une abondance maximale pour Récital et Cadenza (Cv+T1), Cadenza et Renan (Cv+T2) et Renan uniquement (Cv+T4). Pour les 376 protéines contenues dans les clusters Cv+T3 et Cv+T5, une diminution de l'abondance a été observée dans les échantillons infectés par rapport aux témoins avec une abondance minimale pour Récital et Renan respectivement. En conservant le même seuil d'enrichissement arbitraire que précédemment, un enrichissement en « FMN binding » a été identifié dans le cluster Cv+T1, « transferase activity » et « fatty acid metabolism process » dans le cluster Cv+T2, « photosystem » et « oxydoreductase activity » dans le cluster Cv+T3 et « fatty acid metabolic process » et « 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase activity » dans le cluster Cv+T4. Concernant le cluster Cv+T5, aucun enrichissement significatif n'a pu être détecté au cours de cette étude (Table_Supplémentaire_2).

c) Existe-t-il des protéines permettant de discriminer les cultivars de blé vis-à-vis de leur réponse au FHB ?

Parmi l'ensemble des protéines présentant une variation d'abondance significative, seules les 154 *Cultivar×Treatment_effect* proteins permettaient de distinguer les différents cultivars de blé dans leur réponse à la maladie. Ce groupe de protéine correspondait aux protéines dont la variation d'abondance due à la présence de l'agent pathogène était dépendante du fond génétique du blé inoculé, c'est-à-dire que l'amplitude de réponse à l'infection permettait de distinguer les cultivars mais pas les souches fongiques inoculées. Le clustering de ces protéines a ainsi permis la construction de cinq clusters de variation d'abondance (Cluster Cv×T1 à Cv×T5) contenant entre 2

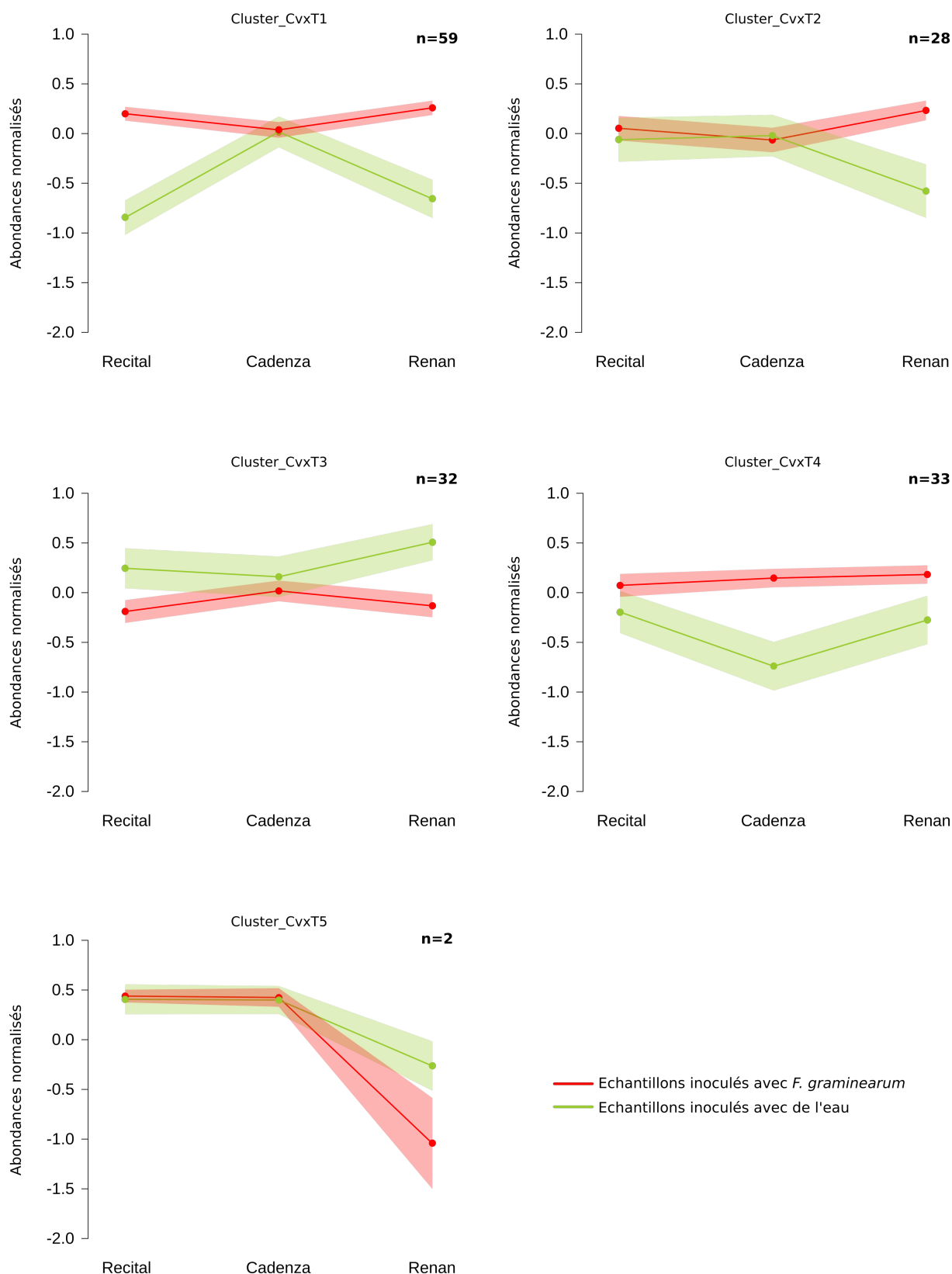


Figure 12 : Représentation des clusters moyens de variation d'abondance des protéines de blé significativement impactées par l'interaction des facteurs « Cultivar » et « Traitement ». Le clustering a été calculé à l'aide de la méthode fuzzy C-means en utilisant les valeurs z-score d'abondance de chaque protéine. Pour chaque cluster, le profil moyen a été représenté par un graphique linéaire avec le cultivar de blé en axe des abscisse et le code couleur correspond au traitement (rouge : Échantillons inoculés avec *F. graminearum* et vert : Échantillons inoculés avec de l'eau). Le nombre de protéines regroupées dans chaque cluster est indiqué en haut à droite de chaque graphique. Les rubans indiquent l'intervalle de confiance à 95 % et conservent le même code couleur que le tracé de la ligne.

et 59 protéines (Figure_12). Le cluster Cv×T1 se caractérisait par les protéines présentant une plus forte abondance en présence de *F. graminearum* chez les deux cultivars d'hiver Récital et Renan alors qu'aucun effet traitement n'était visible pour le cultivar de printemps Cadenza. Les clusters Cv×T2 et Cv×T5 correspondaient aux protéines pour lesquelles une abondance plus forte et plus faible respectivement fut observée à la fois chez les témoins et infectés du cultivar Renan par rapport aux deux autres cultivars de blé. Le cluster Cv×T3 correspondait aux protéines se caractérisant par une abondance plus faible dans les échantillons inoculés avec *F. graminearum* pour les cultivars Récital et Renan tandis qu'aucune différence n'a été observée entre les échantillons témoins et infectés pour le cultivar Cadenza. Le cultivar Cv×T4 contenait les protéines présentant une augmentation d'abondance dans les échantillons inoculés avec l'agent pathogène sans différence significative entre les cultivars alors que leur abondance était significativement différente entre les cultivars dans les échantillons témoins. Enfin, le cluster Cv×T5, composé uniquement de deux protéines, se caractérisait par une abondance plus faible dans les échantillons témoins du cultivar Renan amplifiée par l'effet du traitement alors qu'aucune différence entre cultivar et traitement n'était identifiée pour les deux cultivars les plus sensibles. Concernant les enrichissements des différents clusters et en gardant toujours le même seuil, le cluster Cv×T2 présentait des enrichissements en « tRNA aminoacylation for protein translation », « nucleotide binding » et « aminoacyl-tRNA ligase activity » tandis que le cluster Cv×T3 était enrichi en protéine dont la fonction est « flavin adenine dinucleotide binding » (Table_Supplémentaire_3). Les clusters Cv×T1 et Cv×T4 ne présentaient pas d'enrichissement significatif supérieur au seuil fixé tandis que le Cluster Cv×T5 ne présentait pas d'enrichissement tout court.

d) Existe-t-il des réponses spécifiques aux fonds génétiques de *F. graminearum* permettant de discriminer les cultivars de blé ?

Les résultats de l'analyse ANOVA ont permis l'identification de 30 protéines présentant un effet significatif de l'interaction entre les cultivars et la souche fongique inoculée. Afin de caractériser comment le fond génétique de la souche de *F. graminearum* déterminait les réponses des différents cultivars de blé, une analyse statistique de hiérarchisation de chaque combinaison

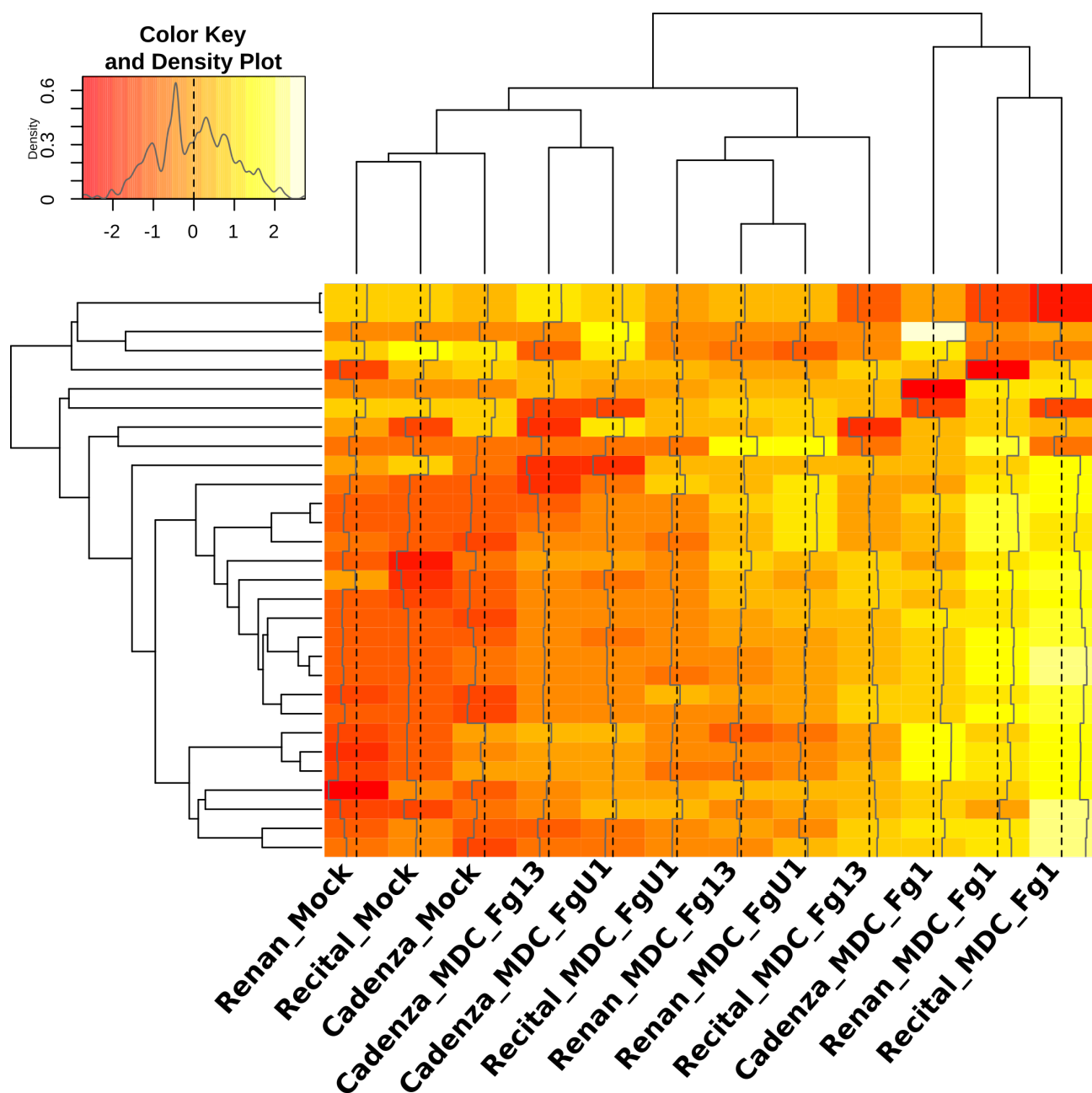


Figure 13 : Représentation Heat map des changements d'abondance des protéines de blé présentant un effet significatif de l'interaction entre les cultivars et le fond génétique de la souche inoculée. Le clustering hiérarchique a été réalisé pour chaque échantillon (dendrogramme en abscisse en fonction de chacune des protéine (dendrogramme en ordonné) calculé à partir des abondances protéiques transformées en z-scores. Les couleurs de la Heat map indiquent l'abondance de chaque protéine dans chaque échantillon.

Souche / Cultivar, a été réalisée et modélisée sous forme de Heat map afin de regrouper les échantillons sur la base des valeurs d'abondance de l'ensemble des 30 protéines qui les composaient (Figure_13). Les résultats de cette analyse révèlent la formation de deux groupes d'échantillons, le premier rassemblant les échantillons inoculés avec la souche la plus agressive MDC_Fg1 tandis que le second regroupait tous les autres échantillons. Dans ce second groupe, les échantillons témoins ont été regroupés ensemble et présentaient une forte homologie avec les échantillons inoculés avec les deux souches les moins agressives MDC_Fg13 et MDC_FgU1 suggérant peu de différences dans les abondances de ces 30 protéines au sein de ces différents échantillons. L'analyse fonctionnelle de ces 30 protéines a permis l'identification de 13 protéines impliquées dans les mécanismes de défense de la plante et dans la détoxification de composés métaboliques toxiques pour la cellule végétale. Parmi celles-ci, quatre protéines PR ont pu être identifiées, trois d'entre elles appartenant à la famille des β -1,3-glucanases et une à la famille des thaumatin-like proteins. Les trois β -1,3-glucanases présentaient toutes, non seulement une abondance significativement supérieure dans les échantillons Renan par rapport aux deux autres cultivars plus sensibles, mais également au sein des différents cultivars une abondance significativement supérieure dans les échantillons inoculés avec la souche MDC_Fg1. Concernant la thaumatin-like protins, cette dernière présentait, dans les échantillons Renan et Cadenza, le même profil de variation d'abondance que les trois β -1,3-glucanases tandis qu'elle n'a jamais été détectée dans l'ensemble des échantillons du cultivar le plus sensible Recital.

Conclusion

L'objectif de ce second axe était d'apporter de nouvelles connaissances sur les spécificités des réponses moléculaires du blé à l'infection de *Fusarium graminearum*. Cette analyse a été réalisée via la dissection des protéomes de trois cultivars de blé de sensibilité contrastée en interaction avec trois souches présentant des agressivités plus ou moins marquées. L'ensemble de ces résultats sera discuté plus en détail dans la discussion générale et donnera lieu ultérieurement à la rédaction d'un article scientifique. La comparaison entre les protéines identifiées au cours de cette expérimentation et celles identifiées préalablement dans Fabre *et al.* (2019) révèle que 3572 d'entre elles sont communes aux deux analyses indiquant une bonne répétabilité de la méthode d'analyse. La forte similarité des dual-protéomes identifiés au cours des différentes expérimentations suggèrent ainsi une signature moléculaire de l'établissement de la maladie, tant dans la composante fongique que végétale. En effet, si aucune spécificité qualitative n'a pu être détectée dans les protéomes de l'agent pathogène, seules 35 protéines spécifiques à un cultivar de blé ont été identifiées dans les échantillons inoculés avec de l'eau et aucune dans les échantillons infectés. Ainsi, bien que l'étude de seulement trois cultivars de blé en combinaison avec trois souches de *F. graminearum* ne soit pas suffisante pour généraliser la complexité de ce pathosystème, la non détection chez l'agent pathogène et chez la plante hôte de protéines spécifiques semble tout de même indiquer que l'interaction se base sur un dual-protéome peu variant entre les différents fonds génétiques des membres du pathosystème.

Si aucune protéine spécifique du cultivar n'a été détectée en présence de l'agent pathogène, une part importante des protéines identifiées présentaient toutefois des variations d'abondance significative. Parmi l'ensemble des protéines quantifiées, environ 50% présentaient des variations d'abondance significatives pour au moins un des facteurs testés. Les analyses statistiques réalisées au cours de cette étude ont montré que les variances observées entre échantillons étaient majoritairement expliquées par le facteur « Traitement » c'est-à-dire que la réponse à l'infection n'était pas différente pour les trois cultivars de blé et identique quel que soit le fond génétique de la

souche inoculée. Bien que systématiquement significatif, le facteur « Cultivar », représentant les variances observées expliquées par le fond génétique de l'hôte avait un effet globalement moins fort que le traitement. De plus, très peu de variations d'abondance dans les trois protéomes de blé ont permis d'identifier des réponses spécifiques à l'infection. En effet, seuls 4 % des protéines de blé présentaient un effet d'interaction expliqué par une réponse différentielle des trois cultivars de blé à l'infection, soit sans distinction du fond génétique de *F. graminearum* (*i.e.* 154 protéines *Cultivar*×*Treatment_effect*), soit avec distinction du fond génétique de l'agent pathogène (*i.e.* 30 protéines *Cultivar*×*Treatment*{*Strain*}*_effect*).

Discussion générale

Au cours de ce travail de thèse, l'objectif était d'établir la première cartographie fine des évènements moléculaires précoces établis lors de la fusariose de l'épi afin d'identifier les effecteurs fongiques impliqués dans la manipulation parasitaire et les facteurs de sensibilité du blé ayant un rôle dans le succès de la maladie. Cette étude, réalisée lors des stades asymptomatiques de la maladie avait pour but de caractériser non seulement la nature et la dynamique des évènements moléculaires contribuant à la sensibilité de la plante, mais également les spécificités du dialogue moléculaire établi lors de l'interaction de différents fonds génétiques de blé et *F. graminearum* contrastés respectivement par leur sensibilité et leur agressivité. En tirant avantage de méthodes exploratoires à large échelle, il a ainsi été démontré pour la première fois qu'il était possible de détecter très précocement un grand nombre de protéines fongiques *in planta*, permettant ainsi d'apporter une importante quantité d'information pour interpréter les évènements moléculaires de la plante au regard de ce que le champignon exprime. L'ensemble des données acquises au cours de ce travail permet à présent de discuter cette interaction comme un système dynamique basé sur une signature protéomique évoluant de manière dépendante de l'ontogénie des deux protagonistes, mais similaire entre fonds génétiques de sensibilité et d'agressivité contrastées.

I – Le cycle infectieux démarre lors de la production des spores par le champignon

Jusqu'à présent, l'étude de la fusariose de l'épi avait toujours été réalisée via l'exploration des évènements moléculaires ou physiologiques impliqués dans le développement de la maladie et identifiables lors de l'interaction entre la plante hôte et le champignon (Chetouhi *et al.*, 2014 ; Ding *et al.*, 2011 ; Eggert and Pawelzik, 2011 ; Masci *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2006). Or, limiter l'étude de cette maladie aux stades d'infection de l'hôte en oubliant qu'une partie importante du cycle de vie de *F. graminearum* se déroule à l'extérieur de la plante n'apporte qu'une compréhension partielle de la biologie de ce système, notamment parce qu'elle omet l'ensemble des acteurs moléculaires synthétisés avant même la rencontre avec l'hôte et qui pourrait avoir un rôle

primordial dans la réussite de l'infection. Dans l'optique d'apporter des informations originales sur l'initiation de la maladie, une des premières étapes de ce travail a consisté à sortir des stades de confrontation entre l'agent pathogène et la plante en étudiant le premier stade de développement de *F. graminearum*. Pour cela, la caractérisation la plus complète possible des protéomes des spores et spores en germination de deux souches fongiques fortement contrastées par leur agressivité a été réalisée. L'analyse comparée des protéomes (*i.e.* spores et spores en germination) a montré que plus de 90 % des protéomes et près de 100 % des effecteurs identifiés sont communs aux deux souches fongiques. À notre connaissance, c'est la première fois que la recherche et l'identification d'effecteurs fongiques dans la spore de *F. graminearum* ont pu être réalisées. L'enrichissement significatif en effecteurs dans les spores des deux souches, associé au fait qu'ils font partie des protéines les plus abondantes stockées dans cette structure permet ainsi de redéfinir la fonction même de la spore. Ainsi, l'ensemble de nos données indiquent non seulement que des effecteurs sont déjà stockés dans les spores avant même le premier contact avec l'hôte, mais également que certains d'entre eux sont synthétisés rapidement lors de la germination et régulés au cours de l'infection. Ces résultats suggèrent que les effecteurs sont exprimés par vagues successives, probablement en lien avec leur fonction dans le processus infectieux de *F. graminearum*. De plus, il faudrait considérer les conidies de *F. graminearum* non pas seulement comme des structures de résistance et de dissémination telles que déjà décrit dans l'article de Trail (2009), mais comme la première structure d'infection.

II – Le dialogue moléculaire entre le blé tendre et *F. graminearum* s'ajuste au développement du grain

L'identification de la spore comme étant une structure d'infection a ainsi permis de compléter notre connaissance du pathosystème en confirmant la pertinence d'étudier les événements moléculaires impliqués dans l'initiation de cette interaction. Au cours des premiers stades de l'établissement de la maladie, la diversité des composantes fongique et végétale du dialogue moléculaire suggère que la sensibilité de l'hôte pourrait être la résultante de la manipulation de nombreux processus cellulaires exprimés de façon séquentielle au cours de l'infection et notamment,

ceux impliqués dans le développement ontogénique du grain. En effet, un des résultats majeurs de cette étude est la mise en évidence d'une étape de transition entre 48hpi et 72hpi, au cours de laquelle les réponses de la plante s'amplifient, se réduisent ou s'inversent de façon coordonnée. Cette phase de transition démarre avant l'apparition des symptômes et est concomitante avec le début de la phase de développement de la masse fongique dans les épillets. Au cours de cette phase de transition, on observe des covariations entre la dynamique d'abondance d'acteurs fongiques et les régulations des protéines du blé incluant un grand nombre de fonctions chloroplastiques. Ces schémas spécifiques de covariations des deux protéomes, concomitants avec le début du processus de cellularisation du grain (Morrison *et al.*, 1978 ; Nadaud *et al.*, 2010) suggèrent ainsi que le succès de l'infection pourrait être dépendant du timing de l'infection de l'hôte par le champignon. En effet, au cours de travaux précédents il a été montré que la période de réceptivité maximale du blé à l'infection se situait entre 3 à 6 jours après anthèse (Beccari *et al.*, 2019 ; Cowger et Arellano, 2010), c'est-à-dire juste avant le début de la phase de formation de l'endosperme amylicé (Nadaud *et al.*, 2010). D'après ces précédents travaux, on peut supposer que la phase de sensibilité du blé est maximale lorsque l'épi n'est pas encore entré dans la phase de remplissage du grain, c'est-à-dire lorsqu'il n'a pas encore débuté sa production d'amidon. La recherche de protéines codées par des gènes impliqués dans le développement du grain a été réalisée afin d'identifier les protéines de blé qui présentaient un profil de variation atypique lors de nos expérimentations. Deux protéines présentant, entre 24 et 48 hpi, une augmentation d'abondance similaire à celle observée dans les échantillons témoins, mais subissant une forte diminution d'abondance entre 48 et 96 hpi en présence du champignon, alors que l'accumulation de ces protéines se poursuit dans les échantillons inoculés avec de l'eau ont ainsi pu être identifiées. Ces deux protéines se sont révélées être codées par deux gènes homologues au gène LA1 (Q93ZV7) de *A. thaliana* codant pour la protéine La Protein 1 sans laquelle l'embryon reste bloqué au stade globulaire précoce (Fleurdepine *et al.*, 2007). À cela, la recherche de protéines impliquées dans la synthèse du saccharose et de l'amidon a permis d'identifier un total de 13 sucrose synthase dont 6 présentaient une abondance significativement supérieure dans les échantillons infectés par rapport aux échantillons témoins. À l'inverse, les quatre starch synthase identifiées et

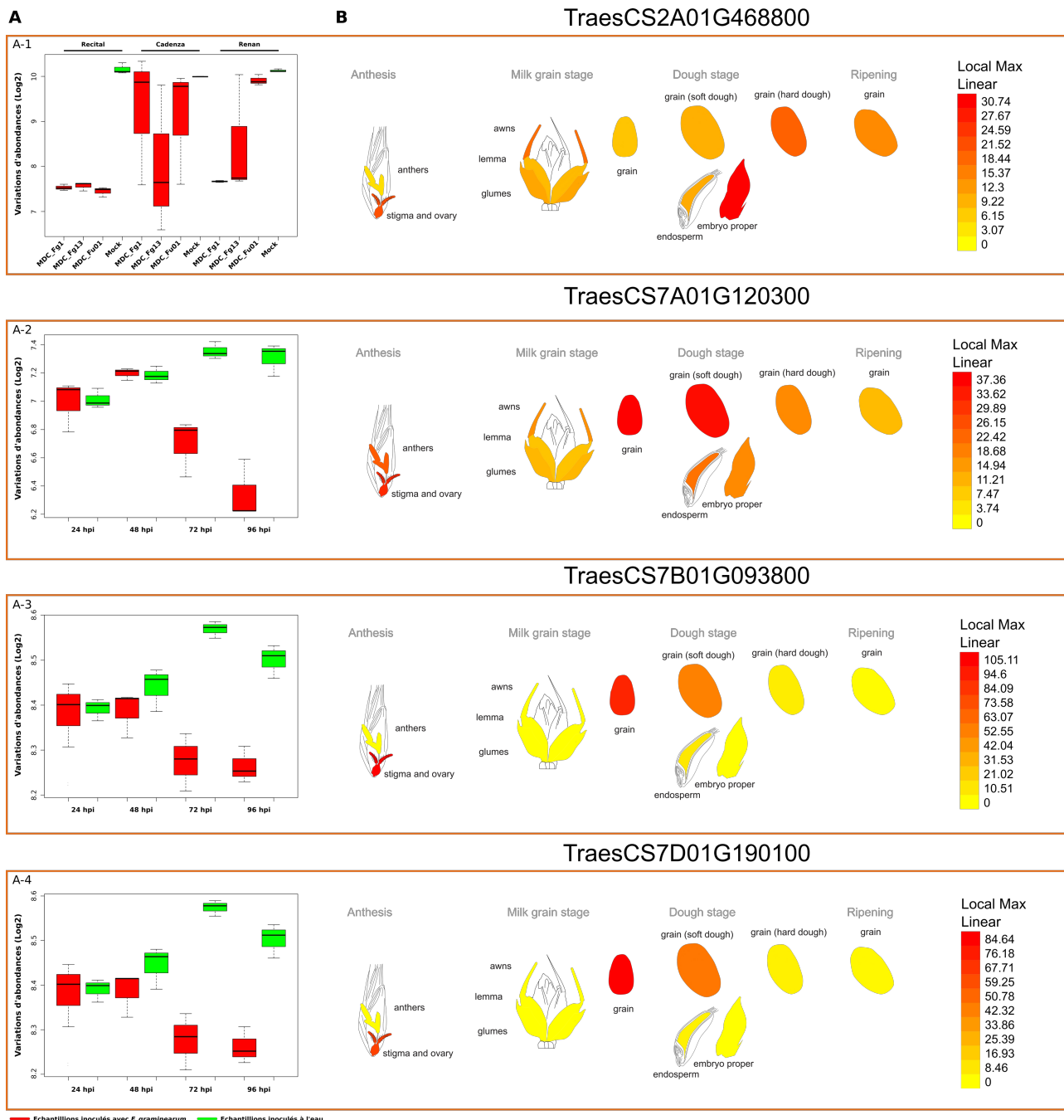


Figure 14 : Représentation des profils de variations d'abondance protéiques et des niveaux de transcrits dans les différents tissus de l'épi de blé des quatre starch synthase identifiées dans au moins une de nos expérimentations. (A) Boxplot du profil de variation d'abondance dans les échantillons correspondant aux trois cultivars de blé inoculés avec les trois souches de *F. graminearum* ou avec de l'eau (A-1) Les valeurs d'abondance moyenne dans chaque échantillon sont indiquées en rouge dans les échantillons inoculés avec *F. graminearum* et en vert dans les échantillons inoculés avec de l'eau. Les barres d'erreurs indiquent les variances observées pour chaque moyenne d'abondance. Boxplot représentant le profil de variation d'abondance de la protéine au cours de la cinétique suivie dans Fabre *et al.* (2019)a (A1-2-3). Les valeurs d'abondance moyenne à chaque point de cinétique sont indiquées en rouge dans les échantillons inoculés avec *F. graminearum* et en vert dans les échantillons inoculés avec de l'eau. Les barres d'erreurs indiquent les variances observées pour chaque valeur d'abondance. (B) Niveau d'expression du gène codant pour chacune des starch synthase dans les différents tissus selon Ramirez Gonzalez *et al.* (2018). This image was generated with the Late Stages eFP (RNA-Seq data) at bar.utoronto.ca/eplant by Waese *et al.* (2017).

connues pour être exprimées dans l'épi (Apples *et al.*, 2018) présentaient toutes une diminution d'abondance significative en présence de l'agent pathogène (Figure_14). Trois d'entre elles présentaient un effet traitement dépendant de l'ontogénie de l'épi (*i.e.* FHB×Dev-regulated proteins ; Fabre *et al.*, 2019a) avec une forte diminution de leur abondance lors de la transition 48 – 72 hpi tandis que la quatrième, observée uniquement dans la seconde expérimentation, présentait une diminution d'abondance expliquée uniquement par la présence du champignon. Or, de précédentes études ont montré, *in vitro*, que l'amylopectine et l'amylose composant l'amidon (Gillies *et al.*, 2012 ; Jeon *et al.*, 2010 ; Myers *et al.*, 2000) étaient difficilement exploitables par le champignon en tant que source de carbone nutritive et pour la formation des trichothécènes (Oh *et al.*, 2016), contrairement au saccharose (Jiao *et al.*, 2008 ; Kawakami *et al.*, 2014). Sur la base de ces observations, Jiao et collaborateurs (2008) avaient suggéré que le saccharose pourrait être un des facteurs clés dans l'induction de la synthèse des trichothécènes et de la pathogénicité de l'agent pathogène. Les résultats obtenus *in planta*, au cours de ce travail, soutiennent cette hypothèse. Ce résultat peut être complété par l'identification de trois alcool déshydrogénases (ADH) homologues des ADH1 et ADH2 de l'orge présentant une augmentation significative d'abondance en présence de *F. graminearum* (Annexe_1). Chez l'orge, l'ADH est connue pour être induite par l'infection de *Blumeria graminis f.sp hordei* et favorise la croissance des pathogènes en augmentant le métabolisme glycolytique tandis que les plantes présentant une mutation KO étaient moins sensibles à l'infection de ce champignon biotrophe (Pathuri *et al.*, 2011). Dans leur review, van Schie and Takken (2014) ont par la suite proposé que les gènes ADH de l'orge puissent avoir un rôle dans le nourrissage du champignon et être des facteurs de sensibilité de type 3. L'ensemble de ces profils de variation d'abondance au cours de nos deux expérimentations suggère un processus de manipulation parasitaire dépendant du stade ontogénique du grain, favorisant la nutrition de l'agent pathogène en ralentissant le processus de formation du grain.

En combinant les observations de ces différentes études avec les résultats obtenus lors de ce travail, il semblerait que la réussite de l'infection dépende directement de la vitesse à laquelle *F. graminearum* va pouvoir initier la manipulation parasitaire des processus physiologiques de l'épi de

blé. Cette hypothèse, en accord avec les conclusions de précédents travaux effectués sur *Moniliophthora perniciosa* (Mares *et al.*, 2017) et de *Aspergillus fumigatus* (Voltersen *et al.*, 2018), pourrait ainsi expliquer la surreprésentation en effecteur détectée dans la spore puisque leur stockage en grande quantité dans cette structure constitue une réserve utile et prête à l'emploi permettant d'initier l'élaboration d'un état favorable à son développement dès le premier contact avec son hôte. De plus, cette hypothèse pourrait également expliquer les différences d'agressivité observées entre les trois fonds génétiques de *F. graminearum* étudiés à l'issue de la transition 48 – 72 hpi. Le niveau d'agressivité des trois souches s'étant révélé particulièrement bien corrélé aux différences d'abondance des effecteurs, l'agressivité supérieure de la souche MDC_Fg1 pourrait ainsi être expliquée par sa faculté à synthétiser plus rapidement et plus massivement les acteurs moléculaires essentiels à la manipulation des processus physiologiques du blé tels ceux impliqués dans le ralentissement du développement de l'embryon, afin d'assurer ses propres besoins métaboliques par le détournement des sucres assimilables avant leur mobilisation pour le remplissage du grain.

III – L'interaction entre le blé et *F. graminearum* se base sur un core dual-protéome

L'analyse du dual-protéome établi lors de l'interaction entre un cultivar sensible de blé tendre et une souche agressive de *F. graminearum* a montré que d'importantes covariations dépendantes du stade de développement de l'hôte avaient lieu lors de l'initiation de l'infection, confirmant le fait que la vitesse de l'initiation des processus impliqués dans la manipulation parasitaire constitue un facteur crucial dont dépend la réussite de l'infection. En analysant de manière ciblée le point de cinétique 72 hpi, l'analyse des dual-protéomes issus des combinaisons de trois cultivars de blé et de trois souches fongiques n'a pas mis en évidence de différences basées sur la présence/absence de protéines spécifiques dans leur protéome respectif. La distinction des souches et des cultivars de blé n'a pu être réalisée que par la quantification des différentes protéines identifiées. Ainsi, si le dual-protéome présente clairement des spécificités dépendantes du stade ontogénique de la plante et du champignon, il semblerait que le dialogue moléculaire établi lors de l'interaction se base sur un dual-protéome générique dont les composantes fondamentales sont conservées et qui ne présente pas de variations

d'abondance dépendantes des fonds génétiques des membres du pathosystème. Du côté de l'agent pathogène, l'absence d'effet d'interaction observable suggère ainsi que les différents fonds génétiques de l'hôte ont une influence similaire sur les protéomes des trois souches de *F. graminearum*. Par extrapolation, ce résultat semble indiquer que, si des spécificités transcriptomiques ont déjà été observées lors de l'interaction de *F. graminearum* avec différentes espèces de céréales (Harris *et al.*, 2016), ou lors de l'infection de différents organes ou tissus d'une même plante (Lysøe *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012b), la stratégie fongique d'infection d'un même organe (*i.e.* l'épi) à un même stade ontogénique (*i.e.* 72 heures après l'anthèse) se structure autour d'un ensemble d'effecteurs conservés sans spécificités liées aux fonds génétiques de cultivars d'une même espèce végétale. Du côté de la plante, la même observation a pu être faite puisque 53 % des variations d'abondance des protéines de blé en réponse à l'infection étaient imputable uniquement au facteur « traitement » suggérant que les réponses majoritaires observées étaient communes aux trois cultivars de blé et non spécifiques de la souche inoculée. C'est également l'observation effectuée concernant les protéines présentant un effet cumulatif des facteurs « cultivar » et « traitement » (*i.e.* 20 % des protéines significatives) qui se caractérisent par une augmentation ou une diminution d'abondance des protéines du blé en présence de *F. graminearum* tout en conservant les différences de base présentes dans les échantillons non-inoculés avec l'agent pathogène. De manière similaire à ce qui avait été vu lors de l'analyse du protéome fongique, seulement 4 % des protéines végétales présentent un effet significatif d'interaction spécifique entre *F. graminearum sensu stricto* et le cultivar de blé. Cependant, il est à noter qu'à l'exception des 28 protéines présentes dans le cluster Cv×T2 (Figure_12), l'effet d'interaction observé pour ces protéines semble dû au rééquilibrage des abondances protéiques dans les échantillons infectés, écrasant ainsi les différences d'abondance observées dans les plantes témoins. Ces profils d'abondance spécifiques suggèrent donc que les différences protéomiques de base permettant de différencier les trois cultivars en dehors de l'interaction sont, pour l'essentiel, nivelées en présence de l'agent pathogène. Enfin, la recherche de protéines de blé présentant un effet d'interaction expliqué par une réponse différentielle des trois cultivars de blé et spécifique du fond génétique de l'agent pathogène n'a permis l'identification que de 30 protéines significatives. Ce

résultat est surprenant puisque lors de l'étude de la composante fongique du dual-protéome, la souche MDC_Fg1 était celle qui présentait les plus fortes abondances en effecteurs. Si l'abondance des effecteurs ou des protéines fongiques au sens large semble particulièrement bien corrélée à l'agressivité de la souche, l'effet de ces accumulations différentielles est indétectable dans la composante végétale du dual-protéome.

IV – Le chloroplaste constitue une interface privilégiée de la manipulation parasitaire pour le contrôle de l'homéostasie cellulaire de la plante

En accord avec de nombreuses études antérieures qui avaient déjà identifié le chloroplaste comme étant une cible privilégiée des effecteurs fongiques ou bactériens (de Torres Zabala *et al.*, 2015 ; Han and Kahmann, 2019 ; Li *et al.*, 2014 ; Lorrain *et al.*, 2018 ; Petre *et al.*, 2015, 2016a ; Rodriguez-Herva *et al.*, 2012 ; Serrano *et al.*, 2016 ; Xu *et al.*, 2019), l'un des constats majeurs de ce travail de Thèse concerne les points de convergence entre compartiment chloroplastique et les protéines de *F. graminearum* au cours du développement de l'interaction. Outre son implication dans la photosynthèse (Kirchhoff, 2019), le gravitropisme racinaire (Andrès *et al.*, 2010), le développement du pollen (Sakamoto *et al.*, 2008) et l'embryogenèse (Lu *et al.*, 2014), le chloroplaste participe également à la biosynthèse des acides aminés, des lipides, des nucléotides, de l'amidon et des terpénoïdes (Sowden *et al.*, 2017). Il joue également un rôle essentiel dans les voies de biosynthèse de phytohormones impliquées dans les différents mécanismes de défense de la cellule végétale (Lu and Yao, 2018 ; Sowden *et al.*, 2017). Il est également connu que le chloroplaste communique avec la plupart des autres organites de la cellule tels que les mitochondries, le peroxysome et le noyau afin de mettre en place les mécanismes de défense en intervenant, par exemple, dans la reprogrammation de l'expression des gènes de défense nucléaire (Shapiguzov *et al.*, 2012 ; Sierla *et al.*, 2013). Ainsi, de par son rôle dans un très grand nombre processus physiologiques de la plante, le contrôle du chloroplaste par un agent pathogène constitue un point stratégique pour la réussite de l'infection (Pan *et al.*, 2018b ; Wang *et al.*, 2019). Au cours de ce travail, l'analyse du contenu protéique des spores des souches MDC_Fg1 et MDC_FgU1 a permis l'identification de 78

protéines prédites comme étant sécrétées et possédant un peptide d'adressage chloroplastique apportant un argument supplémentaire quant au rôle crucial que cet organe pourrait jouer lors de l'interaction. La même analyse, réalisée *in planta*, a également permis l'identification d'un total de 102 protéines sécrétées et prédites comme étant adressées au chloroplaste (Fabre *et al.*, 2019a) suggérant que cet organe pourrait être le compartiment subcellulaire de la plante le plus ciblé par les effecteurs de *F. graminearum*. La dissection des profils de régulation de ces protéines a mis en évidence des profils de co-variations spécifiques lors de la transition 48 – 72 hpi entre les protéines chloroplastiques du blé et les protéines fongiques adressées au chloroplaste (Figure_9 ; Fabre *et al.*, 2019a). En croisant les résultats de nos deux expérimentations, 42 % des protéines chloroplastiques présentant une variation d'abondance en présence de *F. graminearum* et dépendante de l'ontogénie présentaient également une variation d'abondance significative sans spécificité imputable aux fonds génétiques des cultivars. Ces observations peuvent également être complétées par l'observation de seulement 6 protéines fongiques sécrétées présentant un motif d'adressage au noyau de la plante. Étant donné que chez les plantes, environ 95 % des protéines sont codées par le génome nucléaire (Yang *et al.*, 2019), on peut supposer que la manipulation parasitaire observée via les variations d'abondance des protéines chloroplastiques pourrait être majoritairement dues à l'action des effecteurs fongiques ciblant directement les protéines du chloroplaste et non pas les gènes ou transcrits qui en sont à l'origine. L'observation d'un grand nombre de protéases fongiques adressées au chloroplaste de la plante, associée à de fortes variations d'abondance de protéines du blé telles que les OOP (oligopeptidase organellaire) et les CLP (protéase caséinolytique) connues pour être impliquées dans la dégradation et l'importation de protéines chloroplastiques nouvellement synthétisées (Llamas *et al.*, 2017 ; Nishimura *et al.*, 2017) pourraient être un des leviers utilisés par le champignon pour manipuler l'homéostasie du chloroplaste et tous les processus physiologiques qui en dépendent. Le recoupement de l'ensemble de ces observations suggère ainsi que les fonctions chloroplastiques du blé tendre pourraient constituer une des principales cibles du processus de manipulation parasitaire mis en place par *F. graminearum*. La manipulation du chloroplaste apparaît

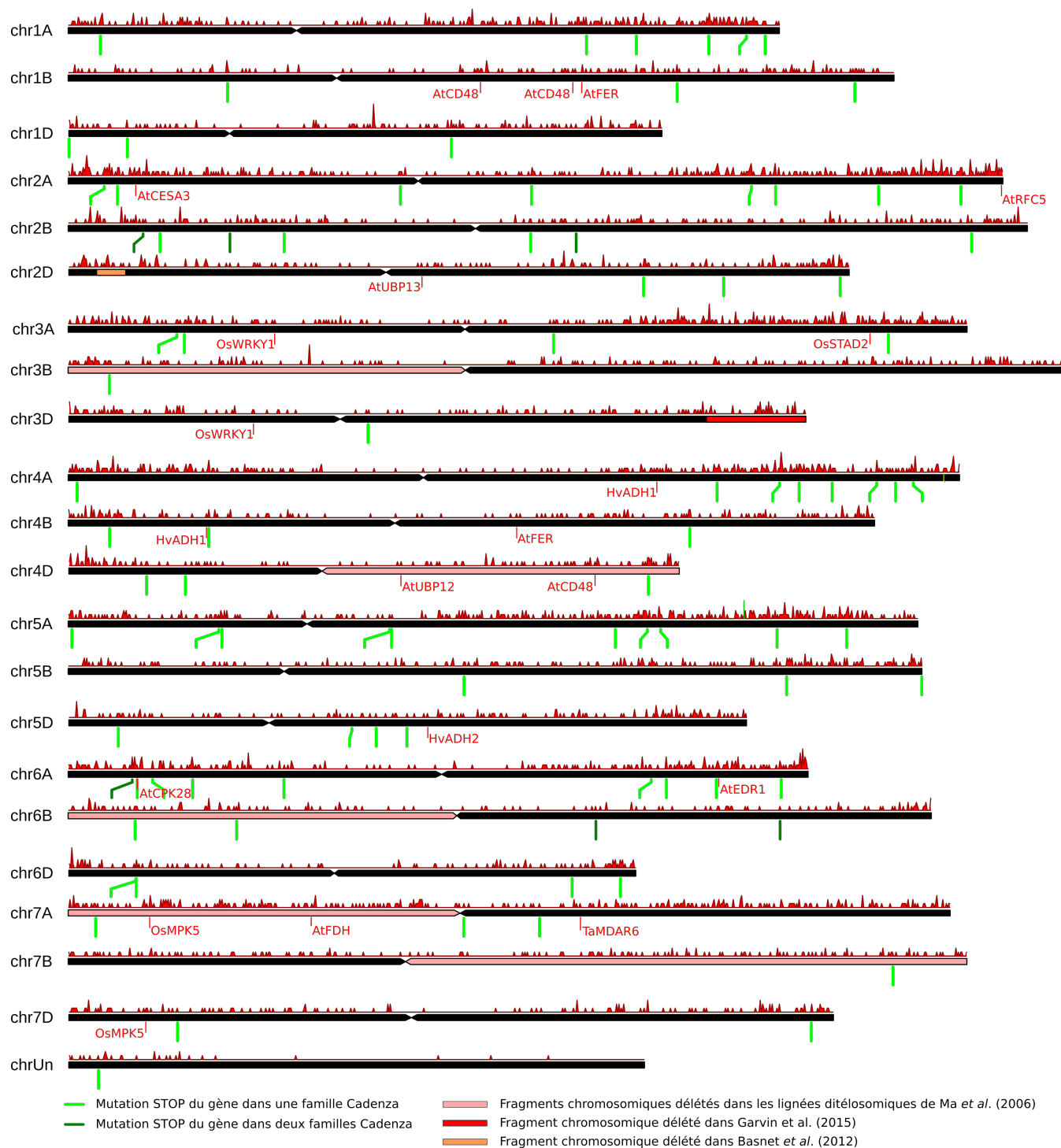


Figure 15 : Karyoplot représentant l'ensemble du génome du blé tendre. La localisation des gènes codant pour l'ensemble des protéines de blé présentant une variation d'abondance significative expliquée au moins en partie par l'inoculation de *F. graminearum* au cours de ce travail est indiquée par des pics rouges. Les barres vertes représentent la localisation des gènes présentant une mutation STOP dans une (barres vertes claires) ou deux (barres vertes foncées) familles de mutants EMS Cadenza se traduisant par une diminution de la sensibilité de la plante à la fusariose de l'épi selon McCallum *et al.* (2000) et présentant une variation d'abondance significative expliquée au moins en partie par la présence de *F. graminearum* au cours de nos expérimentations. Les zones chromosomiques de couleurs rose, orange et rouge indiquent les fragments de chromosomes délétés décrits dans Basnet *et al.* (2012) et Garvin *et al.* (2015) et dans les lignées ditelosomiques de Ma *et al.* (2006), respectivement. La localisation des homologues aux gènes de sensibilité décrits dans la littérature et codant pour une protéine présentant une variation d'abondance significative expliquée au moins en partie par l'inoculation de *F. graminearum* au cours de nos expérimentations est indiquée en rouge.

de surcroît non dépendante des fonds génétiques des deux protagonistes et totalement dépendante de l'ontogénie de l'épi.

V – Contribution de ces travaux de Thèse à l'identification de nouveaux déterminants du devenir de l'interaction

En croisant l'ensemble des informations générées au cours de ce travail sur la nature, la dynamique, et la spécificité des ajustements moléculaires du blé en présence de *F. graminearum*, avec (i) les données disponibles concernant des gènes de sensibilité déjà connus dans d'autres pathosystèmes (Table_1), (ii) les lignées ditélosomiques de blé (Ma *et al.*, 2006) et les délétions de fragments chromosomiques (Basnet *et al.*, 2012 ; Garvin *et al.*, 2015) associées à une diminution de la sensibilité à la fusariose chez le blé et, (iii) les gènes possédant une mutation STOP dans les familles de mutants EMS Cadenza (King *et al.*, 2015 ; Krasileva *et al.*, 2017 ; McCallum *et al.*, 2000) présentant un phénotype moins sensible à la fusariose de l'épi, il doit être possible d'identifier des facteurs de sensibilité candidats. L'ensemble de ces données, cartographié sur le génome du blé, montre clairement qu'il ne semble pas exister de régions génomiques particulières pouvant être associées aux réponses de la plante à *F. graminearum* (Figure_15). Cette observation soutient notre hypothèse sur l'existence d'un très grand nombre de gènes ou facteurs de sensibilité dispersés sur l'ensemble du génome du blé tendre.

La recherche d'homologie entre les gènes de sensibilité connus et les gènes codants pour les protéines identifiées dans nos analyses comme présentant des variations d'abondance significatives a permis d'identifier un total de 21 protéines de blé présentant un fort degré d'homologie avec des protéines codées par des gènes de sensibilité connus (Annexe_1). Une seule de ces protéines (*i.e.* AtCPK28) est codée par un gène présentant une mutation STOP dans une famille de mutant Cadenza significativement moins sensible à la fusariose et quatre (*i.e.* AtUBP12 ; AtCD48 ; OsMPK5 et AtFDH) sont codées par des gènes situés sur des régions chromosomiques dont la délétion conduit à une forte diminution de la sensibilité à la fusariose (Figure_15). Outre les protéines codées par les gènes ADH1 et ADH2 connus pour être des gènes de sensibilité de type 3 permettant de subvenir aux

besoins métaboliques de l'agent pathogène (Pathuri *et al.*, 2011 ; van Schie and Takken, 2014), toutes les autres protéines identifiées présentent de fortes similarités avec de potentiels facteurs de sensibilité de type 2, dont environ un tiers présentent un fort degré d'homologie avec des protéines codées par des gènes de sensibilité connus comme étant impliqués dans l'inhibition de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique (Table_1). S'il a récemment été montré que *F. graminearum* était capable de dégrader directement l'acide salicylique du blé lors des stades plus tardifs de la maladie (Rocheleau *et al.*, 2019), nos résultats semblent suggérer qu'une des stratégies fongiques déployée au cours des premiers stades de l'infection consisterait à bloquer la synthèse de l'hormone plutôt que de la dégrader directement. Au total, trois de ces protéines (*i.e.* OsSTAD2, AtFDH et TaMDAR6 ; Table_1) sont clairement décrites comme faisant partie du chloroplaste (Abou-Attia *et al.*, 2016 ; Jiang *et al.*, 2009 ; Olson *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2016 ; Yu *et al.*, 2017). L'ensemble de ces résultats permettent de compléter notre modèle explicatif des événements moléculaires et physiologiques sous-tendant le développement de l'interaction entre le blé et *F. graminearum*. Outre la dérégulation des processus impliqués dans le développement de l'embryon et le remplissage du grain, une des stratégies parasitaires pourrait consister à l'instauration d'une manipulation élaborée des processus transitant au moins en partie par le compartiment chloroplastique afin d'induire l'inhibition des mécanismes de défense de l'hôte et d'assurer son installation.

Parmi l'ensemble des protéines issues des gènes codants pour des facteurs de sensibilité candidats, aucune d'entre elles ne présentaient de variation d'abondance dépendante de l'interaction entre les différents fonds génétiques de l'hôte et de *F. graminearum*, contrairement à un certain nombre de protéines impliquées dans les mécanismes de défense qui arboraient des spécificités de variations d'abondances permettant de discriminer les différents cultivars de blé vis-à-vis de leur réponse à l'infection voire vis-à-vis de leur réponse à une souche fongique donnée. À titre d'exemple, une forte diminution des abondances des protéines Wheatwin-1 et Wheatwin-2 connues pour leur activité antifongique (Bertini *et al.*, 2009 ; Caporale *et al.*, 2004), de deux xynalase inhibiteurs et d'une thaumatin-like proteins a été observée pour les cultivars Recital et Cadenza, mais pas pour le cultivar le moins sensible Renan. Le même profil de variation d'abondance a également pu être observé au

sein des protéines *Cultivar*×*Treatment*{*Strain*}_effect pour les trois β -1,3-glucanases, la thaumatin-like proteins ainsi que pour deux UDP-glucosyl transférases et deux Cytochromes P450 dont les fonctions sont connues comme étant impliquées dans la détoxification des xénobiotiques tels que les DON (Gunupuru *et al.*, 2018 ; Pasquet *et al.*, 2016 ; Zhao *et al.*, 2018). Ainsi, bien que l'étude de seulement trois cultivars de blé en interaction avec trois souches de *F. graminearum* ne soit pas suffisante pour généraliser cette observation, la non-détection de variations d'abondance permettant de distinguer une réponse spécifique d'un cultivar donné à l'infection pour l'ensemble des protéines codées par les gènes candidats identifiés, suggère que la sensibilité du blé à la fusariose de l'épi pourrait être commune aux différents fonds génétiques de la plante et aspécifique de la souche fongique inoculée. Cette hypothèse pourrait apporter un premier élément d'explication à la non-existence de résistance totale à la fusariose de l'épi chez le blé. Les différences observées en termes de sévérité des symptômes entre les différents cultivars pourraient, quant à elles, être expliquées par la résistance quantitative apportée par les différents QTL de résistance présents dans les fonds génétiques de blé (Jia *et al.*, 2018 ; Steiner *et al.*, 2017, 2019 ; Venske *et al.*, 2019).

Conclusion et perspectives

Améliorer les résistances du blé tendre à la fusariose de l'épi par le contrôle des déterminants de la sensibilité nécessite une compréhension globale et dynamique du dialogue moléculaire complexe qui est mis en place lors de l'interaction. Les résultats obtenus dans le cadre de cette Thèse permettent d'apporter un éclairage nouveau sur le développement de l'interaction entre un blé sensible et le champignon *F. graminearum*. En premier lieu, la spore constitue le premier stade du processus infectieux de *F. graminearum* et se présente comme une structure dans laquelle le champignon stocke un ensemble très diversifié d'effecteurs qui auront un rôle dès le premier contact avec la plante hôte. Au cours des premières 96 heures suivant la rencontre entre *F. graminearum* et l'épi de blé, la stratégie fongique consiste à produire des effecteurs par vagues ciblant des processus physiologiques différents, comme le compartiment chloroplastique, et ce, à des stades précis de l'ontogénie de l'épi. En comparant le dialogue moléculaire établi entre différents fonds génétiques de blé tendre et de *F. graminearum*, les résultats obtenus semblent indiquer que les mêmes stratégies de manipulation parasitaire et de réponses de la plante s'établissent sans spécificité liée au niveau de sensibilité et d'agressivité des membres de l'interaction. L'analyse conjointe des résultats obtenus au cours de ce travail a ainsi permis d'identifier un certain nombre de gènes candidats potentiellement impliqués dans la sensibilité du blé tendre à la fusariose de l'épi. Ces gènes pourraient, après validation fonctionnelle, être utilisés pour générer de nouvelles sources de résistance au FHB. Les résultats obtenus ouvrent également de nouvelles questions sur la biologie de cette interaction.

La première perspective envisageable pourrait ainsi consister à interroger les cibles chloroplastiques des effecteurs fongiques ainsi que leur(s) rôle(s) dans le devenir de l'interaction afin de valider et d'affiner les observations faites lors d'analyses à large échelle. Cette première étape analytique pourrait, dans un second temps, être exploitée pour la recherche des cibles chloroplastiques connues comme étant au cœur de vastes réseaux de signalisation et de régulation permettant ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de l'établissement d'un état de sensibilité de la plante.

La deuxième perspective pourrait consister à compléter nos connaissances en analysant la variabilité génétique, non plus entre différents fonds génétiques, mais celle existant au sein d'un même génome de blé. En effet, l'identification de facteurs de sensibilité candidats au cours de ce travail permet à présent d'initier la recherche des homéologues possiblement exploitables pour l'amélioration variétale par le contrôle de la sensibilité.

Enfin, une troisième perspective plus fondamentale que les deux précédentes, pourrait consister à déterminer quelle part du protéome des spores de *F. graminearum* est spécifiquement stockée pour initier l'infection de la plante, par rapport à celle ayant un rôle structural ou nécessaire à sa survie.

I - Les protéines fongiques disposant de séquences d'adressage aux chloroplastes s'accumulent-elles dans cet organe et quelles sont leurs cibles moléculaires ?

La validation du chloroplaste comme étant une cible privilégiée des effecteurs fongiques constitue une étape essentielle dans la compréhension du déterminisme de la sensibilité de la plante. Une stratégie possible, déjà utilisée dans d'autres pathosystèmes plante – champignon (Petre *et al.*, 2015, 2016b), consiste à valider, à l'aide de protéines recombinantes (fusion avec un marqueur fluorescent), la localisation subcellulaire de quelques effecteurs candidats, sélectionnés parmi les plus abondants dans nos analyses de dual-protéomes. Le suivi de la fluorescence par microscopie permettra de valider la localisation subcellulaire de ces protéines recombinantes et constituera également la première étape vers l'identification de leurs cibles végétales via l'utilisation d'approches de type TAP-TAG (tandem affinity purification by tag) ou double-hybride. Ces analyses permettraient ainsi de compléter les observations de ce travail de thèse en apportant une résolution beaucoup plus fine des processus chloroplastiques manipulés par *F. graminearum*. Sur la base de données issues de la littérature, un intérêt particulier pourrait ainsi être porté sur les cibles protéiques connues comme étant situées au cœur de réseaux d'interactions impliqués dans de nombreux processus physiologiques (McCormack *et al.*, 2016 ; Vandereyken *et al.*, 2018). En effet, s'il est maintenant établi qu'un très grand nombre de hubs de signalisation et de régulation impliqués dans les réponses aux stress sont

centralisés dans le chloroplaste (Benn *et al.*, 2016 ; Chi *et al.*, 2015 ; Crawford *et al.*, 2018 ; Hernandez-Verdeja and Strand, 2018), aucune étude n'a encore été réalisée sur leur potentielle manipulation par un agent phytopathogène fongique. À notre connaissance, seule l'étude d'un hub nucléaire a été réalisée avec comme conclusion que ce dernier était ciblé simultanément et de manière convergente par des effecteurs d'agents phytopathogènes biotrophes et hémibiotrophes, et ce probablement, afin d'impacter un très grand nombre de processus biologiques (Weßling *et al.*, 2014). Ainsi, la modélisation dynamique des processus cellulaires de la cellule végétale, ainsi que des effecteurs fongiques identifiés comme interagissant avec les protéines de la plante, pourrait permettre la génération de réseaux d'interaction apportant une vue plus complète de l'état cellulaire lié à un stress biotique. L'identification et la validation de hubs de régulation et de signalisation chloroplastiques pourraient également permettre de comprendre comment les perturbations liées aux effecteurs fongiques sur un groupe de protéines végétales affectent les fonctions cellulaires globales et potentiellement induisent un état de sensibilité.

II – Exploration de la diversité des homéologues pour les gènes de sensibilité candidats

Bien que détournées par les agents pathogènes, les fonctions associées aux gènes de sensibilité n'en restent pas moins importantes, voire essentielles pour le bon fonctionnement de la cellule végétale (Chu *et al.*, 2006 ; Engelhardt *et al.*, 2018 ; van Schie and Takken, 2014 ; Yang *et al.*, 2006). Ainsi, l'amélioration des résistances par le contrôle des déterminants de la sensibilité de la plante requiert la prise en compte de plusieurs éléments. Premièrement, la perte ou l'altération de la fonction assurée chez la plante par un gène de sensibilité a-t-elle des effets pléiotropiques pour la survie de la plante et deuxièmement, le facteur de sensibilité est-il codé par plusieurs gènes redondants ? L'existence dans la littérature d'informations concernant des gènes de sensibilité préalablement étudiés peut apporter les premiers éléments de réponse à la première question. Sur l'ensemble des gènes de sensibilité candidats identifiés au cours de ce travail, neuf sont décrits dans la littérature comme associés à des effets délétères sur le développement et la survie de la plante mutée (Table_1). Bien que ces effets délétères, puissent être dépendant de l'espèce végétale et de l'environnement (Bai

et al., 2008 ; Pessina *et al.*, 2016), il existe une probabilité assez forte que la diminution de la sensibilité à la fusariose résultant de la perte ou de la diminution de la fonction d'un gène candidat soit associée à un impact significatif sur le développement ou la qualité du grain. Ce qui devrait conduire à disqualifier un nombre élevé de gènes candidats. Toutefois, l'existence de trois sous-génomes ainsi que d'une très forte redondance fonctionnelle chez le blé tendre (Borrill *et al.*, 2019) pourrait permettre de compenser les effets pléiotropiques induits par la suppression de la fonction d'un gène de sensibilité. Cette hypothèse pourrait ainsi expliquer pourquoi la délétion de fragments entiers de chromosomes (Basnet *et al.*, 2012 ; Garvin *et al.*, 2015 ; Ma *et al.*, 2006) ou la délétion des 16 gènes inclus dans *Fhb1* (Su *et al.*, 2019) n'est pas préjudiciable pour le développement normal de la plante. Partant de cette hypothèse, une recherche des homéologues des 28 gènes de sensibilité candidats précédemment décrits a permis l'identification de plusieurs copies dans le génome du blé dont 6 codent pour des protéines formellement identifiées dans au moins une de nos deux expérimentations protéomiques (Annexe_2). Pour ces 6 homéologues, aucune variation d'abondance significative n'a été détectée en présence de *F. graminearum*. À titre d'exemple, seule la protéine codée par la copie homéologue issue du génome B du gène homologue au gène FER connu chez *A. thaliana* comme étant impliqué dans l'invasion fongique (Fernandes *et al.*, 2017 ; Kessler *et al.*, 2010 ; Masachis *et al.*, 2016), présentait une augmentation d'abondance significative en présence du champignon. La copie homéologue présente sur le génome A ne présentait, quant à elle, aucune variation significative par rapport aux témoins dans les deux expérimentations réalisées au cours de ce travail. Bien que des analyses plus poussées soient nécessaires, ces premiers résultats suggèrent que la version du génome A de ce gène pourrait potentiellement ne pas induire un phénotype sensible et assurer la fonction normale de ce gène dans la situation où la copie du génome B a été inactivée.

Si l'exploration des données acquises au cours de ce travail permet dès à présent d'initier des approches de type « gènes candidats », il conviendra tout de même de garder à l'esprit que seules les données issues du séquençage du cultivar Chinese Spring ont pu être utilisées pour l'identification des protéines de blé. L'annotation en cours, réalisée dans l'Unité, des génomes de Récital et Renan devrait permettre d'affiner non seulement l'identification des protéines végétales dans nos analyses,

mais également assurer une meilleure détection des homéologues impliqués dans l'établissement d'un état de sensibilité de la plante.

III – Existe-t-il une part de l'effectome des spores de *F. graminearum* spécifiquement stockée pour l'initiation de l'infection ?

L'identification d'un fort enrichissement en effecteurs dans les spores issues des deux souches d'agressivité contrastée utilisées dans cette expérience, ainsi que leur distribution parmi les protéines les plus abondantes dans la spore permet de redéfinir la spore de *F. graminearum* comme une structure d'infection à part entière. Une des suites à ce travail serait de tester l'impact des conditions de production des spores (*in vitro*, *in planta*, sur des résidus de culture, etc) sur leur contenu en effecteurs. Si l'on se réfère au cycle de développement de *F. graminearum* en milieu naturel, le premier inoculum est produit sous la forme d'ascospores sur des résidus de culture (Trail, 2009) c'est-à-dire sur tissus végétaux morts tout comme lors de nos expérimentations où la production des inoculums avait été réalisée dans un milieu aqueux dans lequel des grains de haricot mungo (*Vigna radiata*) avaient été préalablement bouillis. Les inoculums secondaires, composés quant à eux de conidies, sont produits à partir des tissus infectés de l'épi. Si la détection de signaux d'origine végétale dans le milieu est impliquée dans la formation et le remplissage des spores, cette analyse comparée devrait faire apparaître des différences dans le contenu en effecteurs des spores produites sur différents milieux. L'analyse comparée de ces contenus devrait permettre de faciliter l'identification des effecteurs nécessaires aux premières étapes de l'infection. Ainsi, outre l'aspect purement fondamental de cette perspective, cette analyse supplémentaire pourrait apporter des arguments supplémentaires pour la sélection des effecteurs candidats à tester pour validation fonctionnelle.

Références bibliographiques

- Abou-Attia, M. A., Wang, X., Nashaat Al-Attala, M., Xu, Q., Zhan, G., and Kang, Z. (2016). TaMDAR6 acts as a negative regulator of plant cell death and participates indirectly in stomatal regulation during the wheat stripe rust–fungus interaction. *Physiol. Plant.* 156, 262–277. doi:10.1111/pp1.12355.
- Ahmed, M. B., Santos, K. C. G. dos, Sanchez, I. B., Petre, B., Lorrain, C., Plourde, M. B., *et al.* (2018). A rust fungal effector binds plant DNA and modulates transcription. *Sci. Rep.* 8, 14718. doi:10.1038/s41598-018-32825-0.
- Alouane, T., Rimbart, H., Fabre, F., Cambon, F., Langin, T., and Bonhomme, L. (2018). Genome sequence of *Fusarium graminearum* strain MDC_Fg1, isolated from bread wheat grown in France. *Microbiol. Resour. Announc.* 7, e01260-18. doi:10.1128/MRA.01260-18.
- AlTaweel, K., Amarasinghe, C. C., Brûlé-Babel, A. L., and Dilantha Fernando, W. G. (2017). Gene expression analysis of host–pathogen interaction between wheat and *Fusarium graminearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 148, 617–629. doi:10.1007/s10658-016-1118-0.
- Alvarez, C. L., Somma, S., Moretti, A., and Fernández Pinto, V. (2010). Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *J. Phytopathol.* 158, 173–181. doi:10.1111/j.1439-0434.2009.01596.x.
- Andersen, J. E., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., and Nepal, P. M. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. *Genes (Basel)*. 9. doi:10.3390/genes9070339.
- Andrès, C., Agne, B., and Kessler, F. (2010). The TOC complex: Preprotein gateway to the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803, 715–723. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.03.004.
- Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., *et al.* (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science (80-.)*. 361, eaar7191. doi:10.1126/science.aar7191.
- Arseniuk, E., Foremska, E., G, T., Óral, and Chełkowski, J. (1999). Fusarium head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *J. Phytopathol.* 147, 577–590. doi:10.1046/j.1439-0434.1999.00433.x.
- Bai, G., Su, Z., and Cai, J. (2018). Wheat resistance to Fusarium head blight. *Can. J. Plant Pathol.* 40, 336–346. doi:10.1080/07060661.2018.1476411.

- Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N. F., Reinstadler, A., Lotti, C., *et al.* (2008). Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a central American tomato accession is caused by loss of mlo function. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21, 30–39. doi:10.1094/MPMI-21-1-0030.
- Bai, G.-H., and Shaner, G. (2004). Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 135–161. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140340.
- Bai, G.-H., Plattner, R., Desjardins, A., Kolb, F., and McIntosh, R. A. (2001). Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breed.* 120, 1–6. doi:10.1046/j.1439-0523.2001.00562.x.
- Bai, G., Kolb, F. L., Shaner, G., and Domier, L. L. (1999). Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* 89, 343–348. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.4.343.
- Bai, G. H., and Shaner, G. (1996). Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Dis.* 80:975-979.
- Baker, C. J., and Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299–321. doi:10.1146/annurev.py.33.090195.001503.
- Basnet, B. R., Glover, K. D., Ibrahim, A. M. H., Yen, Y., and Chao, S. (2012). A QTL on chromosome 2DS of ‘Sumai 3’ increases susceptibility to *Fusarium* head blight in wheat. *Euphytica* 186, 91–101. doi:10.1007/s10681-011-0495-x.
- Beccari, G., Arellano, C., Covarelli, L., Tini, F., Sulyok, M., and Cowger, C. (2019). Effect of wheat infection timing on *Fusarium* head blight causal agents and secondary metabolites in grain. *Int. J. Food Microbiol.* 290, 214–225. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.014.
- Benhamou, N., and Rey, P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d’écoproduction durable. *Phytoprotection* 92, 1–23. doi:https://doi.org/10.7202/1012399ar.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57, 289–300. doi:10.2307/2346101.
- Benn, G., Bjornson, M., Ke, H., De Souza, A., Balmond, E. I., Shaw, J. T., *et al.* (2016). Plastidial metabolite MEcPP induces a transcriptionally centered stress-response hub via the transcription factor CAMTA3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 8855–8860. doi:10.1073/pnas.1602582113.
- Bertini, L., Caporale, C., Testa, M., Proietti, S., and Caruso, C. (2009). Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. *FEBS Lett.* 583, 2865–2871. doi:10.1016/j.febslet.2009.07.045.

- Birzele, B., Meier, A., Hindorf, H., Krämer, J., and Dehne, H.-W. (2002). Epidemiology of Fusarium infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 667–673. doi:10.1023/A:1020632816441.
- Biselli, C., Bagnaresi, P., Faccioli, P., Hu, X., Balcerzak, M., Mattera, M. G., *et al.* (2018). Comparative transcriptome profiles of near-isogenic hexaploid wheat lines differing for effective alleles at the 2DL FHB Resistance QTL. *Front. Plant Sci.* 9, 1–28. doi:10.3389/fpls.2018.00037.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., *et al.* (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53, 1367–1376.
- Bonhomme, L., Valot, B., Tardieu, F., and Zivy, M. (2012). Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 957–972. doi:10.1074/mcp.M111.015867.
- Bönnighausen, J., Schauer, N., Schäfer, W., and Bormann, J. (2018). Metabolic profiling of wheat rachis node infection by *Fusarium graminearum* – decoding deoxynivalenol-dependent susceptibility. *New Phytol.* doi:10.1111/nph.15377.
- Börner, A., Ogbonnaya, F.C., Röder, M.S., Rasheed, A., Periyannan, S., and Lagudah, E.S. (2015) *Aegilops tauschii* Introgressions in Wheat. In: Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. (eds) Alien Introgression in Wheat. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-319-23494-6_10
- Borrill, P., Harrington, S. A., and Uauy, C. (2019). Applying the latest advances in genomics and phenomics for trait discovery in polyploid wheat. *Plant J.* 97, 56–72. doi:10.1111/tpj.14150.
- Boutigny, A.-L., Richard-Forget, F., and Barreau, C. (2008). Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of Fusarium trichothecenes. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 411–423. doi:10.1007/s10658-007-9266-x.
- Boutrot, F., and Zipfel, C. (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 257–286. doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120106.
- Breen, S., Williams, S. J., Winterberg, B., Kobe, B., and Solomon, P. S. (2016). Wheat PR-1 proteins are targeted by necrotrophic pathogen effector proteins. *Plant J.* 88, 13–25. doi:10.1111/tpj.13228.
- Brennan, J. M., Fagan, B., van Maanen, A., Cooke, B. M., and Doohan, F. M. (2003). Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of european Fusarium fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 577–587. doi:10.1023/A:1024712415326.

- Brown, N. A., Evans, J., Mead, A., and Hammond-Kosack, K. E. (2017). A spatial temporal analysis of the *Fusarium graminearum* transcriptome during symptomless and symptomatic wheat infection. *Mol. Plant Pathol.* 18, 1295–1312. doi:10.1111/mpp.12564.
- Brown, J. K. M. (2015). Durable resistance of crops to disease: A darwinian perspective. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 513–539. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045914.
- Bruns, E., Carson, M., and May, G. (2012). Pathogen and host genotype differently affect pathogen fitness through their effects on different life-history stages. *BMC Evol. Biol.* 12, 135. doi:10.1186/1471-2148-12-135.
- Buerstmayr, H., Ban, T., and Anderson, J. A. (2009). QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: A review. *Plant Breed.* 128, 1–26. doi:10.1111/j.1439-0523.2008.01550.x.
- Buerstmayr, H., Steiner, B., Hartl, L., Griesser, M., Angerer, N., Lengauer, D., *et al.* (2003). Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor. Appl. Genet.* 107, 503–508. doi:10.1007/s00122-003-1272-6.
- Burdon, J. J., Zhan, J., Barrett, L. G., Papaix, J., and Thrall, P. H. (2016). Addressing the challenges of pathogen evolution on the world's arable crops. *Phytopathology* 106, 1117–1127. doi:10.1094/PHYTO-01-16-0036-FI.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., *et al.* (1997). The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88, 695–705. doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81912-1.
- Caffier, V., Le Cam, B., Al Rifaï, M., Bellanger, M.-N., Comby, M., Denancé, C., *et al.* (2016). Slow erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific Quantitative Trait Locus. *Infect. Genet. Evol.* 44, 541–548. doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.016.
- Caporale, C., Di Berardino, I., Leonardi, L., Bertini, L., Cascone, A., Buonocore, V., *et al.* (2004). Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. *FEBS Lett.* 575, 71–76. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.091.
- Carter, J. P., Rezanoor, H. N., Desjardins, A. E., and Nicholson, P. (2000). Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathol.* 49, 452–460. doi:10.1046/j.1365-3059.2000.00482.x.
- Champeil, A., Fourbet, J. F., Doré, T., and Rossignol, L. (2004). Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Prot.* 23, 531–537. doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.011.

- Chanclud, E., Kisiala, A., Emery, N. R. J., Chalvon, V., Ducasse, A., Romiti-Michel, C., *et al.* (2016). Cytokinin production by the rice blast fungus is a pivotal requirement for full virulence. *PLoS Pathog.* 12, e1005457. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005457.
- Chartrain, L., Brading, P. A., and Brown, J. K. M. (2005). Presence of the Stb6 gene for resistance to *Septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in cultivars used in wheat-breeding programmes worldwide. *Plant Pathol.* 54, 134–143. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01164.x.
- Chen, J., Upadhyaya, N. M., Ortiz, D., Sperschneider, J., Li, F., Bouton, C., *et al.* (2017). Loss of AvrSr50 by somatic exchange in stem rust leads to virulence for Sr50 resistance in wheat. *Science* (80-). 358, 1607 LP – 1610. doi:10.1126/science.aao4810.
- Chetouhi, C., Bonhomme, L., Lasserre-Zuber, P., Cambon, F., Pelletier, S., Renou, J.-P., *et al.* (2016). Transcriptome dynamics of a susceptible wheat upon *Fusarium* head blight reveals that molecular responses to *Fusarium graminearum* infection fit over the grain development processes. *Funct. Integr. Genomics* 16, 183–201. doi:10.1007/s10142-016-0476-1.
- Chetouhi, C., Panek, J., Bonhomme, L., ElAlaoui, H., Texier, C., Langin, T., *et al.* (2015). Cross-talk in host–parasite associations: What do past and recent proteomics approaches tell us? *Infect. Genet. Evol.* 33, 84–94. doi:10.1016/j.meegid.2015.04.015.
- Chetouhi, C., Bonhomme, L., Lecomte, P., Cambon, F., Merlino, M., Biron, D. G., *et al.* (2014). A proteomics survey on wheat susceptibility to *Fusarium* head blight during grain development. *Eur. J. Plant Pathol.* 141, 407–418. doi:10.1007/s10658-014-0552-0.
- Chi, W., Feng, P., Ma, J., and Zhang, L. (2015). Metabolites and chloroplast retrograde signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25, 32–38. doi:10.1016/j.pbi.2015.04.006.
- Chinchilla, D., and Boller, T. (2011). Innate immunity: Pattern recognition in plants. *Eff. Plant–Microbe Interact.*, 1–32. doi:doi:10.1002/9781119949138.ch1.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814. doi:10.1016/j.cell.2006.02.008.
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., and Mestre, P. (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* 65, 6589–6601. doi:10.1093/jxb/eru375.
- Chu, Z., Yuan, M., Yao, J., Ge, X., Yuan, B., Xu, C., *et al.* (2006). Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes Dev.* 20, 1250–1255. doi:10.1101/gad.1416306.

- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I., Lippok, B., Smith, R. K., and Bent, A. F. (2000). The Arabidopsis *dnd1* “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9323 LP – 9328. doi:10.1073/pnas.150005697.
- Coburn, B., Sekirov, I., and Finlay, B. B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 535–549. doi:10.1128/CMR.00013-07.
- Copeland, C., Woloshen, V., Huang, Y., and Li, X. (2016). AtCDC48A is involved in the turnover of an NLR immune receptor. *Plant J.* 88, 294–305. doi:10.1111/tpj.13251.
- Corwin, J. A., and Kliebenstein, D. J. (2017). Quantitative resistance: More than just perception of a pathogen. *Plant Cell* 29, 655 LP – 665. doi:10.1105/tpc.16.00915.
- Couto, D., and Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 537–552. doi:10.1038/nri.2016.77.
- Cowger, C., and Arrellano, C. (2010). Plump kernels with high deoxynivalenol linked to late *Gibberella zeae* infection and marginal disease conditions in winter wheat. *Phytopathology* 100, 719–728. doi:10.1094/PHYTO-100-7-0719.
- Cowger, C., Hoffer, M. E., and Mundt, C. C. (2000). Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathol.* 49, 445–451. doi:10.1046/j.1365-3059.2000.00472.x.
- Cristescu, S. M., De Martinis, D., Te Lintel Hekkert, S., Parker, D. H., and Harren, F. J. M. (2002). Ethylene production by *Botrytis cinerea* *in vitro* and in tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5342–5350. doi:10.1128/aem.68.11.5342-5350.2002.
- Crawford, T., Lehotai, N., and Strand, A. (2018). The role of retrograde signals during plant stress responses. *J. Exp. Bot.* 69, 2783–2795. doi:10.1093/jxb/erx481.
- Cui, X., Lu, F., Li, Y., Xue, Y., Kang, Y., Zhang, S., *et al.* (2013). Ubiquitin-specific proteases UBP12 and UBP13 act in circadian clock and photoperiodic flowering regulation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 162, 897 LP – 906. doi:10.1104/pp.112.213009.
- Cuomo, C. A., Guldener, U., Xu, J. R., Trail, F., Turgeon, B. G., Di Pietro, A., *et al.* (2007). The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* (80-.). 317, 1400–1402. doi:10.1126/science.1143708.
- Cuthbert, P. A., Somers, D. J., and Brulé-Babel, A. (2007). Mapping of Fhb2 on chromosome 6BS: A gene controlling Fusarium head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 114, 429–437. doi:10.1007/s00122-006-0439-3.

- Cuthbert, P. A., Somers, D. J., Thomas, J., Cloutier, S., and Brule-Babel, A. (2006). Fine mapping Fhb1, a major gene controlling Fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 112, 1465–1472. doi:10.1007/s00122-006-0249-7.
- D’Arcy, C. J. d’, Eastburn, D. M., and Schumann, G. L. (2001). Illustrated glossary of plant pathology. <http://www.apsnet.org/edcenter/illglossary/Pages/default.aspx>.
- Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833. doi:10.1038/35081161.
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Maruthachalam, K., Bolton, M. D., Santhanam, P., Saber, M. K., *et al.* (2012). Tomato immune receptor Vel recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5110–5115. doi:10.1073/pnas.1119623109.
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., *et al.* (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329, 953–955. doi:10.1126/science.1190859.
- de Torres Zabala, M., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., *et al.* (2015). Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nat. Plants* 1, 15074. doi:10.1038/nplants.2015.74.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M. H., Lafforgue, G., Mansfield, J. W., Rodriguez Egea, P., *et al.* (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO J.* 26, 1434–1443. doi:10.1038/sj.emboj.7601575.
- de Wit, P. J. G. M. (2016). Apoplastic fungal effectors in historic perspective ; a personal view. *New Phytol.* 212, 805–813. doi:10.1111/nph.14144.
- de Wit, P. J. G. M., Mehrabi, R., Van Den Burg, H. a., and Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: Past, present and future: Review. *Mol. Plant Pathol.* 10, 735–747. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00591.x.
- Dedryver, F., Paillard, S., Mallard, S., Robert, O., Trottet, M., Negre, S., *et al.* (2009). Characterization of genetic components involved in durable resistance to stripe rust in the bread wheat “Renan”. *Phytopathology* 99, 968–973. doi:10.1094/PHYTO-99-8-0968.
- Degani, O., Drori, R., and Goldblat, Y. (2015). Plant growth hormones suppress the development of *Harpophora maydis*, the cause of late wilt in maize. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 21, 137–149. doi:10.1007/s12298-014-0265-z.

- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., *et al.* (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 323. doi.org/10.1038/nrmicro.2017.20.
- Dhokane, D., Karre, S., Kushalappa, A. C., and McCartney, C. (2016). Integrated metabolo-transcriptomics reveals *Fusarium* head blight candidate resistance genes in wheat QTL-Fhb2. *PLoS One* 11, 1–27. doi:10.1371/journal.pone.0155851.
- Di Pietro, A., Garcia-MacEira, F. I., Meglecz, E., and Roncero, M. I. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39, 1140–1152.
- Di, X., Takken, F. L. W., and Tintor, N. (2016). How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Front. Plant Sci.* 7, 170. doi:10.3389/fpls.2016.00170.
- Ding, L., Xu, H., Yi, H., Yang, L., Kong, Z., Zhang, L., *et al.* (2011). Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0019008.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., *et al.* (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478, 395–398. doi:10.1038/nature10454.
- Dörfors, F., Holmquist, L., Dixelius, C., and Tzelepis, G. (2019). A LysM effector protein from the basidiomycete *Rhizoctonia solani* contributes to virulence through suppression of chitin-triggered immunity. *Mol. Genet. Genomics*. doi:10.1007/s00438-019-01573-9.
- Dollo, L. (1893). Les lois de l'évolution. *Bull. la société belge géologie* VII, 164–166. doi:10.1007/BF00137351.
- Dornez, E., Croes, E., Gebruers, K., Carpentier, S., Swennen, R., Laukens, K., *et al.* (2010). 2-D DIGE reveals changes in wheat xylanase inhibitor protein families due to *Fusarium graminearum* ΔTri5 infection and grain development. *Proteomics* 10, 2303–2319. doi:10.1002/pmic.200900493.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148, 1667–1686. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9560386.
- Drüge, U., and Schonbeck, F. (1993). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. *J. Plant Physiol.* 141, 40–48. doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80849-7.

- Duveau, F., Yuan, D. C., Metzger, B. P. H., Hodgins-Davis, A., and Wittkopp, P. J. (2017). Effects of mutation and selection on plasticity of a promoter activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E11218 LP-E11227. doi:10.1073/pnas.1713960115.
- Eckardt, N. A. (2002). Plant disease susceptibility genes? *Plant Cell* 14, 1983 LP – 1986. doi:10.1105/tpc.140910.
- Eggert, K., and Pawelzik, E. (2011). Proteome analysis of Fusarium head blight in grains of naked barley (*Hordeum vulgare* subsp. *nudum*). *Proteomics* 11, 972–985. doi:10.1002/pmic.201000322.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., and Turner, J. G. (2002). The Arabidopsis mutant cev1 links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* 14, 1557–1566. doi:10.1105/tpc.002022.
- Ellis, C., and Turner, J. G. (2001). The Arabidopsis mutant cev1 has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell* 13, 1025–1033. doi:10.1105/tpc.13.5.1025.
- Engelhardt, S., Stam, R., and Hückelhoven, R. (2018). Good Riddance? Breaking disease susceptibility in the era of new breeding technologies. *Agronomy* 8. doi:10.3390/agronomy8070114.
- Ewan, R., Pangestuti, R., Thornber, S., Craig, A., Carr, C., O'Donnell, L., *et al.* (2011). Deubiquitinating enzymes AtUBP12 and AtUBP13 and their tobacco homologue NtUBP12 are negative regulators of plant immunity. *New Phytol.* 191, 92–106. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03672.x.
- Fabre, F., Vignassa, M., Urbach, S., Langin, T., and Bonhomme, L. (2019)a. Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving Fusarium head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism. *Plant Cell Environ.* 42, 2291 – 2308 doi:10.1111/pce.13549.
- Fabre, F., Bormann, J., Urbach, S., Roche, S., Langin, T., and Bonhomme, L. (2019)b. 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.
- Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L., and Moury, B. (2015). Epidemiological and evolutionary management of plant resistance: optimizing the deployment of cultivar mixtures in time and space in agricultural landscapes. *Evol. Appl.* 8, 919–932. doi:10.1111/eva.12304.

- Fall, L. A., Salazar, M. M., Drnevich, J., Holmes, J. R., Tseng, M.-C., Kolb, F. L., *et al.* (2019). Field pathogenomics of *Fusarium* head blight reveals pathogen transcriptome differences due to host resistance. *Mycologia* 111, 563–573. doi:10.1080/00275514.2019.1607135.
- Feechan, A., Kocsis, M., Riaz, S., Zhang, W., Gadoury, D. M., Walker, M. A., *et al.* (2015). Strategies for RUN1 deployment using RUN2 and REN2 to manage grapevine Powdery mildew informed by studies of race specificity. *Phytopathology* 105, 1104–1113. doi:10.1094/PHYTO-09-14-0244-R.
- Feechan, A., Anderson, C., Torregrosa, L., Jermakow, A., Mestre, P., Wiedemann-Merdinoglu, S., *et al.* (2013). Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. *Plant J.* 76, 661–674. doi:10.1111/tpj.12327.
- Feldman, M., Bonjean, A., and Angus, W. (2001). The origin of cultivated wheat. *Orig. Cultiv. Wheat. Wheat B.*, 1–56.
- Fernandes, T. R., Segorbe, D., Prusky, D., and Di Pietro, A. (2017). How alkalization drives fungal pathogenicity. *PLOS Pathog.* 13, e1006621. doi.org/10.1371/journal.ppat.1006621.
- Fleurdepine, S., Deragon, J.-M., Devic, M., Guillemot, J., and Bousquet-Antonelli, C. (2007). A bona fide La protein is required for embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 35, 3306–3321. doi:10.1093/nar/gkm200.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the Gene-for-Gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275–296. doi:10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- Flor, H. H. (1958). Mutation to wider virulence in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 48, 297–301.
- Flor, H. H. (1955). Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology* 45, 680–685. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029715656/en/>.
- Fraser, R. S. S. (1990). The Genetics of Resistance to Plant Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 179–200. doi:10.1146/annurev.py.28.090190.001143.
- Freisleben, R., and Lein, A. (1942). Über die Auffindung einer mehltauresistenten Mutante nach Röntgenbestrahlung einer anfälligen reinen Linie von Sommergerste. *Naturwissenschaften* 30, 608. doi:10.1007/BF01488231.
- Freitag, J., Lanver, D., Bohmer, C., Schink, K. O., Bolker, M., and Sandrock, B. (2011). Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog.* 7, e1002044. doi:10.1371/journal.ppat.1002044.

- Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J. D., *et al.* (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nat. Genet.* 38, 953–956. doi:10.1038/ng1839.
- Frye, C. A., Tang, D., and Innes, R. W. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 373 LP – 378. doi:10.1073/pnas.98.1.373.
- Frye, C. A., and Innes, R. W. (1998). An Arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* 10, 947–956. doi:10.1105/tpc.10.6.947.
- Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., *et al.* (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant J.* 89, 502–509. doi:10.1111/tpj.13398.
- Garmendia, G., Pattarino, L., Negrin, C., Martinez-Silveira, A., Pereyra, S., Ward, T. J., *et al.* (2018). Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of Fusarium isolates causing Head blight of barley in Uruguay. *Food Microbiol.* 76, 426–433. doi:10.1016/j.fm.2018.07.005.
- Garvin, D. F., Porter, H., Blankenheim, Z. J., Chao, S., and Dill-Macky, R. (2015). A spontaneous segmental deletion from chromosome arm 3DL enhances Fusarium head blight resistance in wheat. *Genome* 58, 479–488. doi:10.1139/gen-2015-0088.
- Gervais, L., Dedryver, F., Morlais, J.-Y., Bodusseau, V., Negre, S., Bilous, M., *et al.* (2003). Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 106, 961–970. doi:10.1007/s00122-002-1160-5.
- Gillies, S. A., Futardo, A., and Henry, R. J. (2012). Gene expression in the developing aleurone and starchy endosperm of wheat. *Plant Biotechnol. J.* 10, 668–679. doi:10.1111/j.1467-7652.2012.00705.x.
- Ginkel, M. van, and Scharen, A. L. (1988). Host-pathogen relationships of wheat and *Septoria tritici*. *Phytopathology* 78, 762–766. doi:10.1094/Phyto-78-762.
- Giraldo, M. C., Dagdas, Y. F., Gupta, Y. K., Mentlak, T. A., Yi, M., Martinez-Rocha, A. L., *et al.* (2013). Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Commun.* 4, 1996. doi:10.1038/ncomms2996.
- Gladieux, P., Byrnes, E. J., Aguileta, G., Fisher, M., Billmyre, R. B., Heitman, J., *et al.* (2017). Epidemiology and evolution of fungal pathogens in plants and animals. ed. Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition) (London: Elsevier), 71–98. doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00004-4.

- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., and Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by Ascomycete Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 477–498. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150044.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227. doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.
- Godfrey, D., Bohlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., and Thordal-Christensen, H. (2010). Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* 11, 317. doi:10.1186/1471-2164-11-317.
- Golkari, S., Gilbert, J., Prashar, S., and Procunier, J. D. (2007). Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: Identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant Biotechnol. J.* 5, 38–49. doi:10.1111/j.1467-7652.2006.00213.x.
- Goodwin, S. B., M’barek, S. Ben, 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–e1002070. doi:10.1371/journal.pgen.1002070.
- Goswami, R. S., and Kistler, H. C. (2005). Pathogenicity and *in planta* mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology* 95, 1397–1404. doi:10.1094/PHYTO-95-1397.
- Goswami, R. S., and Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5, 515–525. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00252.X.
- Gottwald, S., Samans, B., Lück, S., and Friedt, W. (2012). Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: Two essential mechanisms of *Fusarium* head blight resistance in wheat? *BMC Genomics* 13. doi:10.1186/1471-2164-13-369.
- Gould, S. J. (1970). Dollo on Dollo’s law: Irreversibility and the status of evolutionary laws. *J. Hist. Biol.* 3, 189–212. doi:10.1007/BF00137351.
- Granado, J., Felix, G., and Boller, T. (1995). Perception of fungal sterols in plants (subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalinization in tomato cells). *Plant Physiol.* 107, 485 LP – 490. doi:10.1104/pp.107.2.485.
- Greenberg, J. T., and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6, 201–211. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00361.x.

- 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. doi:10.1371/journal.pone.0040695.
- Gupta, R., Lee, S. E., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Park, S., Wang, Y., *et al.* (2015). Understanding the plant-pathogen interactions in the context of proteomics-generated apoplastic proteins inventory. *Front. Plant Sci.* 6, 352. doi:10.3389/fpls.2015.00352.
- Gunupuru, L. R., Arunachalam, C., Malla, K. B., Kahla, A., Perochon, A., Jia, J., *et al.* (2018). A wheat cytochrome P450 enhances both resistance to deoxynivalenol and grain yield. *PLoS One* 13, e0204992. doi.org/10.1371/journal.pone.0204992.
- Guyon, K., Balagué, C., Roby, D., and Raffaele, S. (2014). Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *BMC Genomics* 15, 336. doi:10.1186/1471-2164-15-336.
- Haggard, J. E., Johnson, E. B., and St Clair, D. A. (2013). Linkage relationships among multiple QTL for horticultural traits and late blight (*P. infestans*) resistance on chromosome 5 introgressed from wild tomato *Solanum habrochaites*. *G3 (Bethesda)*. 3, 2131–2146. doi:10.1534/g3.113.007195.
- Hallen-Adams, H. E., Wenner, N., Kulda, G. A., and Trail, F. (2011). Deoxynivalenol biosynthesis-related gene expression during wheat kernel colonization by *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 101, 1091–1096. doi:10.1094/PHYTO-01-11-0023.
- Hammer, K., and Teklu, Y. (2008). Plant genetic resources: Selected issues from genetic erosion to genetic engineering. *J. Agric. Rural Dev. Trop. Subtrop. (JARTS)* ; Vol 109, No 1 (2008) ; 15-50 109.
- Han, X., and Kahmann, R. (2019). Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Front. Plant Sci.* 10, 822. doi.org/10.3389/fpls.2019.00822.
- Handa, H., Namiki, N., Xu, D., and Ban, T. (2008). Dissecting of the FHB resistance QTL on the short arm of wheat chromosome 2D using a comparative genomic approach: from QTL to candidate gene. *Mol. Breed.* 22, 71–84. doi:10.1007/s11032-008-9157-7.
- Harlan, J. R. (1972). Genetics of disaster. *J. Environ. Qual.* 1, 212–215. doi:10.2134/jeq1972.00472425000100030002x.

- Harris, L. J., Balcerzak, M., Johnston, A., Schneiderman, D., and Ouellet, T. (2016). Host-preferential *Fusarium graminearum* gene expression during infection of wheat, barley, and maize. *Fungal Biol.* 120, 111–123. doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.010.
- He, X., Dreisigacker, S., Singh, R. P., and Singh, P. K. (2019). Genetics for low correlation between *Fusarium* head blight disease and deoxynivalenol (DON) content in a bread wheat mapping population. *Theor. Appl. Genet.* 132, 2401–2411. doi:10.1007/s00122-019-03362-9.
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44, 321–334. doi:10.1023/A:1026592509060.
- Heinlein, M. (2015). Plant virus replication and movement. *Virology* 479–480, 657–671. doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.025.
- Hematy, K., Cherk, C., and Somerville, S. (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 406–413. doi:10.1016/j.pbi.2009.06.007.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., and Doeblemann, G. (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLOS Pathog.* 8, e1002684. doi.org/10.1371/journal.ppat.1002684.
- Hernandez-Verdeja, T., and Strand, A. (2018). Retrograde signals navigate the path to chloroplast development. *Plant Physiol.* 176, 967–976. doi:10.1104/pp.17.01299.
- Hong, S.-Y., So, J., Lee, J., Min, K., Son, H., Park, C., *et al.* (2010). Functional analyses of two syntaxin-like SNARE genes, GzSYN1 and GzSYN2, in the ascomycete *Gibberella zeae*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 364–372. doi.org/10.1016/j.fgb.2010.01.005.
- 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. *J. Plant Physiol.* 168, 51–62. doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014.
- Huckelhoven, R. (2005). Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 9–17. doi:10.1016/j.femsle.2005.03.001.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361, eaar7191.
- Irieda, H., Inoue, Y., Mori, M., Yamada, K., Oshikawa, Y., Saitoh, H., *et al.* (2019). Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 496 LP – 505. doi:10.1073/pnas.1807297116.

- Jain, D., Khurana, J.P. (2018) Role of Pathogenesis-Related (PR) proteins in plant defense mechanism. In: Singh A., Singh I. (eds) *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. Springer, Singapore doi:10.1007/978-981-10-7371-7_12.
- Jashni, M. K., Dols, I. H. M., Iida, Y., Boeren, S., Beenen, H. G., Mehrabi, R., *et al.* (2015). Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 28, 996–1008. doi:10.1094/MPMI-04-15-0074-R.
- Jeon, J.-S., Ryoo, N., Hahn, T.-R., Walia, H., and Nakamura, Y. (2010). Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* PPB 48, 383–392. doi:10.1016/j.plaphy.2010.03.006.
- Jia, H., Zhou, J., Xue, S., Li, G., Yan, H., Ran, C., *et al.* (2018). A journey to understand wheat *Fusarium* head blight resistance in the Chinese wheat landrace Wangshuibai. *Crop J.* 6, 48–59. doi.org/10.1016/j.cj.2017.09.006.
- Jian, J., and Liang, X. (2019). One small RNA of *Fusarium graminearum* targets and silences CEBiP gene in common wheat. *Microorg.* 7. doi:10.3390/microorganisms7100425.
- Jiang, C.-J., Shimono, M., Maeda, S., Inoue, H., Mori, M., Hasegawa, M., *et al.* (2009). Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene OsSSI2 enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 22, 820–9. doi:10.1094/MPMI-22-7-0820.
- Jiao, F., Kawakami, A., and Nakajima, T. (2008). Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 285, 212–219. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01235.x.
- Johal, G. S., and Briggs, S. P. (1992). Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. *Science (80-.).* 258, 985 LP – 987. doi:10.1126/science.1359642.
- Johnson, R. (1983). Genetic background of durable resistance. In: Lamberti F., Waller J.M., Van der Graaff N.A. (eds) *Durable Resistance in Crops*. NATO Advanced Science Institutes Series (Series A: Life Sciences), vol 55. Springer, Boston, MA
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi:10.1038/nature05286.
- Jørgensen, I. H. (1992). Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63, 141–152. doi:10.1007/BF00023919.

- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., *et al.* (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11086–11091. doi:10.1073/pnas.0508882103.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 41–60. doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436.
- 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.org/10.1016/j.pbi.2019.02.005.
- Kawakami, A., Nakajima, T., and Hirayae, K. (2014). Effects of carbon sources and amines on induction of trichothecene production by *Fusarium asiaticum* in liquid culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 352, 204–212. doi:10.1111/1574-6968.12386.
- Kazan, K., Gardiner, D. M., and Manners, J. M. (2012). On the trail of a cereal killer: Recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Mol. Plant Pathol.* 13, 399–413. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00762.x.
- Kessler, S. A., Shimosato-Asano, H., Keinath, N. F., Wuest, S. E., Ingram, G., Panstruga, R., *et al.* (2010). Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. *Science* (80-). 330, 968 LP – 971. doi:10.1126/science.1195211.
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., *et al.* (2010). Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* 22, 1388–1403. doi:10.1105/tpc.109.069666.
- Khodai-kalaki, M., Andrade, A., and Mohamed, F. (2015). *Burkholderia cenocepacia* lipopolysaccharide modification and flagellin glycosylation affect virulence but not innate immune. 6, 1–11. doi:10.1128/mBio.00679-15.Editor.
- Kim, J.-E., Myong, K., Shim, W.-B., Yun, S.-H., and Lee, Y.-W. (2007). Functional characterization of acetylglutamate synthase and phosphoribosylamine-glycine ligase genes in *Gibberella zeae*. *Curr. Genet.* 51, 99–108. doi:10.1007/s00294-006-0110-1.
- Kim, M. G., Da Cunha, L., McFall, A. J., Belkadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J. L., *et al.* (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* 121, 749–759. doi:10.1016/j.cell.2005.03.025.
- King, R., Bird, N., Ramirez-Gonzalez, R., Coghill, J. A., Patil, A., Hassani-Pak, K., *et al.* (2015). Mutation scanning in wheat by exon capture and next-generation sequencing. *PLoS One* 10, e0137549. doi.org/10.1371/journal.pone.0137549.

- Kirchhoff, H. (2019). Chloroplast ultrastructure in plants. *New Phytol.* 223, 565–574. doi:10.1111/nph.15730.
- Koga, H., Dohi, K., and Mori, M. (2004). Absciscic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65, 3–9. doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.11.002.
- 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. *Plant Cell* 30, 285 LP – 299. doi:10.1105/tpc.17.00579.
- Kouzai, Y., Nakajima, K., Hayafune, M., Ozawa, K., Kaku, H., Shibuya, N., *et al.* (2014). CEBiP is the major chitin oligomer-binding protein in rice and plays a main role in the perception of chitin oligomers. *Plant Mol. Biol.* 84, 519–528. doi:10.1007/s11103-013-0149-6.
- Krasileva, K. V, Vasquez-Gross, H. A., Howell, T., Bailey, P., Paraiso, F., Clissold, L., *et al.* (2017). Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E913–E921. doi:10.1073/pnas.1619268114.
- Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Spielmeyer, W., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., *et al.* (2009). A Putative ABC Transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science (80-.).* 323, 1360 LP – 1363. doi:10.1126/science.1166453.
- Kudla, J., Batistic, O., and Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: The lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22, 541–563. doi:10.1105/tpc.109.072686.
- Kugler, K. G., Siegwart, G., Nussbaumer, T., Ametz, C., Spannagl, M., Steiner, B., *et al.* (2013). Quantitative trait loci-dependent analysis of a gene co-expression network associated with Fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics* 14, 728. doi:10.1186/1471-2164-14-728.
- Kumar, L., and Futschik, M. E. (2007). Mfuzz: A software package for soft clustering of microarray data. *Bioinformation* 2, 5–7. doi:10.6026/97320630002005.
- Kwasnieski, J. C., Mogno, I., Myers, C. A., Corbo, J. C., and Cohen, B. A. (2012). Complex effects of nucleotide variants in a mammalian cis-regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 19498 LP – 19503. doi:10.1073/pnas.1210678109.
- Laloi, G., Vergne, E., Durel, C. E., Le Cam, B., and Caffier, V. (2017). Efficiency of pyramiding of three quantitative resistance loci to apple scab. *Plant Pathol.* 66, 412–422. doi:10.1111/ppa.12581.

- 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.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* 171, 249–269. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01777.x.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells. *Plant Cell* 14, 2627 LP – 2641. doi:10.1105/tpc.005579.
- Lee, W.-S., Rudd, J. J., Hammond-Kosack, K. E., and Kanyuka, K. (2013). *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 236–243. doi:10.1094/MPMI-07-13-0201-R.
- Lescuyer, P., Chevallet, M., and Rabilloud, T. (2004). Concepts and therapeutic perspectives of proteomics. *Med. Sci. (Paris)*. 20, 587–592. doi:10.1051/medsci/2004205587.
- Li, T., Zhang, H., Huang, Y., Su, Z., Deng, Y., Liu, H., *et al.* (2019a). Effects of the Fhb1 gene on Fusarium head blight resistance and agronomic traits of winter wheat. *Crop J.* doi.org/10.1016/j.cj.2019.03.005.
- Li, G., Zhou, J., Jia, H., Gao, Z., Fan, M., Luo, Y., *et al.* (2019b). Mutation of a histidine-rich calcium-binding-protein gene in wheat confers resistance to Fusarium head blight. *Nat. Genet.* 51, 1106–1112. doi:10.1038/s41588-019-0426-7.
- Li, C., Haslam, T. M., Kruger, A., Schneider, L. M., Mishina, K., Samuels, L., *et al.* (2018). The beta-Ketoacyl-CoA synthase HvKCS1, encoded by Cer-zh, plays a key role in synthesis of barley leaf wax and germination of barley powdery mildew. *Plant Cell Physiol.* 59, 806–822. doi:10.1093/pcp/pcy020.
- Li, X., Zhao, L., Fan, Y., Jia, Y., Sun, L., Ma, S., *et al.* (2014). Occurrence of mycotoxins in feed ingredients and complete feeds obtained from the Beijing region of China. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 5, 1–8. doi:10.1186/2049-1891-5-37.
- Li, G., Froehlich, J. E., Elowsky, C., Msanne, J., Ostosh, A. C., Zhang, C., *et al.* (2014). Distinct pseudomonas type-III effectors use a cleavable transit peptide to target chloroplasts. *Plant J.* 77, 310–321. doi:10.1111/tpj.12396.
- Li, H., and Cao, Y. (2010). Protein mechanics: From single molecules to functional biomaterials. *Acc. Chem. Res.* 43, 1331–1341. doi:10.1021/ar100057a.

- Lindhout, P. (2002). The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* 124, 217–226. doi:10.1023/A:1015686601404.
- Liu, S., Hall, M. D., Griffey, C. A., and McKendry, A. L. (2009). Meta-Analysis of QTL associated with *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Sci.* 49, 1955–1968. doi:10.2135/cropsci2009.03.0115.
- Llamas, E., Pulido, P., and Rodriguez-Concepcion, M. (2017). Interference with plastome gene expression and Clp protease activity in *Arabidopsis* triggers a chloroplast unfolded protein response to restore protein homeostasis. *PLOS Genet.* 13, e1007022. doi.org/10.1371/journal.pgen.1007022.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., et al. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 513–545. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114623.
- Lorrain, C., Petre, B., and Duplessis, S. (2018). Show me the way: Rust effector targets in heterologous plant systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 46, 19–25. doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.016.
- Lu, Y., and Yao, J. (2018). Chloroplasts at the crossroad of photosynthesis, pathogen infection and plant defense. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3900. doi:10.3390/ijms19123900.
- Lu, X., Zhang, D., Li, S., Su, Y., Liang, Q., Meng, H., et al. (2014). FtsHi4 is essential for embryogenesis due to its influence on chloroplast development in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9, e99741. doi.org/10.1371/journal.pone.0099741.
- Lysøe, E., Seong, K.-Y., and Kistler, H. C. (2011). The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 995–1000. doi:10.1094/MPMI-02-11-0038.
- Ma, H.-X., Bai, G.-H., Gill, B. S., and Hart, L. P. (2006). Deletion of a chromosome arm altered wheat resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in Chinese Spring. *Plant Dis.* 90, 1545–1549. doi:10.1094/PD-90-1545.
- Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 583, 3966–3973. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.036.
- Malbrán, I., Mourellos, C. A., Girotti, J. R., Aulicino, M. B., Balatti, P. A., and Lori, G. A. (2012). Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. *Crop Prot.* 42, 234–243. doi.org/10.1016/j.cropro.2012.05.025.

- Mares, J. H., Gramacho, K. P., Santos, E. C., da Silva Santiago, A., Santana, J. O., de Sousa, A. O., *et al.* (2017). Proteomic analysis during of spore germination of *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao. *BMC Microbiol.* 17, 176. doi:10.1186/s12866-017-1085-4.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., *et al.* (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452, 88. doi.org/10.1038/nature06556.
- Masachis, S., Segorbe, D., Turra, D., Leon-Ruiz, M., Furst, U., El Ghalid, M., *et al.* (2016). A fungal pathogen secretes plant alkalizing peptides to increase infection. *Nat. Microbiol.* 1, 16043. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.43.
- Masci, S., Laino, P., Janni, M., Botticella, E., Di Carli, M., Benvenuto, E., *et al.* (2015). Analysis of quality-related parameters in mature kernels of polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) transgenic bread wheat infected with *Fusarium graminearum*. *J. Agric. Food Chem.* 63, 3962–3969. doi:10.1021/jf506003t.
- Matschi, S., Werner, S., Schulze, W. X., Legen, J., Hilger, H. H., and Romeis, T. (2013). Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. *Plant J.* 73, 883–896. doi:10.1111/tpj.12090.
- Mauch-Mani, B., and Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 409–414. doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.015.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A., and Henikoff, S. (2000). Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123, 439–442. doi:10.1104/pp.123.2.439.
- McCartney, C. A., Somers, D. J., Fedak, G., DePauw, R. M., Thomas, J., Fox, S. L., *et al.* (2007). The evaluation of FHB resistance QTLs introgressed into elite Canadian spring wheat germplasm. *Mol. Breed.* 20, 209–221. doi:10.1007/s11032-007-9084-z.
- McCollum, C., Engelhardt, S., and Hüchelhoven, R. (2019). ROP INTERACTIVE PARTNER b interacts with the ROP GTPase RACB and supports fungal penetration into barley epidermal cells. *bioRxiv*, 750265. doi:10.1101/750265.
- McCormack, M. E., Lopez, J. A., Crocker, T. H., and Mukhtar, M. S. (2016). Making the right connections: Network biology and plant immune system dynamics. *Curr. Plant Biol.* 5, 2–12. doi.org/10.1016/j.cpb.2015.10.002.

- McCormick, S. P., Alexander, N. J., and Harris, L. J. (2010). CLM1 of *Fusarium graminearum* encodes a longiborneol synthase required for culmorin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 136–141. doi:10.1128/AEM.02017-09.
- McDonald, B. A., and Mundt, C. C. (2016). How knowledge of pathogen population biology informs management of *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* 106, 948–955. doi:10.1094/PHYTO-03-16-0131-RVW.
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., *et al.* (2012). Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* 24, 322–335. doi:10.1105/tpc.111.092957.
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Kászonyi, G., Varga, M., Tóth, B., and Varga, J. (2005). Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 112, 267–281. doi:10.1007/s10658-005-2853-9.
- Mesterházy, A. (1995). Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breed.* 114, 377–386. doi:10.1111/j.1439-0523.1995.tb00816.x.
- Miller, J. D., Young, J. C., and Sampson, D. R. (1985). Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight Resistance in spring cereals. *J. Phytopathol.* 113, 359–367. doi:10.1111/j.1439-0434.1985.tb04837.x.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., *et al.* (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19613–19618. doi:10.1073/pnas.0705147104.
- Monaghan, J., Matschi, S., Shorinola, O., Rovenich, H., Matei, A., Segonzac, C., *et al.* (2014). The calcium-dependent protein kinase CPK28 buffers plant immunity and regulates BIK1 turnover. *Cell Host Microbe* 16, 605–615. doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.007.
- Morrison, I. N., O'Brien, T. P., and Kuo, J. (1978). Initial cellularization and differentiation of the aleurone cells in the ventral region of the developing wheat grain. *Planta* 140, 19–30. Available at: <http://www.jstor.org/stable/23373377>.
- Mosquera, G., Giraldo, M. C., Khang, C. H., Coughlan, S., and Valent, B. (2009). Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as Biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell* 21, 1273–1290. doi:10.1105/tpc.107.055228.
- Mukhtar, M. S., Carvunis, A.-R., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., *et al.* (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 333, 596–601. doi:10.1126/science.1203659.

- Mundt, C. C., Cowger, C., and Garrett, K. A. (2002). Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* 124, 245–252. doi:10.1023/A:1015642819151.
- Mundt, C. C. (1990). Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. *Phytopathology* 80, 221–223. doi:10.1094/Phyto-80-221.
- Murphy, E., and De Smet, I. (2014). Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends Plant Sci.* 19, 664–671. doi:10.1016/j.tplants.2014.06.005.
- Murphy, C., Powlowski, J., Wu, M., Butler, G., and Tsang, A. (2011). Curation of characterized glycoside hydrolases of fungal origin. *Database (Oxford)*. 2011, bar020. doi:10.1093/database/bar020.
- Muszevska, A., Stepniewska-Dziubinska, M. M., Steczkiewicz, K., Pawlowska, J., Dziedzic, A., and Ginalska, K. (2017). Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. *Sci. Rep.* 7, 9147. doi:10.1038/s41598-017-09644-w.
- Myers, A. M., Morell, M. K., James, M. G., and Ball, S. G. (2000). Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol.* 122, 989–997. doi:10.1104/pp.122.4.989.
- Naumann, T. A., and Price, N. P. J. (2012). Truncation of class IV chitinases from Arabidopsis by secreted fungal proteases. *Mol. Plant Pathol.* 13, 1135–1139. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00805.x.
- Nejat, N., Rookes, J., Mantri, N. L., and Cahill, D. M. (2017). Plant–pathogen interactions: Toward development of next-generation disease-resistant plants. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 229–237. doi:10.3109/07388551.2015.1134437.
- Neu, E., and Debener, T. (2019). Prediction of the *Diplocarpon rosae* secretome reveals candidate genes for effectors and virulence factors. *Fungal Biol.* 123, 231–239. doi.org/10.1016/j.funbio.2018.12.003.
- Nicaise, V., Roux, M., and Zipfel, C. (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: Pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol.* 150, 1638–1647. doi:10.1104/pp.109.139709.
- Nie, L., Wu, G., and Zhang, W. (2006). Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: A quantitative analysis. *Genetics* 174, 2229–2243. doi:10.1534/genetics.106.065862.
- Nishimura, K., Kato, Y., and Sakamoto, W. (2017). Essentials of proteolytic machineries in chloroplasts. *Mol. Plant* 10, 4–19. doi:10.1016/j.molp.2016.08.005.

- Nivaskumar, M., and Francetic, O. (2014). Type II secretion system: A magic beanstalk or a protein escalator. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1843, 1568–1577. doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.020.
- Nühse, T. S. (2012). Cell wall integrity signaling and innate immunity in plants. *Front. Plant Sci.* 3, 280. doi:10.3389/fpls.2012.00280.
- Nürnberg, T., and Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: New insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* 6, 335–345. doi:10.1111/j.1364-3703.2005.00279.x.
- O’Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., *et al.* (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44, 1060–1065. doi:10.1038/ng.2372.
- O’Connell, R. J., and Panstruga, R. (2006). Tete a tete inside a plant cell: Establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol.* 171, 699–718. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01829.x.
- Oh, M., Son, H., Choi, G. J., Lee, C., Kim, J.-C., Kim, H., *et al.* (2016). Transcription factor ART1 mediates starch hydrolysis and mycotoxin production in *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 755–768. doi:10.1111/mpp.12328.
- Olson, Skavdahl, Ramberg, Osterman, and Markwell (2000). Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: Characterization and possible targeting to the chloroplast. *Plant Sci.* 159, 205–212. doi:10.1016/s0168-9452(00)00337-x.
- Pan, Y., Liu, Z., Rocheleau, H., Fauteux, F., Wang, Y., McCartney, C., *et al.* (2018)a. Transcriptome dynamics associated with resistance and susceptibility against *Fusarium* head blight in four wheat genotypes. *BMC Genomics* 19, 642. doi:10.1186/s12864-018-5012-3.
- Pan, J., Tan, J., Wang, Y., Zheng, X., Owens, K., Li, D., *et al.* (2018)b. STAYGREEN (CsSGR) is a candidate for the anthracnose (*Colletotrichum orbiculare*) resistance locus cla in Gy14 cucumber. *Theor. Appl. Genet.* 131, 1577–1587. doi:10.1007/s00122-018-3099-1.
- Panahirad, S., Zaare-Nahandi, F., Mohammadi, N., Alizadeh-Salteh, S., and Safaie, N. (2014). Effects of salicylic acid on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 accumulation in pistachio (*Pistacia vera* L.) fruit. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1758–1763. doi:10.1002/jsfa.6488.
- Panek, J., El Alaoui, H., Mone, A., Urbach, S., Demetere, E., Texier, C., *et al.* (2014). Hijacking of host cellular functions by an intracellular parasite, the microsporidian *Anncaliia algerae*. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0100791.

- Panstruga, R., and Dodds, P. N. (2009). Terrific protein traffic: The mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* 324, 748–750. doi:10.1126/science.1171652.
- Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.* 58, 409–424. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x.
- Parker, M. A. (1988). Genetic uniformity and disease resistance in a clonal plant. *Am. Nat.* 132, 538–549. doi:10.1086/284870.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., and McLeod, L. (1995). Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—A review. *Plant Pathol.* 44, 207–238. doi:10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x.
- Pasquet, J.-C., Changenet, V., Macadré, C., Boex-Fontvieille, E., Soulhat, C., Bouchabké-Coussa, O., *et al.* (2016). A *Brachypodium* UDP-glycosyltransferase confers root tolerance to deoxynivalenol and resistance to Fusarium infection. *Plant Physiol.* 172, 559–574. doi:10.1104/pp.16.00371.
- Patwardhan, R. P., Lee, C., Litvin, O., Young, D. L., Pe’er, D., and Shendure, J. (2009). High-resolution analysis of DNA regulatory elements by synthetic saturation mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 27, 1173–1175. doi:10.1038/nbt.1589.
- Pauquet, J., Bouquet, A., This, P., and Adam-Blondon, A.-F. (2001). Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 103, 1201–1210. doi:10.1007/s001220100664.
- Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., and Bai, Y. (2009). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Mol. Breed.* 25, 1. doi:10.1007/s11032-009-9323-6.
- Pedersen, C., Ver Loren van Themaat, E., McGuffin, L. J., Abbott, J. C., Burgis, T. A., Barton, G., *et al.* (2012). Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics* 13, 694. doi:10.1186/1471-2164-13-694.
- Pessina, S., Lenzi, L., Perazzolli, M., Campa, M., Dalla Costa, L., Urso, S., *et al.* (2016). Knockdown of MLO genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. *Hortic Res* 3, 16016. doi:10.1038/hortres.2016.16
- Petit-Houdenot, Y., and Fudal, I. (2017). Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. *Front. Plant Sci.* 8, 1072. doi:10.3389/fpls.2017.01072.

- Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G. O., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., *et al.* (2016)a. Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. *Cell. Microbiol.* 18, 453–465. doi:10.1111/cmi.12530.
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Krasileva, K. V, Win, J., *et al.* (2016)b. Heterologous expression screens in *Nicotiana benthamiana* identify a candidate effector of the wheat yellow rust pathogen that associates with processing bodies. *PLoS One* 11, e0149035. doi:10.1371/journal.pone.0149035.
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., *et al.* (2015). Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 689–700. doi:10.1094/MPMI-01-15-0003-R.
- 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. *Plant J.* 90, 720–737. doi:10.1111/tpj.13429.
- Plissonneau, C., Hartmann, F. E., and Croll, D. (2018). Pangenome analyses of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveal the structural basis of a highly plastic eukaryotic genome. *BMC Biol.* 16, 5. doi:10.1186/s12915-017-0457-4.
- Plissonneau, C., Benevenuto, J., Mohd-Assaad, N., Fouché, S., Hartmann, F. E., and Croll, D. (2017). Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector–driven fungal pathogen evolution. *Front. Plant Sci.* 8, 119. doi:10.3389/fpls.2017.00119.
- Ponnala, L., Wang, Y., Sun, Q., and van Wijk, K. J. (2014). Correlation of mRNA and protein abundance in the developing maize leaf. *Plant J.* 78, 424–440. doi:10.1111/tpj.12482.
- Puri, K. D., Yan, C., Leng, Y., and Zhong, S. (2016). RNA-Seq revealed differences in transcriptomes between 3ADON and 15ADON populations of *Fusarium graminearum* *in vitro* and *in planta*. *PLoS One* 11, e0163803. doi:10.1371/journal.pone.0163803.
- Qi, P.-F., Johnston, A., Balcerzak, M., Rocheleau, H., Harris, L. J., Long, X.-Y., *et al.* (2012). Effect of salicylic acid on *Fusarium graminearum*, the major causal agent of Fusarium head blight in wheat. *Fungal Biol.* 116, 413–426. doi:10.1016/j.funbio.2012.01.001.
- Quarantin, A., Glasenapp, A., Schafer, W., Favaron, F., and Sella, L. (2016). Involvement of the *Fusarium graminearum* cerato-platanin proteins in fungal growth and plant infection. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 109, 220–229. doi:10.1016/j.plaphy.2016.10.001.

- Quirino, B. F., Candido, E. S., Campos, P. F., Franco, O. L., and Krüger, R. H. (2010). Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. *Phytochemistry* 71, 351–362. doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.11.005.
- R Core Team (2018). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rabe, F., Ajami-Rashidi, Z., Doehlemann, G., Kahmann, R., and Djamei, A. (2013). Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 89, 179–188. doi:10.1111/mmi.12269.
- Raffaele, S., and Kamoun, S. (2012). Genome evolution in filamentous plant pathogens: Why bigger can be better. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 417. doi.org/10.1038/nrmicro2790.
- Rafiqi, M., Gan, P. H. P., Ravensdale, M., Lawrence, G. J., Ellis, J. G., Jones, D. A., *et al.* (2010). Internalization of Flax rust avirulence proteins into Flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *Plant Cell* 22, 2017 LP – 2032. doi:10.1105/tpc.109.072983.
- Rep, M., and Kistler, H. C. (2010). The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 420–426. doi:10.1016/j.pbi.2010.04.004.
- Rocheleau, H., Al-harhi, R., and Ouellet, T. (2019). Degradation of salicylic acid by *Fusarium graminearum*. *Fungal Biol.* 123, 77–86. doi.org/10.1016/j.funbio.2018.11.002.
- Rodrigues, I., and Naehrer, K. (2012). A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins (Basel)*. 4, 663–675. doi:10.3390/toxins4090663.
- Rodriguez-Herva, J. J., Gonzalez-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antunez-Lamas, M., Rio-Alvarez, I., Li, Z., *et al.* (2012). A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cell. Microbiol.* 14, 669–681. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01749.x.
- Rogers, S. O., and Quatrano, R. S. (1983). Morphological staging of wheat caryopsis development. *Am. J. Bot.* 70, 308–311. doi:10.2307/2443277.
- Rovenich, H., Boshoven, J. C., and Thomma, B. P. H. J. (2014). Filamentous pathogen effector functions: Of pathogens, hosts and microbiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 96–103. doi:10.1016/j.pbi.2014.05.001.
- Sacritán, S., and García-Arenal, F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* 9, 369–384. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x.
- Saijo, Y., Loo, E. P., and Yasuda, S. (2018). Pattern recognition receptors and signaling in plant–microbe interactions. *Plant J.* 93, 592–613. doi:10.1111/tpj.13808.

- 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.
- Sakamoto, W., Miyagishima, S.-Y., and Jarvis, P. (2008). Chloroplast biogenesis: Control of plastid development, protein import, division and inheritance. *Arab. B.* 6, e0110–e0110. doi:10.1199/tab.0110.
- Salameh, A., Buerstmayr, M., Steiner, B., Neumayer, A., Lemmens, M., and Buerstmayr, H. (2011). Effects of introgression of two QTL for Fusarium head blight resistance from Asian spring wheat by marker-assisted backcrossing into European winter wheat on Fusarium head blight resistance, yield and quality traits. *Mol. Breed.* 28, 485–494. doi:10.1007/s11032-010-9498-x.
- Salcedo, A., Rutter, W., Wang, S., Akhunova, A., Bolus, S., Chao, S., *et al.* (2017). Variation in the *AvrSr35* gene determines *Sr35* resistance against wheat stem rust race Ug99. *Science (80-.)*. 358, 1604–1606. doi:10.1126/science.aao7294.
- Sanchez-Vallet, A., Mesters, J. R., and Thomma, B. P. H. J. (2015). The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 171–183. doi:10.1093/femsre/fuu003.
- Sanfacon, H. (2015). Plant translation factors and virus resistance. *Viruses* 7, 3392–3419. doi:10.3390/v7072778.
- Scheler, B., Schnepf, V., Galgenmuller, C., Ranf, S., and Huckelhoven, R. (2016). Barley disease susceptibility factor RACB acts in epidermal cell polarity and positioning of the nucleus. *J. Exp. Bot.* 67, 3263–3275. doi:10.1093/jxb/erw141.
- Serrano, I., Audran, C., and Rivas, S. (2016). Chloroplasts at work during plant innate immunity. *J. Exp. Bot.* 67, 3845–3854. doi:10.1093/jxb/erw088.
- Schroeder, H. W., and Christensen, J. J. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53, 831–838.
- Shapiguzov, A., Vainonen, J. P., Wrzaczek, M., and Kangasjarvi, J. (2012). ROS-talk - How the apoplast, the chloroplast, and the nucleus get the message through. *Front. Plant Sci.* 3, 292. doi:10.3389/fpls.2012.00292.
- Shen, Y., Liu, N., Li, C., Wang, X., Xu, X., Chen, W., *et al.* (2017). The early response during the interaction of fungal phytopathogen and host plant. *Open Biol.* 7, 170057. doi:10.1098/rsob.170057.

- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., *et al.* (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J.* 64, 204–214. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04324.x.
- Shin, S., Son, J.-H., Park, J.-C., Kim, K.-H., Yoon, Y.-M., Cheong, Y.-K., *et al.* (2018). Comparative pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates from wheat kernels in Korea. *Plant Pathol. J.* 34, 347–355. doi:10.5423/PPJ.OA.01.2018.0013.
- Sierla, M., Rahikainen, M., Salojärvi, J., Kangasjarvi, J., and Kangasjarvi, S. (2013). Apoplastic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2220–2239. doi:10.1089/ars.2012.5016.
- Smith, W. G. (1884). Diseases of field and garden crops : Chiefly such as are caused by fungi. London,: MacMillan, <https://www.biodiversitylibrary.org/item/70845>.
- Soanes, D. M., Richards, T. A., and Talbot, N. J. (2007). Insights from sequencing fungal and oomycete genomes: What can we learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? *Plant Cell* 19, 3318 LP – 3326. doi:10.1105/tpc.107.056663.
- Sowden, R. G., Watson, S. J., and Jarvis, P. (2017). The role of chloroplasts in plant pathology. *Essays Biochem.* 62, 21–39. doi:10.1042/EBC20170020.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., and Taylor, J. M. (2018). Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Mol. Plant Pathol.*, 1–23. doi:10.1111/mpp.12682.
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Dodds, P. N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K. B., *et al.* (2016). EffectorP: Predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol.* 210, 743–761. doi:10.1111/nph.13794.
- Spoel, S. H., and Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3, 348–351. doi:10.1016/j.chom.2008.05.009.
- Srinivasachary, Gosman, N., Steed, A., Simmonds, J., Leverington-Waite, M., Wang, Y., *et al.* (2008). Susceptibility to Fusarium head blight is associated with the Rht-D1b semi-dwarfing allele in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 116, 1145–1153. doi:10.1007/s00122-008-0742-2.
- Stam, R., and McDonald, B. A. (2018). When resistance gene pyramids are not durable - The role of pathogen diversity. *Mol. Plant Pathol.* 19, 521–524. doi:10.1111/mpp.12636.
- Steiner, B., Buerstmayr, M., Wagner, C., Danler, A., Eshonkulov, B., Ehn, M., *et al.* (2019). Fine-mapping of the Fusarium head blight resistance QTL Qfhs.ifa-5A identifies two resistance QTL

associated with anther extrusion. *Theor. Appl. Genet.* 132, 2039–2053. doi:10.1007/s00122-019-03336-x.

- Steiner, B., Buerstmayr, M., Michel, S., Schweiger, W., Lemmens, M., and Buerstmayr, H. (2017). Breeding strategies and advances in line selection for Fusarium head blight resistance in wheat. *Trop. Plant Pathol.* 42, 165–174. doi:10.1007/s40858-017-0127-7.
- Stenberg, J. A., and Muola, A. (2017). How Should Plant Resistance to Herbivores Be Measured? *Front. Plant Sci.* 8, 663. doi:10.3389/fpls.2017.00663.
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 233–263. doi:10.1146/annurev.phyto.112408.132637.
- Su, Z., Bernardo, A., Tian, B., Chen, H., Wang, S., Ma, H., *et al.* (2019). A deletion mutation in TaHRC confers Fhb1 resistance to Fusarium head blight in wheat. *Nat. Genet.* 51, 1099–1105. doi:10.1038/s41588-019-0425-8.
- Szabo-Hever, A., Zhang, Q., Friesen, T. L., Zhong, S., Elias, E. M., Cai, X., *et al.* (2018). Genetic diversity and resistance to Fusarium head blight in synthetic hexaploid wheat derived from *Aegilops tauschii* and diverse *Triticum turgidum* subspecies. *Front. Plant Sci.* 9, 1829. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01829>.
- Talas, F., Kalih, R., and Miedaner, T. (2012). Within-field variation of *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness and deoxynivalenol production in wheat head blight. *Phytopathology* 102, 128–134. doi:10.1094/PHYTO-06-11-0162.
- Tang, D., Christiansen, K. M., and Innes, R. W. (2005). Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in Arabidopsis by the EDR1 protein kinase. *Plant Physiol.* 138, 1018–1026. doi:10.1104/pp.105.060400.
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., and Joosten, M. H. a J. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23, 4–15. doi:10.1105/tpc.110.082602.
- Thynne, E., Saur, I. M. L., Simbaqueba, J., Ogilvie, H. A., Gonzalez-Cendales, Y., Mead, O., *et al.* (2017). Fungal phytopathogens encode functional homologues of plant rapid alkalization factor (RALF) peptides. *Mol. Plant Pathol.* 18, 811–824. doi:10.1111/mpp.12444.
- Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., and Coaker, G. (2016). Plant-pathogen effectors: Cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 419–441. doi:10.1146/annurev-phyto-080615-100204.

- Tóth, B., Kászonyi, G., Bartók, T., Varga, J., and Mesterházy, Á. (2008). Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. *Plant Breed.* 127, 1–8. doi:10.1111/j.1439-0523.2008.01412.x.
- Trail, F. (2009). For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol.* 149, 103–110. doi:10.1104/pp.108.129684.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F. (2009). Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet.* 5, e1000772. doi:10.1371/journal.pgen.1000772.
- Ueno, Y. (1984). Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, 124–132. doi:10.1016/0272-0590(84)90144-1.
- Uppalapati, S. R., Ishiga, Y., Doraiswamy, V., Bedair, M., Mittal, S., Chen, J., *et al.* (2012). Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. *Plant Cell* 24, 353–370. doi:10.1105/tpc.111.093104.
- Valot, B., Langella, O., Nano, E., and Zivy, M. (2011). MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics* 11, 3572–3577. doi:10.1002/pmic.201100120.
- van de Wouw, M., Kik, C., van Hintum, T., van Treuren, R., and Visser, B. (2010). Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. *Plant Genet. Resour.* 8, 1–15. doi:10.1017/S1479262109990062.
- van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H. A. J., Vervoort, J., and de Wit, P. J. G. M. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19, 1420–1430. doi:10.1094/MPMI-19-1420.
- 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.
- van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M. C., Rodenburg, N., Pauwels, L., *et al.* (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOII-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* 25, 744–761. doi:10.1105/tpc.112.108548.
- van der Meer-Janssen, Y. P. M., van Galen, J., Batenburg, J. J., and Helms, J. B. (2010). Lipids in host-pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog. Lipid Res.* 49, 1–26. doi:10.1016/j.plipres.2009.07.003.

- van Esse, H. P., Bolton, M. D., Stergiopoulos, I., de Wit, P. J. G. M., and Thomma, B. P. H. J. (2007). The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 20, 1092–1101. doi:10.1094/MPMI-20-9-1092.
- van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162. doi:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- van Loon, L. C., and Van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’: II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 199–211. doi.org/10.1016/0042-6822(70)90395-8.
- van Schie, C. C. N., and Takken, F. L. W. (2014). Susceptibility genes 101: How to be a good host. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 551–581. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045854.
- van Valen, L. (1973). *A New Evolutionary Law*.
- Vandereyken, K., Van Leene, J., De Coninck, B., and Cammue, B. P. A. (2018). Hub protein controversy: Taking a closer look at plant stress response hubs. *Front. Plant Sci.* 9, 694. doi:10.3389/fpls.2018.00694.
- VanderPlank, J. E. (1968). *Disease resistance in plants*. Academic Press. <https://books.google.fr/books?id=ejFOAQAAIAAJ>.
- Venske, E., Dos Santos, R. S., Farias, D. da R., Rother, V., da Maia, L. C., Pegoraro, C., *et al.* (2019). Meta-analysis of the QTLome of Fusarium head blight resistance in bread wheat: Refining the Current Puzzle. *Front. Plant Sci.* 10, 727. doi:10.3389/fpls.2019.00727.
- Vogel, J. P., Raab, T. K., Schiff, C., and Somerville, S. C. (2002). *PMR6*, a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 2095 LP – 2106. doi:10.1105/tpc.003509.
- Vogel, J., and Somerville, S. (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1897–1902. doi:10.1073/pnas.030531997.
- Voltersen, V., Blango, M. G., Herrmann, S., Schmidt, F., Heinekamp, T., Strassburger, M., *et al.* (2018). Proteome analysis reveals the conidial surface protein CcpA essential for virulence of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *MBio* 9, e01557-18. doi:10.1128/mBio.01557-18.

- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., et al. (2017). ePlant: Visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell* 29, 1806–1821. doi:10.1105/tpc.17.00073.
- Waldron, B. L., Moreno-Sevilla, B., Anderson, J. A., Stack, R. W., and Frohberg, R. C. (1999). RFLP mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. *Crop Sci.* 39, 805–811. doi:10.2135/cropsci1999.0011183X003900030032x.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., and Waksman, G. (2010). Type IV secretion systems: Versatility and diversity in function. *Cell. Microbiol.* 12, 1203–1212. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x.
- Wang, Y., Tan, J., Wu, Z., VandenLangenberg, K., Wehner, T. C., Wen, C., et al. (2019). STAYGREEN, STAY HEALTHY: A loss-of-susceptibility mutation in the STAYGREEN gene provides durable, broad-spectrum disease resistances for over 50 years of US cucumber production. *New Phytol.* 221, 415–430. doi:10.1111/nph.15353.
- Wang, Q., Shao, B., Shaikh, F. I., Friedt, W., and Gottwald, S. (2017). Wheat resistances to Fusarium root rot and head blight are both associated with deoxynivalenol- and jasmonate-related gene expression. *Phytopathology* 108, 602–616. doi:10.1094/PHYTO-05-17-0172-R.
- Wang, C., Zhang, S., Hou, R., Zhao, Z., Zheng, Q., Xu, Q., et al. (2011)a. Functional analysis of the kinome of the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog.* 7, e1002460–e1002460. doi:10.1371/journal.ppat.1002460.
- Wang, J.-H., Ndoeye, M., Zhang, J.-B., Li, H.-P., and Liao, Y.-C. (2011)b. Population structure and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* species complex. *Toxins (Basel)*. 3, 1020–1037. doi:10.3390/toxins3081020.
- Wawra, S., Fesel, P., Widmer, H., Timm, M., Seibel, J., Leson, L., et al. (2016). The fungal-specific β -glucan-binding lectin FGB1 alters cell-wall composition and suppresses glucan-triggered immunity in plants. *Nat. Commun.* 7, 13188. doi.org/10.1038/ncomms13188.
- Wawrzynska, A., Christiansen, K. M., Lan, Y., Rodibaugh, N. L., and Innes, R. W. (2008). Powdery mildew resistance conferred by loss of the ENHANCED DISEASE RESISTANCE1 protein kinase is suppressed by a missense mutation in KEEP ON GOING, a regulator of abscisic acid signaling. *Plant Physiol.* 148, 1510–1522. doi:10.1104/pp.108.127605.
- Weidenbach, D., Jansen, M., Franke, R. B., Hensel, G., Weissgerber, W., Ulferts, S., et al. (2014). Evolutionary conserved function of barley and Arabidopsis 3-KETOACYL-CoA SYNTHASES in providing wax signals for germination of powdery mildew fungi. *Plant Physiol.* 166, 1621–1633. doi:10.1104/pp.114.246348.

- Weis, C., Hildebrandt, U., Hoffmann, T., Hemetsberger, C., Pfeilmeier, S., König, C., *et al.* (2014). CYP83A1 is required for metabolic compatibility of Arabidopsis with the adapted powdery mildew fungus *Erysiphe cruciferarum*. *New Phytol.* 202, 1310–1319. doi:10.1111/nph.12759.
- Weßling, R., Epple, P., Altmann, S., He, Y., Yang, L., Henz, S. R., *et al.* (2014). Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. *Cell Host Microbe* 16, 364–375. doi:10.1016/j.chom.2014.08.004.
- Wilson, W., Dahl, B., and Njanje, W. (2018). Economic costs of Fusarium Head Blight, scab and deoxynivalenol. *World Mycotoxin J.* 11, 291–302. doi:10.3920/WMJ2017.2204.
- Woolhouse, M. E. J., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., and Levin, B. R. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat. Genet.* 32, 569–577. doi:10.1038/ng1202-569.
- Wu, Y., Xiao, N., Yu, L., Pan, C., Li, Y., Zhang, X., *et al.* (2015). Combination patterns of major R genes determine the level of resistance to the *M. oryzae* in Rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS One* 10, e0126130. doi.org/10.1371/journal.pone.0126130.
- Wullschleger, S. D., and Reid, C. P. P. (1990). Implication of ectomycorrhizal fungi in the cytokinin relations of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *New Phytol.* 116, 681–688. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00554.x.
- Xia, S., Xiao, L., Gannon, P., and Li, X. (2010). RFC3 regulates cell proliferation and pathogen resistance in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* 5, 168–170. doi:10.4161/psb.5.2.10526.
- Xia, S., Zhu, Z., Hao, L., Chen, J.-G., Xiao, L., Zhang, Y., *et al.* (2009). Negative regulation of systemic acquired resistance by replication factor C subunit3 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 150, 2009–2017. doi:10.1104/pp.109.138321.
- Xie, Q., Chen, A., Zhang, Y., Zhang, C., Hu, Y., Luo, Z., *et al.* (2019). ESCRT-III accessory proteins regulate fungal development and plant infection in *Fusarium graminearum*. *Curr. Genet.* 65, 1041–1055. doi:10.1007/s00294-019-00949-z.
- Xiong, L., and Yang, Y. (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15, 745–759. doi:10.1105/tpc.008714.
- Xu, Q., Tang, C., Wang, X., Sun, S., Zhao, J., Kang, Z., *et al.* (2019). An effector protein of the wheat stripe rust fungus targets chloroplasts and suppresses chloroplast function. *Nat. Commun.* 10, 5571. doi:10.1038/s41467-019-13487-6.

- Xu, X., and Nicholson, P. (2009). Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 83–103. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081737.
- Xue, S., Xu, F., Tang, M., Zhou, Y., Li, G., An, X., *et al.* (2011). Precise mapping Fhb5, a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 123, 1055–1063. doi:10.1007/s00122-011-1647-z.
- Xue, S., Li, G., Jia, H., Xu, F., Lin, F., Tang, M., *et al.* (2010). Fine mapping Fhb4, a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 121, 147–156. doi:10.1007/s00122-010-1298-5.
- Xue, A. G., Armstrong, K. C., Voldeng, H. D., Fedak, G., and Babcock, C. (2004). Comparative aggressiveness of isolates of Fusarium spp. causing head blight on wheat in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 26, 81–88. doi:10.1080/07060660409507117.
- Yang, X., Li, Y., Qi, M., Liu, Y., and Li, T. (2019). Targeted control of chloroplast quality to improve plant acclimation: From protein import to degradation. *Front. Plant Sci.* 10, 958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00958>
- Yang, W., Dong, R., Liu, L., Hu, Z., Li, J., Wang, Y., *et al.* (2016). A novel mutant allele of SSI2 confers a better balance between disease resistance and plant growth inhibition on *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 16, 208. doi:10.1186/s12870-016-0898-x.
- Yang, B., Sugio, A., and White, F. F. (2006). Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10503–10508. doi:10.1073/pnas.0604088103.
- Yao, S.-H., Guo, Y., Wang, Y.-Z., Zhang, D., Xu, L., and Tang, W.-H. (2016). A cytoplasmic Cu-Zn superoxide dismutase SOD1 contributes to hyphal growth and virulence of *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* 91, 32–42. doi:10.1016/j.fgb.2016.03.006.
- Yu, L.-X., Chao, S., Singh, R. P., and Sorrells, M. E. (2017). Identification and validation of single nucleotide polymorphic markers linked to Ug99 stem rust resistance in spring wheat. *PLoS One* 12, e0171963–e0171963. doi:10.1371/journal.pone.0171963.
- Zhang, X., Fu, J., Hiromasa, Y., Pan, H., and Bai, G. (2013). Differentially expressed proteins associated with Fusarium head blight resistance in wheat. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0082079.
- Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Xu, J., *et al.* (2012a). Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *PLoS One* 7, e31722. doi:10.1371/journal.pone.0031722.

- Zhang, X.-W., Jia, L.-J., Zhang, Y., Jiang, G., Li, X., Zhang, D., *et al.* (2012b). *In planta* stage-specific fungal gene profiling elucidates the molecular strategies of *Fusarium graminearum* growing inside wheat coleoptiles. *Plant Cell* 24, 5159 LP – 5176. doi:10.1105/tpc.112.105957.
- Zhao, L., Ma, X., Su, P., Ge, W., Wu, H., Guo, X., *et al.* (2018). Cloning and characterization of a specific UDP-glycosyltransferase gene induced by DON and *Fusarium graminearum*. *Plant Cell Rep.* 37, 641–652. doi:10.1007/s00299-018-2257-x.
- Zhong, Z., Marcel, T. C., Hartmann, F. E., Ma, X., Plissonneau, C., Zala, M., *et al.* (2017). A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the Stb6 resistance gene. *New Phytol.* 214, 619–631. doi:10.1111/nph.14434.
- Zhou, W., Eudes, F., and Laroche, A. (2006). Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics* 6, 4599–4609. doi:10.1002/pmic.200600052.
- Zhu, Z., Hao, Y., Mergoum, M., Bai, G., Humphreys, G., Cloutier, S., *et al.* (2019). Breeding wheat for resistance to Fusarium head blight in the Global North: China, USA, and Canada. *Crop J.* doi:10.1016/j.cj.2019.06.003.
- Zhu, X., Zhong, S., Chao, S., Gu, Y. Q., Kianian, S. F., Elias, E., *et al.* (2016). Toward a better understanding of the genomic region harboring Fusarium head blight resistance QTL Qfhs.ndsu-3AS in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 129, 31–43. doi:10.1007/s00122-015-2606-x.
- Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Plesch, G., and Müller-Röber, B. (1999). Ion channels in plant signaling. *Cell. Mol. Life Sci. C.* 55, 183–203. doi:10.1007/s000180050284.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351. doi:10.1016/j.it.2014.05.004.
- Zuccaro, A., Lahrmann, U., Güldener, U., Langen, G., Pfiffli, S., Biedenkopf, D., *et al.* (2011). Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathog.* 7, e1002290–e1002290. doi:10.1371/journal.ppat.1002290.

Matériels et Méthodes supplémentaires

I – Analyse des spécificités protéomiques des spores de deux souches de *F. graminearum* d'agressivité contrastée

Les données protéomiques présentées ici pour MDC_Fg1 sont issues des mêmes échantillons que ceux présentés dans Fabre *et al.*, (2019)b. L'extraction et l'analyse en spectrométrie de masse des protéines de la souche MDC_Fu1 ont été réalisées en suivant la même procédure que celle décrite dans Fabre *et al.*, 2019b. Pour cette analyse, l'identification des protéines a été réalisée en suivant la même méthode que celle décrite dans Fabre *et al.*, (2019) à l'exception du fait que l'identification a été réalisée en utilisant une concaténation de banques protéiques contenant les contaminants standards (trypsin, keratins, etc) et les protéomes de MDC_Fg1 (13166 accessions, 01/2019) et MDC_FgU1 (13014 accessions, 01/2019) issus des re-séquençages des deux souches réalisés au laboratoire (Alouane *et al.*, 2018 ; Alouane *et al.* en préparation).

II – Analyse de la colonisation de l'épi par le mycélium fongique

La souche Ds-Red de *F. graminearum* utilisée pour cette expérimentation a été fournie par Joerg Bormann (Institute of Plant Science and Microbiology, University of Hamburg, Germany) et est identique à celle analysée dans (Quarantin *et al.*, 2016). Les analyses en microscopie ont été réalisées sur tissus vivants à l'aide d'une loupe binoculaire et d'un microscope à confocale en collaboration avec Aurélia Boulaflous (UMR 6293 Génétique Reproduction et Développement (GReD), Clermont-Ferrand). La loupe binoculaire utilisée était une Olympus SZX12 équipée d'une lentille Olympus DF PLAPO 1.2X PF couplée avec une source d'excitation CoolLED pE-300 portant deux filtres colométriques (*i.e.* Excitation: ET 560/40 X ; Emission: EM 630/75 M). L'acquisition a été réalisée en utilisant une camera Olympus XC30 et l'analyse des images avec le logiciel Cellsens (Olympus). Les analyses en microscopie confocale ont été réalisées avec à l'aide d'un microscope LEICA TCS SP5-CSLM. Les images CSLM (confocal laser scanning microscope) ont été obtenues par excitation de la protéine Ds-Red en utilisant un laser argon de longueur d'onde 561 nm. Les signaux de fluorescence ont été traités en utilisant un séparateur de faisceau acoustique-optique et les

émissions de fluorescence ont été collectées par le photomultiplicateur 2 du microscope confocal (570-636 nm). Les images ont ensuite été analysées en utilisant le logiciel LAS AF Lite (LEICA).

III – Spécificité des réponses de différents fonds génétiques du blé tendre à l'infection de différentes souches de *Fusarium graminearum*

a) Identification et quantification des peptides et protéines à partir de l'analyse MS / MS

Toutes les étapes précédant l'identification et la quantification des protéines de blé ont été décrites au cours de Fabre *et al.* (2019)b. L'identification des protéines végétales pour chaque échantillon a été réalisée à partir des peptides assignés au blé en accord avec la banque blé utilisée (IWGSC, v1.0 269472 entries, 04/2017). Les protéines identifiées ont été analysées et regroupées à l'aide du logiciel X!TandemPipeline v0.2.40 c++ (Langella *et al.*, 2017) à partir des peptides détectés qui présentaient une E-value < 0.05. Seules les protéines identifiées à partir d'au moins deux peptides, présentant une E-value < 0.0001 et dont le FDR (False Discovery Rate) au niveau peptidique évalué à partir de recherches sur des séquences d'acides aminés inversées pour chaque protéine était inférieur à $0,8 \times 10^{-6}$ ont été conservées pour la suite de l'analyse. L'annotation fonctionnelle des protéines identifiées ainsi la prédiction de leur localisation subcellulaire ont été réalisées en suivant la même méthodologie que celle décrite dans Fabre *et al.* (2019)a. L'annotation « Gene Ontology » des protéines a été réalisée en suivant la même procédure que celle décrite dans Fabre *et al.* (2019)a. L'abondance des protéines a été déterminée à partir de la somme des abondances de chaque peptide assigné à une protéine donnée à l'aide du logiciel MassChroQ 2.2.17 (Valot *et al.*, 2011) par extraction des chromatogrammes ioniques comme décrit dans Bonhomme *et al* (2012). La normalisation des abondances protéiques a été effectuée en divisant les ratios par la valeur totale de l'abondance des peptides dans chaque cycle LC-MS/MS. Les analyses statistiques ultérieures ont été effectuées sur des données normalisées transformées log10.

b) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel de programmation R 3.4.4 (R Core Team, 2018). L'analyse des facteurs explicatifs des variations d'abondance des protéines de blé

a été réalisée, après vérification de l'absence de tout effet de bloc/répétition, à l'aide d'un test ANOVA (Analysis of variance) bidirectionnelle basé sur le modèle linéaire suivant :

$$Y_{ijkl} = \mu + C_{v_i} + T_j + (C_{v_i} \times T_j) + (C_{v_i} \times T_j \{S_{k_f}\}) + \varepsilon_{ijkl},$$

où Y_{ijkl} fait référence à l'abondance individuelle des protéines, μ est la moyenne de la variable considérée, C_{v_i} est l'effet imputable au fond génétique du cultivar de blé inoculé, T_j est l'effet imputable au facteur traitement, $C_{v_i} \times T_j$ est l'effet imputable à l'interaction des deux facteurs principaux et $C_{v_i} \times T_j \{S_{k_f}\}$ l'effet imputable à l'interaction des deux facteurs principaux en tenant compte de la souche fongique inoculée en tant que facteur emboîté dans le facteur principal traitement et ε_{ijkl} est la résiduelle.

Pour chaque protéine de blé, les p-values obtenues pour chaque effet ont été ajustées afin de contrôler le FDR (False discovery rate) en suivant la méthode décrite par Benjamini and Hochberg, (1995). Seules les protéines présentant un FDR <0.05 correspondant aux p-values <0.00026, <0.00045, <0.00002 et >0.000003 respectivement pour les effets C_{v_i} , T_j , $(C_{v_i} \times T_j)$ et $(C_{v_i} \times T_j \{S_{k_f}\})$ ont été conservées. Les protéines présentant un changement significatif d'abondance pour au moins un des facteurs testés ont été clusterisées en suivant la méthode décrite par Kumar et Futschik, (2007) après transformation Z-score des abondances protéiques (paramètres de fuzzification = 2).

Production scientifique

Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture :

- [1] **Fabre F**, Rocher F, Alouane T, Langin T, and Bonhomme L. (2020). Searching for FHB resistances in bread wheat: Susceptibility at the crossroad. *Front. Plant Sci.* 11, 731. doi.org/10.3389/fpls.2020.00731.
- [2] **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.
- [3] **Fabre F**, Vignassa M, Urbach S, Langin T, Bonhomme L. (2019) Time-resolved dissection of the molecular crosstalk driving *Fusarium* head blight in wheat provides new insights into host susceptibility determinism. *Plant Cell Environ*, 42: 2291– 2308. doi.org/10.1111/pce.13549
- [4] Eouzan I, Garnery L, Pinto M A, Delalande D, Neves C J, **Fabre F**, Lesobre J, Houte S, Estonba A, Montes I, Sime-Ngando T, Biron D G. (2019). Hygroregulation, a key ability for eusocial insects: Native Western European honeybees as a case study. *PloS one*, 14(2), e0200048. doi:10.1371/journal.pone.0200048
- [5] Alouane T, Rimbert H, **Fabre F**, Cambon F, Langin T, and Bonhomme L. (2018). Genome sequence of *Fusarium graminearum* strain MDC_Fg1, isolated from bread wheat grown in France. *Microbiol. Resour. Announc.* 7, e01260-18. doi:10.1128/MRA.01260-18.

Communications orales lors de congrès :

- [1] **Fabre F**, Vignassa M, Urbach S, Langin T, Bonhomme L. (2019) Déterminisme moléculaire de la sensibilité du blé à la fusariose de l'épi, comment les déterminants fongiques et les réponses de la plante établissent le devenir de la maladie. Congrès du Protéome Vert, (Paris, France), 3 – 4 Juin.
- [2] **Fabre F**, Vignassa M, Urbach S, Langin T, Bonhomme L. (2019) Déterminisme moléculaire de la sensibilité du blé à la fusariose : Comment les déterminants fongiques et les réponses de la plante établissent le devenir de la maladie ? 22^{ème} Journées de l'école Doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie & Environnement, (Clermont-Ferrand, France), 23 – 24 Mai.
- [3] **Fabre F**, Vignassa M, Urbach S, Langin T, Bonhomme L. (2018) Molecular determinism of wheat susceptibility to FHB: How proteome adjustments control the fate of infection? 11th Effectome meeting, (Lauret, France), 7 – 9 November.

- [4] **Fabre F**, Vignassa M, Rimbert H, Urbach S, Bormann J, Langin T, Bonhomme L. (2018) Molecular determinism of wheat susceptibility to FHB: How proteome adjustments control the fate of infection? 10th INRA SPE department meeting, (Nice, France), 27 – 29 June.
- [5] **Fabre F**, Vignassa M, Rimbert H, Bornaque D, Chebance C, Bormann J, Langin T, Bonhomme L. 2018. Comparative genomics of two *Fusarium graminearum* strains of contrasting aggressiveness in bread wheat. XIVe European Fusarium Seminar, (Tulln, Autriche), 8 – 11 April.
- [6] **Fabre F**, Vignassa M, Rimbert H, Urbach S, Bormann J, Langin T, Bonhomme L. (2017) Molecular determinism of *Fusarium* head blight susceptibility in bread wheat. 9th INRA SPE department meeting, (Montpellier, France), 16 – 18 June.
- [7] **Fabre F**, Vignassa M, Urbach S, Langin T, Bonhomme L. (2017) Déterminisme moléculaire de la sensibilité du blé à la fusariose de l'épi chez le blé tendre. Journées des doctorants Sciences de l'environnement AURA, (Clermont-Ferrand, France), 16 April.

Communications par affiche lors de congrès :

- [1] **Fabre F**, Vignassa M, Urbach S, Langin T, Bonhomme L. (2019). Dual dissection of the molecular dialogue driving the bread wheat – *Fusarium graminearum* interaction reveals the co-regulation of candidate susceptibility factors and fungal effectors. XVIIIth International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, (Glasgow, Scotland), 14 – 18 July.
- [2] **Fabre F**, Vignassa M, Urbach S, Langin T, Bonhomme L. (2018) Molecular determinism of wheat susceptibility to FHB: How proteome adjustments control the fate of infection? 11th Effectome meeting, (Lauret, France), 7 – 9 November.
- [3] Bonhomme L, **Fabre F**, Vignassa M, Langin T. (2018). Dual dissection of fungi effectors and plant susceptibility factors reveals new candidate genes involved in the wheat/*Fusarium graminearum* interaction. International Congress of Plant Pathology, (Boston United States of America), 29 July – 3 August.

Résumé

Les cultures de blé sont régulièrement exposées à une forte pression parasitaire exercée par un cortège complexe d'agents pathogènes capables d'attaquer les différentes parties de la plante. La fusariose de l'épi ou FHB (*Fusarium head blight*), principalement causée par le champignon ascomycète *Fusarium graminearum*, représente une préoccupation majeure, car cette maladie affecte non seulement le rendement et la qualité des grains, mais également leur état sanitaire via la production *in planta* de mycotoxines. A ce jour, les méthodes de lutte reposent sur l'utilisation combinée de pratiques culturales adaptées, de traitements fongicides et de cultivars génétiquement plus résistants. Toutefois, lors d'épisodes climatiques favorables et de fortes pressions parasitaires, ces méthodes s'avèrent incapables de contrôler efficacement le développement d'épidémies dommageables pour les cultures, la raison étant la faible efficacité de la grande majorité des sources de résistance présentes dans les variétés cultivées. Identifier des sources de résistance plus efficaces et surtout plus durables représente aujourd'hui un objectif majeur. Une des alternatives à la recherche de source de résistance classiques repose sur l'identification des facteurs clefs contrôlant la sensibilité de la plante à un agent pathogène, et leur utilisation pour générer des résistances considérées comme potentiellement plus durables. De façon à identifier des gènes de sensibilité du blé au champignon *F. graminearum*, agent principal de la fusariose de l'épi chez le blé tendre, nous avons mis en place, une stratégie exploratoire à large échelle tenant compte de la diversité, de la dynamique et des spécificités des événements moléculaires protéiques imputables aux deux protagonistes. Cette stratégie nous a donné accès pour la première fois aux ajustements simultanés des protéomes végétal et fongique au cours des étapes précoces de l'interaction, et plus spécifiquement lors de la transition 48 – 72 hpi. Ces résultats suggèrent que la stratégie fongique s'ajuste de manière dynamique au contexte du développement du grain. De plus, la surreprésentation de motifs d'adressage chloroplastique retrouvée au niveau des séquences protéiques des effecteurs fongiques, associée aux variations d'abondances des protéines du chloroplaste, suggèrent que cet organite pourrait être une des cibles principales des effecteurs fongiques et un élément clé du processus de manipulation parasitaire. Enfin, l'analyse fine du dialogue moléculaire contrôlant le développement de l'interaction entre différents cultivars de blé avec différentes souches fongiques a permis de mettre en évidence l'existence d'un core dual-protéome dont les seules variations quantitatives de ces composantes permettent d'expliquer les différents niveaux de sensibilité ou d'agressivité observés. Ce corpus de résultats permet de proposer la sensibilité comme étant issue de processus moléculaires communs entre différents fonds génétiques de blé et servira de base pour l'élaboration de nouvelles sources de résistance.

Mots clés : Sensibilité ; Dual-protéome ; Blé ; *Fusarium graminearum* ; Dialogue moléculaire