UNIVERSITE BLAISE PASCAL **ANNEE : 2015**
N°D.U. 2655

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N°d'ordre : 679

THESE

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Génétique et Physiologie Moléculaire
Soutenue le : 16 décembre 2015

CHETOUHI CHÉRIF

Bases moléculaires de la sensibilité du blé tendre (*Triticum aestivum*) à la fusariose de l'épi causée par le champignon *Fusarium graminearum*

Président :
Mr Christophe Tatout - Professeur Université Blaise Pascal

Membres :
Mr Marc-Henri - Lebrun Directeur de Recherche CNRS
Mr Ludovic Bonhomme - Maître de conférences Université Blaise Pascal
Mr Thierry Langin - Directeur de Recherche CNRS

Rapporteurs :
Mme Marie Dufresne - Maître de conférences Université d'Orsay
Mr Bruno Favery - Directeur de Recherche INRA

UMR 1095 INRA-UBP « Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales »
Equipe Maladies Des Céréales
5 chemin de Beaulieu – 63039 Clermont cedex 2

Résumé

La Fusariose de l'épi (FHB) est une maladie importante des céréales et en particulier du blé tendre. Elle est causée par deux genres fongiques, le genre *Fusarium* et le genre *Microdochium.* L'espèce *Fusarium graminearum* est l'agent principal de cette maladie. Elle affecte non seulement les rendements et la qualité des grains chez le blé, mais elle cause un sérieux problème sanitaire *via* la production des mycotoxines. L'établissement de cette maladie requiert l'expression de gènes végétaux (facteurs de sensibilité) qui restent encore méconnus. Afin d'étudier les événements moléculaires qui participent à la mise en place de cette maladie sur un grain de blé tendre en développement et sensible au FHB, une cinétique d'infection de cinq points correspondant aux principaux stades développementaux du grain a été réalisée. Ensuite, deux approches, la protéomique comparée et la transcriptomique comparée à l'aide de puces à ADN, ont été utilisées pour répondre à ces questions. L'analyse protéomique a permis d'identifier 73 protéines différentiellement régulées appartenant à 5 grands groupes fonctionnels alors que l'approche transcriptomique a mis en évidence 1309 gènes répartis dans 16 groupes fonctionnels différents. Ces deux approches ont montré que l'infection ne bloque pas le développement du grain, mais elle induit des changements importants dans le métabolisme primaire notamment sur la synthèse de l'amidon et des protéines de réserve. Elle a également montré que la réponse du grain au FHB est liée au stade développemental du grain. Cette étude apporte de nouveaux éléments nécessaires à la compréhension de la sensibilité du blé tendre à la Fusariose de l'épi. Cette sensibilité du grain de blé se caractérise principalement par l'induction des mécanismes de détoxification des mycotoxines, la mise en place des mécanismes du détournement du métabolisme carboné de l'hôte par l'agent pathogène et le contrôle de la mort cellulaire programmée des cellules végétales. Enfin, l'étude a permis d'établir une liste d'au moins 100 gènes candidats potentiellement impliqués dans la sensibilité du blé au FHB.

Mots-clés : *Fusarium graminearum*, blé, facteurs de sensibilité, protéomique, transcriptomique.

Abstract

Fusarium head blight (FHB) is an important disease of cereals, particularly of wheat. It is caused by two fungal genera, the genus *Fusarium* and genus *Microdochium*. The species *Fusarium graminearum* is the principal agent of this disease. This disease affects not only yield and grain quality in wheat, but it causes serious health problem through the production of mycotoxins. The establishment of this disease requires the expression of plant genes (susceptibility factors) that are still unknown. To study the molecular events involved in the development of this disease in the susceptible wheat grain during its development, time course infection of five points corresponding to the main developmental stages of grain was performed. Then two approaches, proteomics and transcriptomics using DNA microarrays were used to answer to this question. Proteomic analysis identified 73 differentially regulated proteins belonging to five major functional groups while the transcriptomics data revealed 1309 genes involved in 16 distinct functional groups. Both approaches have shown that infection does not interrupt grain development, but induces significant changes in primary metabolism, mainly on the synthesis of starch and storage proteins. It also showed a link between FHB response and the grain development. This study provides new evidence necessary to understand the susceptibility response of wheat to FHB. The wheat grain susceptibility is mainly characterized by the induction of detoxifying mechanisms of mycotoxins, the diversion of carbon metabolism of the host by the pathogen and control of Programmed Cell Death (PCD) of plant cells. Finally, the study allowed the establishment of a list of at least 100 candidate genes potentially involved in the wheat susceptibility to FHB.

Keywords: *Fusarium graminearum*, wheat, susceptibility factors, proteomic, transcriptomic.

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée dans l'équipe Maladies des Céréales (MDC) au sein de l'unité mixte de recherche INRA-UBP 1095 GDEC.

Je suis entièrement reconnaissant envers mon directeur de thèse Thierry Langin pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire, pour m'avoir encadré dans la réalisation de ce travail avec beaucoup d'attention, pour ses conseils et ses critiques constructives et pour le temps qu'il m'a consacré malgré ses nombreuses responsabilités et tâches administratives comme directeur d'unité.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à Ludovic Bonhomme qui a accepté de co-encadrer ce travail de thèse. Merci pour ton encadrement exceptionnel, aux discussions enrichissantes et aux conseils que tu m'as apportés tout au long de cette thèse.

Un grand merci à David Biron et à ses discussions enrichissantes et à sa relecture de mes papiers.

Je tiens à remercier le docteur Bruno Favery et le docteur Marie Dufresne pour avoir accepté d'être mes rapporteurs, ainsi que Chrisophe Tatout et Marc-Henri Lebrun pour avoir bien accepté juger mes travaux.

Je remercie chaleureusement Philippe Lecomte et Florence Cambon pour leur disponibilité, leur patience, leur aide et leurs discussions. Merci, vous avez été de très bons collègues de bureau et vous allez beaucoup me manquer.

Un grand merci à Olivier et à sa très bonne humeur, son oreille attentive et aux bons moments partagés ensemble en dehors de l'INRA.

Je remercie vivement Cyrille Saintenac pour ses conseils et ses discussions enrichissantes sur la génétique et la pathologie végétale.

Un immense merci à Pauline Lasserre-Zuber et à Cora Boedo pour votre aide et conseils.

Un grand merci à l'équipe DOPM qui va énormément me manquer. Merci à Denis, Frédéric, Pierre, Sylvie et Magali.

Les résultats présentés dans ce manuscrit de thèse sont le fruit de nombreuses collaborations. Je remercie Gérard Branlard, Marielle Merlino, Emmanuelle Bancel et Isabelle Nadeau de l'équipe BIG, Jean Pierre Renou et Sandra Pelletier de IRHS d'Anger.

Un grand merci aux stagiaires de l'équipe MDC et aux bons moments passés avec vous, merci à un ami, Kévin Fontaine et aux bons moments passés ensemble, merci à Diane, Christelle, Gaspard, Rachelle et Juliana.

Je remercie chaleureusement l'ensemble du personnel de l'unité GDEC, de leur gentillesse et de leur disponibilité en particulier Karine, Patricia et Valérie.

Je tiens à témoigner ma profonde gratitude à ma famille pour m'avoir toujours aidé et soutenu. Merci à mes parents et à mon unique sœur de m'avoir toujours accompagné dans mes projets et supporter mes mauvaises humeurs durant ces quatre années de thèse, merci à ma deuxième maman « Tata Fatiha » et à mes oncles Yazid, Malik, Kamal et à mes trois adorables cousins, Lynda, Rosa et Younes des moments inoubliables partagés avec vous à Paris.

Un grand merci enfin à toutes les personnes qui m'ont soutenu au cours de la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

°Cd: degrees Celsius day
A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*
ADH: Alcool déshydrogénase 1
15-ADON : 15-acétyl-déoxynivalénol
3-ADON : 3-acétyl-déoxynivalénol
AGPB: Association Générale des producteurs de blé et autres céréales
AHA1: Protéine plasmqiue
Avr: Avirulence
BEA: beauvericine
Bgh: *Blumeria graminis* f.so.*horde*i
CEBiP: Chitin oligosaccharide Elicitor-Binding Protein
CERK1: Receptor-like kinase
Cf-2, Cf-4, Cf-4E, Cf-9 : Gènes de résistance
CIMMYT: Intenational Maize and Wheat Improvment Center
CS: Chinese spring
CYP: Cytochrome P450 mono-oxygenases
DON: Déoxynivalénol
Dpi: days post inoculation
ENN: enniantine
ETI: Effector Triggered Immunity
ETS: Effector triggered susceptibility
FAO: Food and agriculture organization
Fg: *Fusarium graminearum*
FHB: Fusarium Head Blight
Fhb1, Fhb2, Fhb4, Fhb5: QTLs de résistance au FHB
FUM: Fumonisines
GFP: Green Fluorescent Protein
GST: Glutathione-S- transferase
GTPase: Guanosine triphosphate hudrolase
H_2O_2: Hydrogen peroxide
HDA 19: Histone déacétylase 19
HR: Hypersensibility Reaction
Hv: Hordeum vulgare
INF1: Protéine Interféron 1
Kip 4: Inhibiteur du cycle cellulaire
MAP kinases: Mitogen-activated protein Kinases
Mlo: Mildew resistance locus O
MON: moniliformine
MPK3: Mitogen-activated protein Kinase 3
MPK6: Mitogen-activated protein Kinase 6
MTF: MADS-domaine transcription Factor
MTP : Modifications post-traductionnelles
MYB3R4: Facteur de transcription type myb
NIV: Nivalénol
Os*: Oryza sativa*
P. syringae*: Pseudomonas syringae*
P. infestans*: Phtoptora infestance*

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCD: Programmed Cell Death
PRP: PAMP recognition receptors
PTI: PAMP-triggered immunity
QTL: Quantitatif Trait Loci
RAC: Rho family of GTPases
RAD23: RAYONNEMENT SENSITIVE23
R-genes: Resistant gene
RNAi: RNA interference
ROP: Rho-like GTPases of plant
SAP54: Effecteur de Phytophthora
SEPALLATA3: régulateurs
S-genes: Susceptible gene
STB: Septoria tritici
SWEET:Transporteur de sucres
Ta: Triticum aestivum
TAL: Transcription activateur
TCT: Trichothécènes
TCT A: Trichothécènes de type A
TCT B: Trichothécènes de type B
Tri: Trichodiène synthase
UGT: UDP-glycosyltransferases
Vv:Vitis vinifera
V*v*HT: Transporteur des sucres (orthologue des SWEET)
Wrky38/68 : Facteurs de transcription
ZEA: Zéaralénone

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes structures d'infection chez les champignons et les Oomycètes.

Figure 2 : Modèle en zigzag illustrant l'évolution du dialogue moléculaire entre une plante et un agent pathogène.

Figure 3 : Etapes clefs d'un cycle infectieux d'un agent pathogène chez une plante hôte sensible.

Figure 4: Les principaux facteurs (gènes) de sensibilité identifiés dans la littérature, classés selon leur rôle et stade d'intervention au cours du processus infectieux.

Figure 5: Classification fonctionnelle des principaux gènes de sensibilité identifiés dans la littérature.

Figure 6 : Histoire évolutive du blé.

Figure 7: Anatomie d'un épillet d'un épi de blé.

Figure 8: schéma illustrant les différentes étapes du développement du blé.

Figure 9 : Les différentes parties constituant un grain de blé mature

Figure 10 : Principales maladies du blé tendre.

Figure 11: *F. graminearum* est capable d'attaquer le blé à tous les stades de développement, de la semence à l'épi.

Figure 12 : Principaux symptômes de fusariose de l'épi sur épi .

Figure 13: Dynamique des espèces de *Fusarium* entre 1997 et 2013 aux champs en France.

Figure 14: Cycle de vie de *Fusarium graminearum* sur blé tendre.

Figure 15: Principales étapes de la biosynthèse des DON chez le champignon *Fusarium graminearum.*

Figure 16: Modèle hypothétique du rôle des DON dans l'induction de la mort cellulaire programmée (PCD) et dans la transition de la phase biotrophe vers la phase nécrotrophe.

Figure 17: Modèle hypothétique de l'interaction des DON avec le métabolisme primaire de l'hôte et du *Fusarium graminearum*.

Figure 18: Schéma illustrant le parcours du champignon *Fg* sur un épi de blé tendre.

Figure 19: Expression tissu-spécifique d'une partie du génome de blé tendre en réponse au FHB.

Figure 20: Carte QTL avec les régions génomiques associées de la résistance à la fusariose dans les populations européennes de blé d'hiver.

Figure 21: Schéma illustrant les différentes étapes de protéomiques pour une étude *in vitro* et *in planta* de l'interaction *Fusarium*/plante.

Liste des tableaux

Tableau 1. Aperçu des principaux effecteurs de champignons nécrotrophes décrits dans la littérature et de leurs cibles.

Tableau 2. Les principaux facteurs (gènes) de sensibilité identifiés dans la littérature et classés selon leur fonction

Tableau 3. La production mondiale de blé en tonnes/an et les rendements par hectare de surface

Tableau 4. Estimation des pertes de rendement en blé (q/ha) causées par les maladies d'origine fongique dans différents pays Européens (Eurowheat).

Tableau 5. Fréquence et nuisibilité des maladies des blés en France.

Tableau 6. Les principales mycotoxines produites par les différentes espèces du genre *Fusarium*

Tableau 7. Etudes protéomiques portant sur l'interaction *F. graminearum* avec le blé et l'orge.

SOMMAIRE

SOMMAIRE **10**
Introduction **13**
I-Les interactions entre les plantes et leur environnement biotique **14**
1-1-Le dialogue moléculaire entre une plante hôte et un agent symbiotique-pathogène. 15
1-2- La sensibilité des plantes aux agents pathogènes 17
1-2-1- Effecteurs 18
1-2-2- Facteurs de sensibilité 20
II- Le blé **24**
2-1- Intérêt socio-économique du blé 24
2-2- Description du blé 25
2-2-1- Caractéristiques génétiques 25
2-2-2- Caractéristiques botaniques 25
2-2-3- Caractéristiques culturales et développementales 26
2-3- Structure du grain de blé 26
2-3-1- Croissance et développement du grain 26
2-3-2- Remplissage du grain 27
2-3-3- Déshydratation et maturation du grain 27
2-4- Les principales maladies du blé tendre 27
III-La Fusariose de l'épi (FHB) **28**
3-1-Définition et agent causal 28
3-2- Cycle biologique de la maladie 30
3-3-Conditions favorisant le développement du FHB 30
3-3-1- Les facteurs climatiques 30
3-3-2- Les facteurs culturaux 31
3-3-3- Les facteurs physiologiques et phénologiques 31
3-4- *Fusarium graminearum* & mycotoxines 31
3-4-1- Généralités 31
3-4-2- Rôle des mycotoxines 32
3-4-3- Mécanismes de détoxication des mycotoxines 33
3-5- Développement de la maladie sur un épi de blé 33
3-6-Méthodes de lutte contre le FHB 35
3-7-Lutte génétique 35
IV- Problématique et objectifs de la thèse **36**

CHAPITRE I : Etat de l'art sur les approches protéomiques et les interactions hôte-agent pathogène ……..**39**

CHAPITRE II : Analyse comparée du protéome du grain de blé tendre à différents stades de développement, infecté ou non par une souche mycotoxinogène de *Fusarium graminearum* **53**

1- Etat de l'art **54**

2- Stratégie **54**

2-1- Cinétique d'infection 54

2-2- Approche protéomique 55

3- Principaux résultats et conclusions **55**

CHAPITRE III : Analyse de la dynamique du transcriptome du grain de blé en développement infecté par le FHB **70**

1-La puce Nimbelgen spécifique blé tendre **71**

2-Principaux résultats et conclusions **72**

Discussion et Perspectives de la thèse **95**

1- Discussion **96**

1-1- Signalisation cellulaire 97

1-2- Régulation hormonale 98

1-3- Facteurs de transcription 99

1-4- Mécanismes impliqués dans la détoxification des DON 100

1-5-Rôle de la mort cellulaire programmée (PCD) dans l'interaction entre le blé tendre et *Fg* 102

1-6-Impact du développement de l'infection sur le métabolisme primaire de la plante hôte 103

2- PERSPECTIVES **108**

2-1- Quels gènes candidats pour une validation fonctionnelle ? 109

Liste des références bibliographiques **113**

Annexes ……137

Introduction

I- Les interactions entre les plantes et leur environnement biotique

Dans leur environnement naturel, les plantes sont capables d'établir des interactions plus ou moins étroites avec un cortège complexe et diversifié d'organismes eucaryotes ou procaryotes. Suivant les modalités et le devenir de ces interactions, celles-ci peuvent être regroupées en 3 classes principales : **mutualistes, symbiotiques ou parasitaires**.

a- Mutualisme :

Le mutualisme est une **association facultative** où les deux partenaires peuvent tout à fait vivre l'un sans l'autre. Les mycorhizes sont le résultat de l'association mutualiste entre des champignons et les racines des plantes. Dans cette association, les hyphes d'un champignon colonisent les racines d'une plante et l'aident à obtenir des sels minéraux présents dans le sol. En retour, le champignon bénéficie de la photosynthèse de la plante sous forme de matière organique riche en énergie (glycogène et du triacylglycérol) essentielle à sa survie (Parniske, 2008)

b- Symbiose :

La symbiose est une **association obligatoire** entre deux partenaires, car hôte et symbiote s'échangent des molécules indispensables à leur survie. L'hôte ne peut pas utiliser une ressource présente dans son biotope, tandis que le symbiote est capable d'utiliser cette même ressource et de la transformer en substance assimilable par l'hôte. Les lichens sont des organismes formés à partir d'une association symbiotique entre une algue unicellulaire et un champignon. Dans cette interaction, l'algue puise l'eau et les sels minéraux à partir du champignon de façon à assurer sa survie, et en parallèle, elle assure l'approvisionnement en glucose, produit par photosynthèse, nécessaire au développement du champignon (Selosse MA, 2000).

c- Parasitisme :

Dans une interaction parasitaire, l'un des partenaires de l'interaction symbiote porte atteinte et vit aux dépens d'un autre organisme. Les micro-organismes parasites de plantes peuvent être des virus, des bactéries, des champignons, des oomycètes ou encore des nématodes. La compréhension de la réponse de la plante vis-à-vis de ces agents pathogènes nécessite de s'arrêter sur la nature de l'interaction entre les micro-organismes phytopathogènes et la plante hôte. Il existe différents modes d'interaction entre une plante et un agent pathogène : le cycle infectieux peut être de nature biotrophe (les parasites ne sont capables de se développer que dans des tissus végétaux vivants), nécrotrophe (les parasites se développent sur des tissus

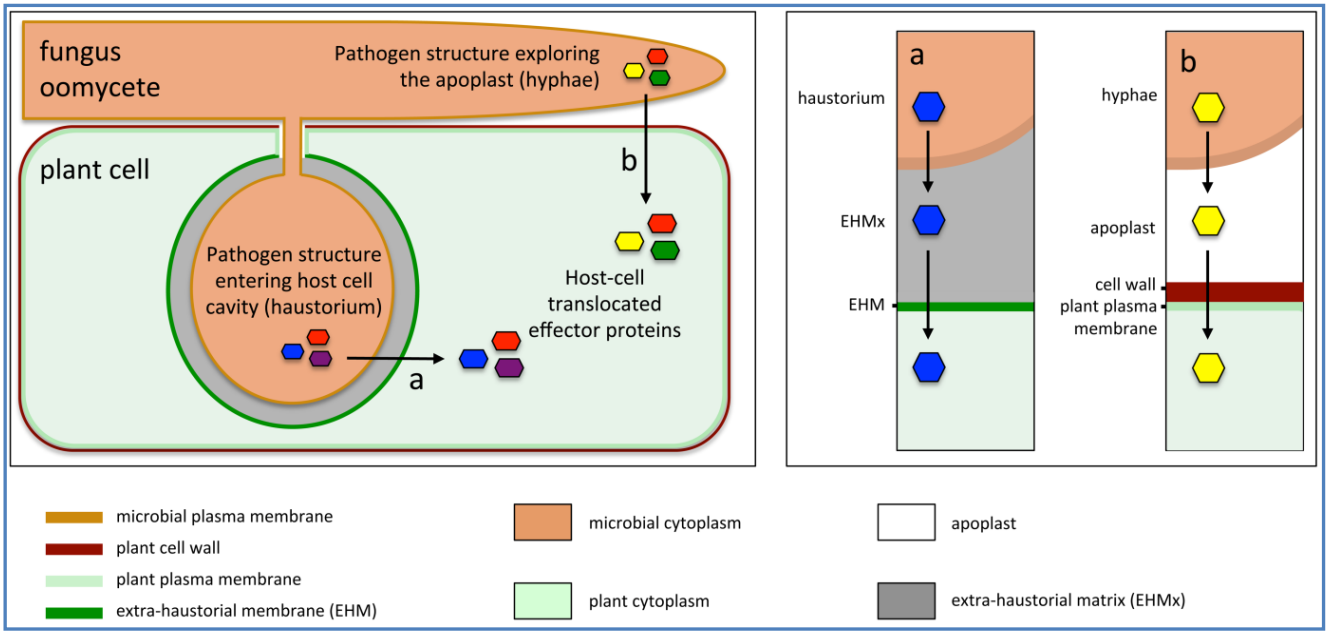

Figure 1 : Les différentes structures d'infection chez les champignons et les Oomycètes. Le schéma de gauche représente les différentes structures d'infection chez les champignons et les Oomycètes tels que des hyphes extracellulaires, ainsi que des hyphes invasives avec des invaginations dans la membrane plasmique. Haustoria (a) et les hyphes (b) sécrétant des molécules effectrices qui sont transportées dans le cytoplasme de la cellule hôte par des mécanismes qui restent encore inconnus. Le schéma de droite représente des molécules effectrices sécrétées par les haustoria (a) et les hyphes (b) et traversant les différentes interfaces biologiques (matrice extra-haustoriale/membrane extra-haustoriale) pour les molécules sécrétées par les haustoria et (l'apoplaste/paroi cellulaire végétale / membrane plasmique de la cellule végétale) pour les molécules sécrétées à partir des hyphes (d'après Petre and Kamoun, 2014).

morts) ou hémibiotrophe (parasites ayant une première phase biotrophe, suivie plus ou moins rapidement d'une phase nécroptophe). Ces processus infectieux peuvent être associés à la mise en place de structures d'infection spécialisées, comme par exemple, les appressoria, structures plus ou moins élaborées permettant à l'agent pathogène de fracturer les premières barrières physiques que constituent les cuticules et les parois protégeant les cellules végétales, les vésicules d'infection ou les haustoria, créant des invaginations au sein de la membrane plasmique de l'hôte, les hyphes invasives, qui explorent l'espace extracellulaire (apoplasme), et assurent la colonisation des tissus végétaux en cours d'infection (Petre and Kamoun, 2014) (**Figure 1**).

1-1- Le dialogue moléculaire entre une plante hôte et un agent symbiotique ou pathogène

Les interactions entre une plante et les micro-organismes pathogènes ou symbiotiques sont contrôlées par l'émission et la perception par les deux partenaires de signaux plus ou moins spécifiques, mettant en jeu des programmes génétiques complexes conduisant à la mise en place de structures et de réponses appropriées. De la capacité de chacun des partenaires à percevoir précocement ces différents signaux, et suite à cette perception, à enclencher un ou des programmes génétiques spécifiques, mécanismes de défense dans un cas, processus infectieux dans l'autre, dépend le devenir de l'interaction (**dialogue moléculaire)**. Les premières phases de cet échange de signaux, dont l'issue va conditionner le devenir de l'interaction, est, dans tous les cas, extrêmement précoce.

Dans le cas des interactions symbiotiques, et en particulier, lors de l'interaction symbiotique entre les plantes de la famille des légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote du genre *Rhizobium,* la formation sur les racines de la plante hôte de nodules fixateurs d'azote résulte d'un échange complexe de signaux entre les cellules des tissus racinaires et les bactéries. Cela commence par un rejet de substances dont certaines appartiennent au groupe des flavonoïdes tels que les flavones, isoflavones, flavonone (Räsänen and Lindström, 2003) qui ont des effets attracteurs sur certains microorganismes du sol. Une fois ce signal perçu par le rhizobium, ce dernier induit la synthèse des facteurs Nod par les bactéries (Oldroyd et al., 2001). Les facteurs Nod sont des lipochito-oligosaccharides (LCO). Leur synthèse implique des enzymes des gènes communs, puis modifiés par les enzymes des gènes spécifiques, qui introduisent des fonctions ou des molécules sur le squelette oligosaccharidique. Ces facteurs Nod vont ensuite cibler le programme organogénétique de la plante pour déclencher un programme de nodulation (Patriarca et al., 2004). La mycorhize est le résultat d'une association symbiotique entre des champignons de l'ordre des Glomales et les racines de plantes. Cette association fait également

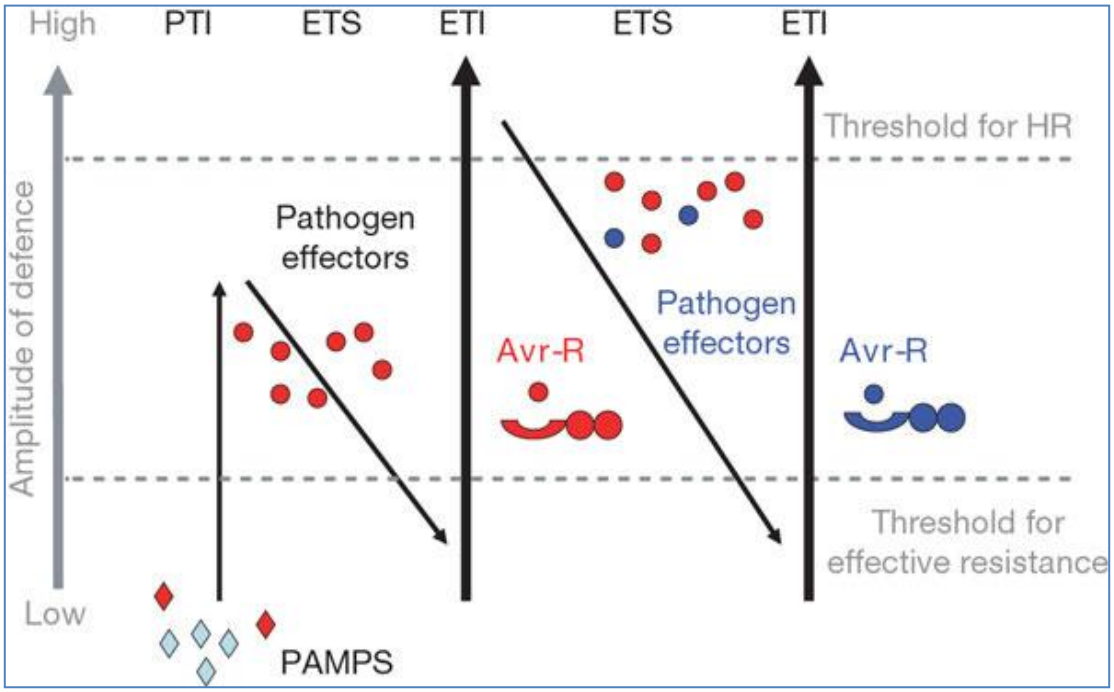

Figure 2 : Modèle en zigzag illustrant l'évolution du dialogue moléculaire entre une plante et un agent pathogène. Ce schéma montre que l'amplitude de la résistance ou de la sensibilité à une maladie chez les plantes est proportionnelle aux amplitudes de la PTI, d'ETS et de l'ETI. Dans la Phase 1, les plantes détectent les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) ou MAMPS (Microbial-Associated Molecular Pattern) (losanges rouges) via PRR (Pattern Recognition Receptors) pour déclencher la PAMP-Triggered Immunity (PTI), il y a un niveau de résistance basal. Dans la Phase 2, les agents pathogènes victorieux produisent des molécules dites effecteurs qui interfèrent négativement avec la PTI pour la supprimer et entraîner l'ETS, il y a un développement de la maladie. Dans la Phase 3, un effecteur (ronds rouges) est reconnu par une protéine de résistance de type NB-LRR et induit l'ETI, une version de la PTI amplifiée qui passe souvent un certain seuil peut induire la HR. La résistance est spécifique. Dans la Phase 4, les agents pathogènes qui ont perdu ou modifié l'effecteur rouge peuvent gagner de nouveaux effecteurs par des flux horizontaux de gènes (ronds bleus), ceux-ci peuvent à leur tour contribuer à la suppression de l'ETI et induire le retour à un état sensible (ETS). Dans la Phase 5, la sélection favorise l'apparition de nouvelles protéines de résistance (nouveaux allèles NB-LRR) qui peuvent reconnaître un des effecteurs nouvellement acquis, induisant de nouveau une ETI (d'après Jones and Dangl, 2006).

intervenir un dialogue moléculaire entre les deux partenaires. Par analogie avec les facteurs Nod, les facteurs Myc, synthétisés par des champignons du sol jouent un rôle de signaux symbiotiques qui permettent une stimulation de la formation des mycorhizes. Ces facteurs Myc sont des lipochito-oligosaccharides (LCO) appartenant à la même famille chimique que les signaux symbiotiques Nod (Maillet et al., 2011).

Dans le cas d'une **interaction pathogène**, les deux partenaires vont établir très tôt un échange de signaux dont l'issue va conditionner le devenir de l'interaction pathogène, **résistance de la plant**e si celle-ci a réussi à mettre en place un mécanisme efficace de défense, **sensibilité** si l'agent pathogène a eu la possibilité de développer son **processus infectieux**. Bien que dans leur milieu naturel, les plantes soient constamment exposées à des micro-organismes pathogènes, le développement d'épidémies reste une situation exceptionnelle. En effet, le développement de l'infection dépend de nombreux facteurs, dont l'efficacité des mécanismes de défense de la plante, l'agressivité de l'agent pathogène, les conditions environnementales. Les mécanismes de défense sont généralement classés en deux classes. Ils peuvent être passifs tels que les différentes barrières physiques naturelles (cuticule, cire, cutine, stomates, paroi pecto-cellulosique) qui empêchent la pénétration de l'agent pathogène ou des barrières chimiques (composés antimicrobiens) assurant une protection efficace de la plante ou actifs qui sont induits lors d'un phénomène d'infection ou de blessures. Cependant, certains micro-organismes parviennent à mettre en place des stratégies qui leur permettent de franchir ces barrières, de les contourner et de coloniser la plante hôte via la production et l'action des toxines, d'enzymes, de cutinases, de cellulases et des pectine-methyl estérases. L'évolution de ces stratégies infectieuses a été marquée par un passage progressif d'agents pathogènes facultatifs qui peuvent attaquer une large gamme d'hôtes à des agents pathogènes obligatoires nécessitant une relation étroite avec leurs hôtes. Toutes ces stratégies se retrouvent chez les agents phytopathogènes (bactéries, champignons, virus). Les moins évoluées d'entre elles, impliquent des mécanismes de reconnaissance non-spécifiques entre la plante hôte et son agent pathogène comme la PTI (PAMP-triggered immunity) déclenchée par la reconnaissance des PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) par les PRP (PAMP recognition receptors). Cette immunité est l'une des stratégies développées par la plante pour bloquer la colonisation par l'agent pathogène (Chisholm et al., 2006) **(Figure 2)**. Chez les champignons, les PAMP sont le plus souvent représentées par la chitine, un constituant majeur de la paroi fongique. Deux récepteurs qui reconnaissent cette molécule ont été identifiés chez le riz et *Arabidopsis thaliana* (CERK1, CEBiP). Plusieurs études ont montré que certaines molécules sécrétées par

Tableau 1. Aperçu des principaux effecteurs de champignons nécrotrophes décrits dans la littérature et de leurs cibles végétales. Ce tableau résume les différents effecteurs de champignons nécrotrophes identifiés et décrits dans la littérature, leur nature biochimique, leur cible végétale et l'article de référence (d'après Vleeshouwers and Oliver, 2014).

Agent pathogène (Plante)	Effecteur	Structure de l'effecteur	Gène de résistance	Cible	Référence
Cochliobolus hetetrostrophus	T-toxin	Polyketide	*?*	T-Urf13	(Wolpert et al., 2002)
C. carbonum	Tox1	NRPS	*Hm-1*	Histones	(Walton, 2006)
C. vicroriae	Victorin	NRPS	*Vb/Lov1*	Glycine decarboxylase	(Navarre and Wolpert, 1995 ; Wolpert et al., 2002)
Alternaria alternata (Tomato)	AL	Aminopentol ester	*?*	Asc	(Wolpert et al., 2002)
Alternaria alternata (Apple)	AM	Aminopentol ester	*?*	Asc	(Saito et al., 2001)
Alternaria alternata (Japanese pear)	AK	Aminopentol ester	*?*	Asc	(Tanaka and Tsuge, 2000)
Rhynchosporium secalis	NIP1	Protein	*Rrs1*	PM ATPase	(Schürch et al., 2004)
Parastagonospora nodorum	ToxA	Protein	*Tsn1*	ToxABP	(McDonald et al., 2013)
Pyrenophora tritici-repentis	ToxA	Protein	*Tsn1*	ToxABP	(Oliver, 2012)
Pyrenophora tritici-repentis	ToxB	Protein	*TSC2*	ToxABP	(Ciuffetti et al., 2010)
Parastagonospora nodorum	Tox3	Protein	*Snn3*	?	(Liu et al., 2009)
Parastagonospora nodorum	Tox1	Protein	*Snn1*	?	(Liu et al., 2012)
Botrytis cinerea	NEP1-like	Protein	*?*	?	(Staats et al., 2007)

les agents pathogènes (effecteurs ou facteurs Avr) sont capables de réprimer la PTI, ce qui permet à l'agent pathogène de s'installer et de se développer dans les tissus de l'hôte et donc d'entraîner le développement des symptômes de la maladie ou l'ETS (Effector Triggrered Susceptibility). Les stratégies les plus évoluées impliquent des mécanismes de reconnaissance spécifiques et sophistiqués entre la plante et l'agent pathogène. Parmi ces systèmes de reconnaissance, le plus connu et le plus étudié est la réaction dite gène pour gène. En effet, au cours de leur processus infectieux, les agents pathogènes expriment un gène dit d'avirulence, le produit de ce gène est reconnu par la plante via le produit du gène de résistance *R*. Cette reconnaissance conduit à l'apparition des nécroses des tissus végétaux autour du point d'entrée d'un pathogène ce qui empêche le développement de l'agent pathogène (Flor, 1971). Les premiers gènes *Avr* ont été identifiés chez les bactéries (Staskawicz et al., 1984) et le premier gène *Avr* fongique a été cloné en 1991 (van Kan et al., 1991). Au cours de la coévolution des plantes et de leurs agents pathogènes, les plantes ont développé une batterie de mécanismes de défense pour contre-attaquer les différentes stratégies développées par les agents pathogènes. En outre, au cours de l'évolution, les plantes ont su développer d'autres moyens pour faire échouer les stratégies des agents pathogènes. Parmi elles, l'ETI (Effector Triggered Immunity) qui entraîne une réaction de défense rapide de la plante en incluant la réponse hypersensible ou HR (Mur et al., 2008), dont la composante principale est un processus de mort cellulaire génétiquement programmée affectant les cellules localisées au point d'infection. Les stratégies infectieuses développées par les différents agents pathogènes et les réponses de l'hôte afin de les contrecarrer sont en perpétuelle course évolutive, leur coévolution a permis aux agents pathogènes de créer des mutations dans les effecteurs existants ou de développer de nouveaux effecteurs qui permettent de contourner l'ETI, induisant le développement chez la plante de nouveaux facteurs de résistance, et ainsi de suite (**Figure 2**) (Jones and Dangl, 2006).

1-2- La sensibilité des plantes aux agents pathogènes

La sensibilité d'une espèce végétale à un agent pathogène est définie comme l'incapacité de cette espèce à restreindre la croissance et le développement d'un micro-organisme pathogène ou d'un ravageur donné, ce qui conduit à l'établissement d'une interaction compatible entre cette espèce végétale et cet agent pathogène. Il est maintenant admis que la sensibilité de la plante, et donc le développement des symptômes de la maladie causée par l'agent pathogène, résulte principalement d'un processus actif dont la composante principale est un processus de **manipulation parasitaire,** dont l'objectif est de créer dans les tissus végétaux en cours d'infection, un environnement plus favorable au développement de l'agent pathogène :

Tableau 2: Les principaux facteurs (gènes) de sensibilité identifiés dans la littérature et classés selon leur fonction. Ce tableau décrit les différents gènes de sensibilité identifiés dans la littérature avec le produit du gène, la plante chez laquelle a été identifié, maladie induite par sa présence et enfin les différents phénotypes associés à sa mutation.

Gène de sensibilité	Le produit du gène	La plante hôte	La maladie	Autres phénotypes de la plante (Effet pléitropique de la mutation du gène)
Structure de la cuticule et de la paroi				
RAT1/ AGP17	Arabinogalactan protein (cell surface)	Arabidopsis	Crown Gall disease	none reported
RAT4/ CSLA9	Mannan synthase / cellulose synthase-like	Arabidopsis	Crown Gall disease	fewer lateral roots
IRG1/ PALM1	Transcription facor (Zn-finger) controlling wax biosynthesis	Medigaco	Leaf rust, Anthracnose	modest alteration of leaf morphology
RAM2/ GPA7	Glycerol-3-phosphate acyl transferase, cutin biosynthesis	Medicago	Bud/fruit rot	impaired interaction/penetration of (beneficial) arbuscular mycorrhizal fungi.
Dynamique membranaire et établissement des haustoria				
AtMLO7 (NTA)	Membrane anchored protein	Arabidopsis	Powdery mildew	impaired pollen tube reception
HvMLO	Membrane anchored protein	Barley	Powdery mildew	Genotype-dependent lesions and early senescence. Increased susceptibility to necrotrophs (*Bipolaris/ Cochliobolus* and *Magnaporthe),* can be minimized with SAR induction or by stacking with *emr1.* Reduced colonization beneficial mycorrhiza.
PpMLO1	Membrane anchored protein	Strawberry (using peach RNAi construct)	Powdery mildew	none reported
PsMLO1 (*er1*)	Membrane anchored protein	Pea	Powdery mildew	none reported (no effect on mycorrhizae)
TaMLO	Membrane anchored protein	Wheat	Powdery mildew	none reported
CaMLO2	Membrane anchored protein	Pepper	Powdery mildew, Bacterial leaf spot	Reduced tolerance to drought stress
AtMLO2=P MR2(/MLO 6/12)	Membrane anchored protein	Arabidopsis	Powdery mildew	early senescence
HvLFGa (1 of 5 genes)	Transmembrane protein, Lifeguard- / BAX inhibitor- like protein	Barley	Powdery mildew	none reported
AtLFG1/2 (2 of 5 genes)	Transmembrane protein, Lifeguard- / BAX inhibitor- like protein	Arabidopsis	Powdery mildew	none reported for individual mutants, unknown for higher order mutants
BI-1	Transmembrane protein, Bax inhibitor-1	Barley	Powdery mildew	none reported
AtAGD5	ARF-GAP (ADP-ribosylation factor - GTPase activating factor)	Arabidopsis	Downy mildew	increased sensitivity to non-adapted PM (*Erysiphe pisi*), [no effect adapted PM (*G.orontii*)]
HvRAC1	ROP (Rho-like GTPase)	Barley	Powdery mildew	none reported (potential role in epidermal cell and root hair development, sensitivity to rice Blast pathogen and dehydration (based on OX data).
HvRAC3	ROP (Rho-like GTPase)	Barley	Powdery mildew	none reported (potential role in epidermal cell and root hair development, sensitivity to rice Blast pathogen and dehydration (based on OX data).
HvRACB	ROP (Rho-like GTPase)	Barley	Powdery mildew	none reported (potential role in epidermal cell and root hair development, sensitivity to rice Blast pathogen and dehydration (based on OX data).
OsRAC4	ROP (Rho-like GTPase)	Rice	Rice Blast fungus	none reported
OsRAC5	ROP (Rho-like GTPase)	Rice	Rice Blast fungus	none reported
OsRACB	ROP (Rho-like GTPase)	Rice	Rice Blast fungus	none reported (potential role in osmotic stress, based on OX; less sensitive)

contourner les mécanismes de défense de l'hôte, acquérir les éléments nutritifs, assurer sa multiplication et sa dissémination (Poulin, 2011). La notion de manipulation parasitaire est apparue pour la première fois dans les années 1950, puis a été rediscutée à partir des années 1970, et progressivement étendue à toutes les principales classes d'agents pathogènes : virus, bactéries, oomycètes, champignons (Lefèvre et al., 2009). Cette manipulation parasitaire repose sur la modification ou la suppression de fonctions et processus cellulaires plus ou moins importants (mécanismes de défense, métabolisme primaire, développement, cycle cellulaire, ...). Cette manipulation parasitaire va mettre en jeu deux types d'acteurs : les **effecteurs**, qui composent l'arsenal plus ou moins complexe utilisé par l'agent pathogène pour manipuler son hôte, et les **facteurs ou gènes de sensibilité**, cibles végétales de ces effecteurs.

Ces dix dernières années, le développement des outils d'analyse massive des génomes et de leur expression, et de validation fonctionnelle a conduit à l'identification et à la caractérisation de nombreux gènes de sensibilité et d'effecteurs.

1-2-1- Effecteurs

Un effecteur est une molécule, le plus souvent de petite taille, secrétée par l'agent pathogène au cours des étapes précoces de l'infection, dont le rôle est de participer à la création d'un contexte cellulaire et physiologique plus favorable au développement de l'infection et la colonisation de la plante l'hôte. Le mécanisme général est l'interaction de cet effecteur avec une cible végétale, conduisant à la modification ou à la suppression de l'activité normale de cette cible (Vleeshouwers and Oliver, 2014). Les effecteurs ont été d'abord identifiés et étudiés chez les bactéries pathogènes des plantes (Gopalan et al., 1996). Au cours de cette dernière décennie, plusieurs effecteurs d'oomycètes et de champignons filamenteux opérant à l'intérieur de la cellule hôte au niveau du cytoplasme ont été identifiés (Dong et al., 2011 ; Djamei et al., 2011 ; Park et al., 2012), ces molécules effectrices peuvent cibler différents compartiments cellulaires (Bozkurt et al., 2011 ; Win et al., 2012). Une grande majorité de ces effecteurs ont une localisation, soit nucléaire (Caillaud et al., 2012), soit cytoplasmique, comme les effecteurs TAL des bactéries pathogènes du genre *Xanthomonas* et SAP11 des phytoplasmes, soit mitochondriale ou chloroplastique à l'instar de l'effecteur HopG1 de *Pseudomonas syringae*, Au sein d'un même organite ciblé, une même famille d'effecteurs peut induire des phénotypes différents. Ainsi, l'effecteur HopI1 induit une réduction de la respiration et une augmentation du niveau des espèces réactives d'oxygène (Block et al., 2010), alors que l'effecteur HopG1 perturbe la structure des thylakoïdes (Jelenska et al., 2007). De plus, ces effecteurs peuvent induire diverses modifications biochimiques (phosphorylation des protéines, acétylation des

Stomates et portes d'entrées				
LecRK-V.5	L-type Lectin Receptor Kinase	Arabidopsis	Bacterial speck	none reported
AHA1/2	Plasma membrane ATPase	Arabidopsis	Bacterial speck	none reported for single mutants, but double mutants are likely lethal.
RIN4	NOI domain protein	Arabidopsis	Bacterial speck	lethal if R-genes RPM1 and RPS2 are present (guarding RIN4)
Suppression de la PTI				
bHLH25/27	transcription factor	Arabidopsis	Cyst nematode	no clear effects, probably slightly fewer lateral roots
CESA4/7	Cellulose synthase	Arabidopsis	Bacterial wilt, fruit/root rot, Grey mold/rot, Powdery mildew	none reported
CESA8	Cellulose synthase	Arabidopsis	Bacterial wilt, fruit/root rot, Grey mold/rot, Powdery mildew	increased ABA, enhanced drought tolerance
EDR1	MAPKKK	Arabidopsis	Powdery mildew, Anthracnose, Dark leaf spot	early senescence old leaves, increased sensitivity to necrotroph *(Alternaria)* and non-adapted hemibiotroph *(Colletotrichum gloeosporioides)*, increased sensitivity to drought, increased Eth response
OsMAPK5	MAP kinase	Rice	Blight/Rot, Blast fungus	increased sensitivity to abiotic stress (cold, salt, drought)
PTP1	Protein Tyrosine phosphatase	Arabidopsis	Bacterial speck	none reported
AtWRKY8	Transcription factor WRKY	Arabidopsis	Bacterial speck	increased sensitivity to Viral infection, salt stress, and Botrytis, and Salt
OsWRKY4 5-1	Transcription factor WRKY	Rice (cv. Japonica)	Rice Blast	increased sensitivity to rice blast (M. oryzae), increased ABA sensitivity (no effect on salt tolerance)
SPL11	Ubiquitin: E3 Ubiquitin ligase	Rice	Rice blast, Bacterial blight	some spontaneous lesions, delayed flowering (long day)
PUB22/23/ 24	Ubiquitin: E3 Ubiquitin ligase	Arabidopsis	Downy Mildew, Bacterial speck	None reported. But INcreased drought tolerance
bHLH3/13/ 14/17	Transcription factors	Arabidopsis	Grey mold/rot, Beet armyworm	increased sensitivity to biotroph (Pseudomonas)
MKP1	MAPkinase phosphatase	Arabidopsis	Bacterial speck	none reported in Ws background BUT in Col-knockout is stressed and smaller (SNC1 dependent). Hypersensitive to acute UV-B stress
MKP2	MAPkinase phosphatase	Arabidopsis	Bacterial wilt	increased sensitivity to necrotroph *(Botrytis)* and to oxidative stress
S3H	SA-3-hydroxylase	Arabidopsis	Bacterial speck	early/accelerated senescence
AtWRKY23	Transcription factor WRKY	Arabidopsis	Cyst nematode	reduced root growth, hampered embry development
Suppression de l'ETI				
ACD11	Sphingosine transfer protein	Arabidopsis	xx	extreme dwarf, lesion mimick
FAH1/2	Fatty Acid Hydroxylase (sphingolipids)	Arabidopsis	Powdery mildew	double mutant has reduced leaf and root growth at long- day conditions, increased sensitivity to hemibiotroph (Verticillium longisporum).
FAD7/FAD 8(/FAD3)	Fatty Acid Desaturase involved in oxylipin/JA synthesis	Arabidopsis	Aphid	increased susceptiblity to *Pseudomonas* (avirulent), and Botrytis, drought, cold and heat (? Latter unclear). Altered phloem structure.
FAD7 (spr2)	Fatty Acid Desaturase involved in oxylipin/JA synthesis	Tomato	Aphid	increased susceptiblity to other insects; Whitefly, and tobacco hornworm. Probable increased sensitivity to cold (OX is more tolerant)
EDR2	STARTdomain and Lipid binding domain (PI-4-P)	Arabidopsis	Powdery mildew, Downy mildew	slightly smaller and curled leaves, more sensitive to scenescence/ethylene

protéines, ubiquitination … etc.) au sein de la cellule hôte pour supprimer la fonction de certains gènes (Deslandes and Rivas, 2012). Ainsi, l'effecteur CRN8 de *Phytophthora infestans*, adressé vers le noyau des cellules végétales et qui possède une activité kinase au sein de la cellule végétale (Phosphorylation des protéines de la plante), peut induire la mort cellulaire chez la plante hôte infectée (van Damme et al., 2012). L'effecteur HopZ1a de *Pseudomonas syringae,* transloqué dans la plante hôte *via* le système de sécrétion de type III, est capable d'acétyler la tubuline d'*Arabidopsis thaliana* ce qui conduit à une diminution drastique des réseaux de microtubules, qui fragilise la paroi végétale et diminue les défenses de la plante hôte (Lee et al., 2012). La protéine AvrPtoB de *Pseudomonas syringae*, également injectée *via* le système de sécrétion de type III dans les cellules de Tomate, va y exercer une activité ubiquitine ligase qui va contribuer à supprimer l'immunité de la plante (Abramovitch et al., 2006). Le rôle des effecteurs dans la suppression de la PTI et dans l'établissement de l'ETS est démontré plusieurs fois dans les interactions plantes-agents pathogènes (Hoefle and Hückelhoven, 2008). La fonction première des effecteurs sécrétés par les agents pathogènes est de supprimer l'immunité innée de la plante en interagissant avec des protéines spécifiques de l'hôte (cibles d'effecteurs) (Nomura et al., 2005 ; Jones and Dangl, 2006). Par exemple, l'effecteur HopAI1 secrété par la bactérie *Pseudomonas syringae* supprime la PTI en inactivant la MPK3 et la MPK6 *d'Arabidopsis thaliana*. Ces deux MAP kinases jouent un rôle clé dans l'activation de la cascade de signalisation qui aboutit à l'activation de la réponse immunitaire de la plante (Zhang et al., 2007a). Cependant, certains effecteurs suppriment l'immunité innée de la plante par une activation de leurs cibles, dans ce cas ces cibles sont des régulateurs négatifs du système immunitaire de la plante. Chez le champignon *Cladosporium fulvum,* pathogène de la tomate, il existe deux familles d'effecteurs : la première famille correspond aux facteurs d'avirulence Avr2, Avr4, Avr4E, Avr9 dont l'interaction, directe ou indirecte, avec les produits de gènes de résistance *Cf-2, Cf-4, Cf-4*E *et Cf9,* conduit à la mise en place de nécroses localisées de type HR. La deuxième famille correspond aux gènes qui codent pour des protéines extracellulaires ou ECPs. Les protéines ECP1, ECP2, ECP4 et ECP5 sont également capables d'induire une réaction hypersensible (HR) chez la tomate, leurs cibles végétales sont les produits de gènes de résistance *Cf-ECP1, Cf-ECP2, Cf-ECP4, Cf-ECP5* (Soumpourou et al.,2007). Quant aux gènes *ECP6* et *ECP7*, ils sont clonés, mais leurs cibles sont encore inconnues (Bolton et al., 2008). Chez les agents pathogènes fongiques de type biotrophes, les effecteurs sont majoritairement des gènes Avr, reconnus par les gènes R de la plante hôte. En effet, l'absence du gène R correspondant chez certains génotypes augmenterait la sensibilité de la plante à l'agent pathogène et conduirait à la mise en place d'un mécanisme de défense de

Remobilisation des réserves de l'hôte				
SWEET11 = Xa13 = Os8N3	Sugar transporter	Rice	Bacterial blight	pollen abortion, dwarfing
SWEET12	Sugar transporter	Rice	Bacterial blight	none reported; a non-responsive promoter might not have a phenotype
SWEET13 = Xa25	Sugar transporter	Rice	Bacterial blight	none reported; a non-responsive promoter might not have a phenotype
SWEET14 = Os11N3	Sugar transporter	Rice	Bacterial blight	none reported; a non-responsive promoter might not have a phenotype
SWEET15	Sugar transporter	Rice	Bacterial blight	none reported; a non-responsive promoter might not have a phenotype
COPT1/5	Copper transporters	Rice	Bacterial blight	none reported
Détournement des voies métaboliques de l'hôte				
DMR1	Homoserine Kinase	Arabidopsis	Downy mildew	none reported for point-mutations, but null allele is probably lethal
DMR1	Homoserine Kinase	Tomato	Powdery mildew	dwarfing
UPA7	Expansin	Pepper	Bacterial spot	not tested
UPA20	bHLH Transcription factor, induces expression of UPA7	Pepper (C. annuum)	Bacterial spot	none reported (transient silencing VIGS)
RSP1/AK2	Aspartate kinase	Arabidopsis	Downy mildew	reduced plant size
ADH	Alcohol dehydrogenase	Barley	Powdery mildew	none reported (transient ox, ox in single cell complementation)
PMR5	Pectate esterase (probably)	Arabidopsis	Powdery mildew	increased pectin levels. reduced size, smaller cells due to reduced cell wall expansion, unchanged susceptibility to Pseudomonas and Peronospora
PMR6	Pectate lyase	Arabidopsis	Powdery mildew	reduced size, microlesions along veins. Leafs smaller and cupped upward. Unchanged suscpetiblity to Pseudomonas DC3000 and Peronospora Emco5
LOX3	Lipoxygenase	Maize	Anthracnose blight, southern blight, stalk rot	increased susceptibility to Aspergillus (necrotroph) and Root Knot Nematodes, moderately reduced growth and delayed seed germination, earlier senescence
Endoréduplication et réplication				
CCS52A	Cdh1-type activators of the anaphase-promoting complex	Medicago	Rhizobium	reduced growth under low nitrate or ammonium
MYB3R4	MYB transcription factor	Arabidopsis	Powdery mildew	none reported (only if combined with myb3r1; cytokinesis defects)
PUX2	transcription factor containing C2H2 zinc finger domain, a a PUB domain and a C-terminal UBX domain	Arabidopsis	Powdery mildew	none reported
TOM1/2A/3 , THH1	transmembrane proteins (tonoplast)	Arabidopsis	Tobamovirus	none reported, even for triple tom1/3/thh1
NbTOM1/3	transmembrane proteins (tonoplast)	Tobacco (*N.benthami an* a)/(*N.taba cum*)	Tobamovirus	none reported, but double 1/3 silencing is slightly smaller
AtDBP1	DNA binding protein phosphatase	Arabidopsis	Potyviruses	none reported
AtRH8 / PpDDXL	DEAD-box RNA helicase- like protein, has homology with eIF4A	Arabidopsis, Peach	Potyviruses	none reported
eIF4E1/2	Eukaryotic (translation) Initiation Factor eIF4E	Tomato (S. lycopersicum)	Potyviruses	plants are smaller (RNAi targets both copies). [not effective against 4 non potyvirus strains]
LSP1 / eIF(iso)4E	Eukaryotic (translation) Initiation Factor eIF(iso)4E	Arabidopsis	Potyviruses	none reported

type ETS (Effector Triggered Susceptibility). Chez les agents pathogènes fongiques hémibiotrophes, des effecteurs supprimant la mort cellulaire sont produits dans les premières phases du processus infectieux. Ensuite à des phases plus tardives, ces effecteurs suppresseurs de la mort cellulaire sont remplacés par des effecteurs inducteurs de nécroses (mort cellulaire). Ce qui explique la transition de la biotrophie à la nécroptrophie des champignons hémibiotrophes. Ce même mécanisme a été également observé chez *Phytophthora infestans.* En effet, durant les étapes précoces de la phase biotoprophe de *P. infestans,* la protéine Avr3 est transloquée, dans les cellules de l'hôte. Avr3 stabilise la protéine E3 ligase végétale qui va à son tour participer à la dégradation du facteur INF1, ce qui induit la mort cellulaire (Bos et al., 2010). La reconnaissance de la protéine Avr3 par la protéine végétale R3a va permettre la relocalisation de la protéine Avr3 du cytoplasme vers les vésicules du système d'endocytose. Cette relocalisation est indispensable à la signalisation conduisant à l'hypersensibilité (Bos et al., 2006). De plus, il a été constaté que les effecteurs de type Avr spécifiques de la phase biotrophe des Oomycètes sont riches en motifs RXLR. Ces motifs sont supposés jouer un rôle clef dans le transport et dans la translocation de ces effecteurs dans les cellules végétales (Birch et al., 2008). Enfin, chez les champignons pathogènes nécrotrophes, les effecteurs dits de nécrotrophie (Necrotrophic effectors) peuvent être des molécules de diverses origines (*cf* **Tableau 1**). Enfin, les vésicules d'infection et les haustoria, décrits comme des structures d'alimentation permettant aux parasites d'acquérir les éléments nutritifs, sont maintenant également connues pour participer à la sécrétion et à la translocation dans les cellules végétales des effecteurs (Whisson et al., 2007; Rafiqi et al., 2010).

1-2-2- Facteurs de sensibilité

Un facteur de sensibilité est une molécule ou un ensemble de molécules de l'hôte indispensables au développement de l'agent pathogène. Dans certains cas, ces facteurs peuvent être détournés par l'agent pathogène envahisseur *via* l'action des effecteurs synthétisés par ce dernier. Les cibles de ces effecteurs et les molécules de l'hôte contribuant à leur action sont des facteurs de sensibilité ; ils opèrent ensemble à l'avantage de l'agent pathogène. Quand cette molécule est une protéine, c'est-à-dire un produit d'un gène, on parle de gène de sensibilité. Les premiers facteurs de sensibilité caractérisés ont été des métabolites végétaux qui sont capables d'induire l'expression de gènes de l'agent pathogène ou servir d'attractant chimique, c'est le cas de l'acétosyringone, une molécule phénolique de la plante responsable de attraction *d'Agrobactérium tumefaciens*, un agent responsable de la «galle du collet» (Engström et al., 1987). Par la suite, d'autres facteurs de sensibilité de nature protéique ont été caractérisés.

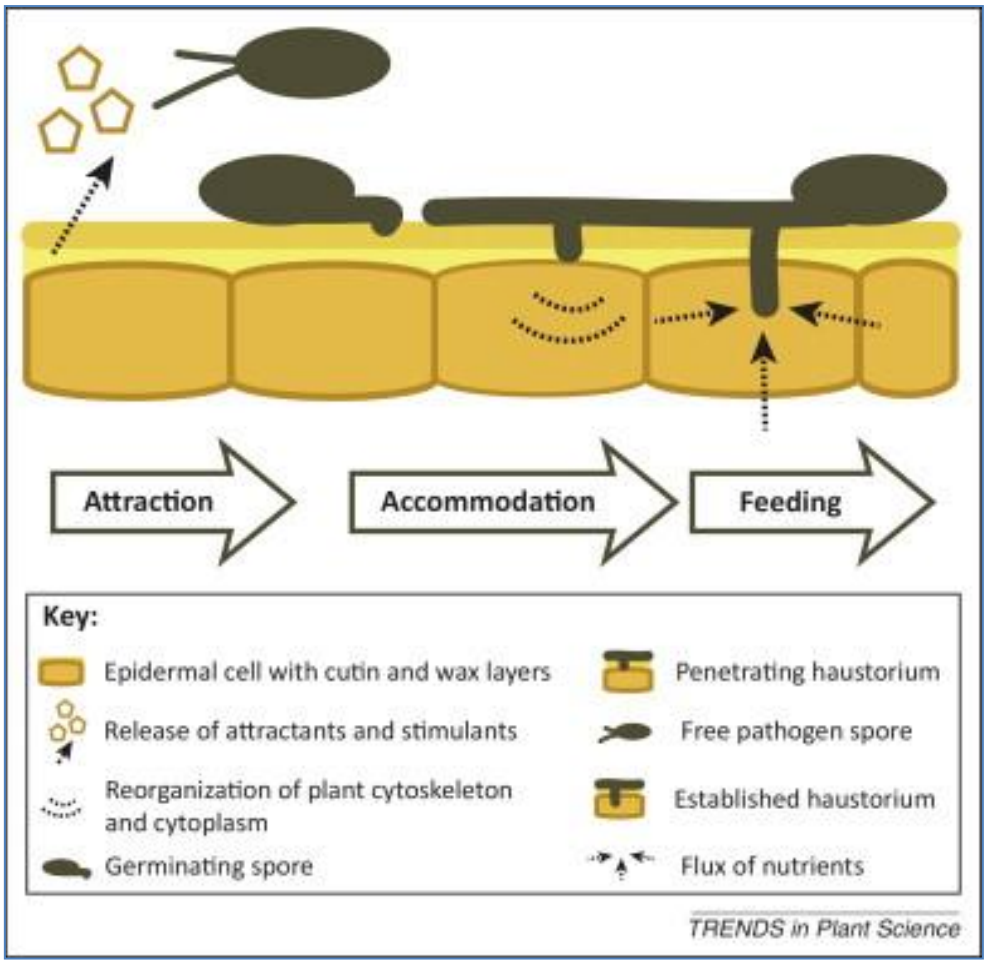

Figure 3 : Etapes clefs d'un cycle infectieux d'un agent pathogène chez une plante hôte sensible. La sensibilité d'une plante hôte à un agent pathogène peut être décomposée en 3 étapes clés : (i) attraction de l'agent pathogène par des molécules d'origine végétale, stimulation de son attachement et son développement à la surface des tissus de l'hôte, (ii) pénétration de l'agent pathogène et mise en place de structures d'infection spécialisées comme les haustoria, (iii) acquisition des éléments nutritifs nécessaires à son développement par l'agent pathogène (d'après Lapin and Van den Ackerveken).

Plusieurs gènes de sensibilité aux différents types d'agent pathogènes (bactéries, virus, nématodes, champignons et Oomycètes) sont déjà décrits dans la littérature. Ces gènes peuvent intervenir à chaque étape du cycle infectieux de l'agent pathogène pour aboutir finalement à son installation (**Figure 3**). Il y a donc des facteurs de sensibilité qui contribuent à la reconnaissance et à la pénétration de la plante hôte par un agent pathogène donné *via* l'induction des changements structuraux au niveau de la paroi et de la cuticule (**Figure 4**) (**Tableau 2**). Par exemple, la cutine, un composant important des plantes peut jouer un rôle positif dans la sensibilité à certains agents pathogènes. Le mutant du gène *ram2* de *Medicago truncatula* qui code pour l'enzyme glycérol-3-phosphate acyltransferase impliquée dans la biosynthèse de la cutine montrait une résistance accrue à l'oomycète *Phytophthora palmivora* avec une réduction de la formation d'appressorium par l'agent pathogène. De plus, il a été montré qu'un apport exogène des monomères de cutine stimule non seulement la formation d'appressorium de *P. palmivora*, mais augmente aussi la sensibilité des racines de Medicago à l'infection par cet oomycète (Wang et al., 2012). D'autres gènes, quant à eux, vont contribuer à la formation des structures de pénétration par des changements structuraux de la membrane cellulaire. C'est le cas des protéines RAC. En effet, le « *silencing*» des gènes OsRAC4 et OsRAC5 appelés également ROP (Rho-like GTPases of Plant) par une construction de type RNAi chez le riz (*Oryza sativa*) conduit à une réduction significative de la sensibilité à la pyriculariose causée par le champignon *Magnaporthe grisea* (Chen et al., 2010a). Ceci suggère que les complexes de pénétration, impliquant des ROP et d'autres protéines, sont nécessaires à la pénétration des pathogènes et de leurs structures dans les cellules hôtes. Ces changements dans la membrane plasmique de l'hôte peuvent également participer au transport des effecteurs sécrétés par un agent pathogène dans les cellules de l'hôte. Il a été décrit dans la littérature, des gènes de sensibilité pouvant participer positivement à l'ouverture des structures et des portes d'entrées naturelles chez les plantes comme la protéine plasmique AHA1 qui joue un rôle de régulateur positif dans l'ouverture des stomates. Ce gène de sensibilité exprimé chez *A. thaliana* lors d'une infection par la bactérie *P. syringae* participe à la pénétration de l'agent pathogène par le maintien de l'ouverture des stomates (**Figure 4**) (**Tableau 2**). Il existe des gènes de sensibilité qui vont participer à la suppression de la PTI ou de l'ETI chez la plante hôte par l'agent pathogène. Comme les facteurs de transcription WRKY38 et WRKY68 pouvant jouer un rôle de régulateurs négatifs de la résistance basale chez *A. thaliana* vis-à-vis de la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae* (Kim et al., 2008). Les mutants de ces deux facteurs qui ne présentent pas de phénotype particulier, sont très sensibles à la bactérie *P. syringae*. Ces deux facteurs de transcription interagissent physiquement avec une histone

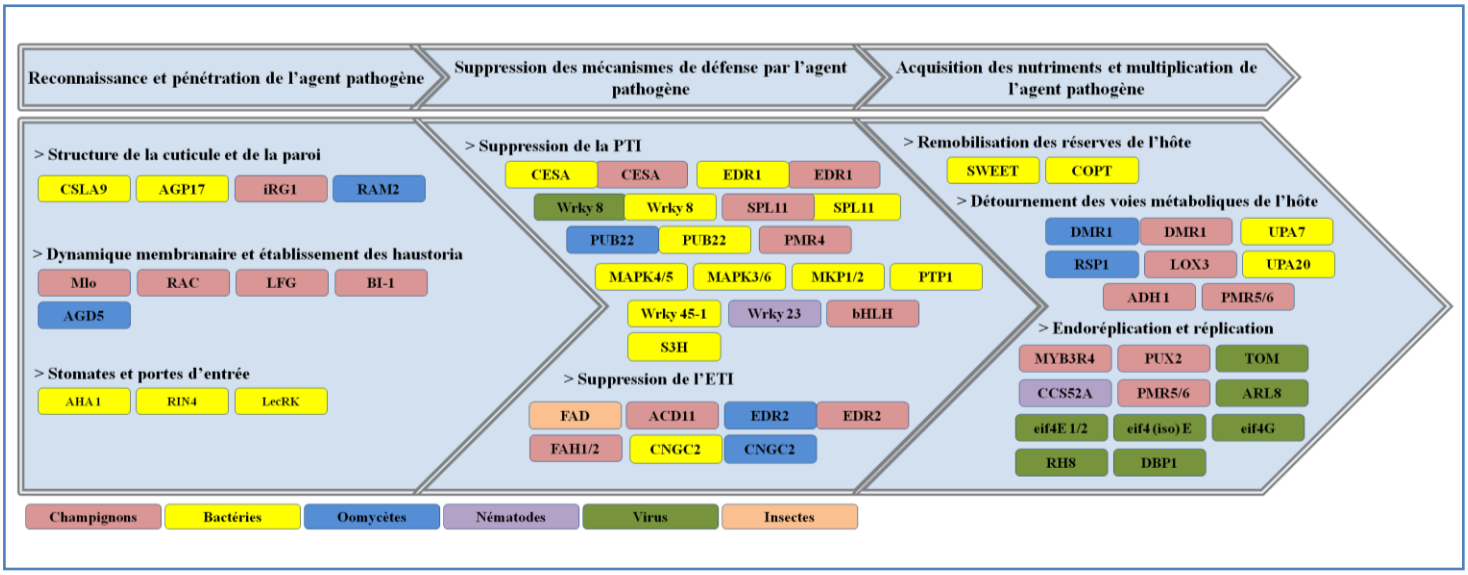

Figure 4 : Les principaux facteurs (gènes) de sensibilité identifiés dans la littérature, classés selon leur rôle et stade d'intervention au cours du processus infectieux. Les différentes couleurs représentent le type d'agent pathogène (champignon, bactérie, oomycètes, virus, nématode et insecte) pour lequel le gène sensibilité a été identifié (d'après van Schie and Takken, 2014).

déacétylase (HDA 19) d'*A. thaliana* en empêchant cette dernière de déclencher les mécanismes de défense de la plante. Certains facteurs de sensibilité participent à la colonisation des tissus végétaux en optimisant l'acquisition des nutriments par l'agent pathogène. La plante fournit du carbone et d'autres éléments nutritifs aux organismes pathogènes (**Figure 4**) (**Tableau 2**). Plusieurs facteurs permettant l'acquisition des nutriments par l'agent pathogène ont été déjà décrits comme les SWEET, des protéines transmembranaires végétales qui ont un rôle dans le transport du glucose et du sucrose des cellules végétales vers l'apoplasme. Chez *A. thaliana* et chez le riz, des gènes *SWEET* sont exprimés lors d'infections bactériennes et fongiques (Chen et al., 2010b ; Chen et al., 2012). De même, chez la vigne, le gène *VvHT*, un orthologue du gène *SWEET* d'*A. thaliana*, est également induit lors de l'infection par le mildiou. Une analyse spatio-temporelle de l'expression du gène *VvHT5* a permis de mettre en évidence sa forte expression dans les veines des feuilles malades, avec une plus grande abondance à proximité du site infectieux (Hayes et al., 2010). Le rôle de ces transporteurs de sucre dans la sensibilité aux maladies a été, en particulier, très bien étudié chez le riz. L'expression du gène *OsSWEET11/Xa13* est induite suite à l'infection par la bactérie *Xanthomonas oryzae*. Pendant cette interaction, l'effecteur TAL (transcription activateur) *PthXo1* se lie spécifiquement au promoteur du gène *OsSWEET11* et induit sa transcription. Des mutations dans ce promoteur répriment l'expression du gène *OsSWEET11* en empêchant la fixation de l'effecteur *PthXo1*. Cette répression du gène *OsSWEET11*, qui conduit à une forte diminution du transport des sucres *via* la membrane plasmique, entraine une faible acquisition des sucres par l'agent pathogène, et de ce fait, induit une forte diminution de la sensibilité de la plante à l'infection. Un autre exemple bien étudié est celui de l'alcool déshydrogénase identifiée chez l'orge. Une analyse transcriptomique a révélé que le gène codant l'enzyme alcool déshydrogénase 1 de l'orge (*HvADH1*) était sur-exprimée après inoculation avec un champignon biotrophe, *Blumeria graminis* (Pathuri et al., 2011). Une sous expression de ce gène par l'utilisation de la technique RNAi ou sa surexpression constitutive par utilisation d'un promoteur 35S, induit respectivement chez l'orge, soit une diminution, soit une activation de la pénétration de *B. graminis.* De plus, l'inactivation de l'activité enzymatique de *HvADH1* par utilisation du pyrazole (inhibiteur enzymatique) induit un retard dans l'apparition des symptômes de la maladie.

L'endoréduplication est un processus consistant en la réplication de l'ADN du noyau d'une cellule sans divisions de la cellule elle-même. Ce phénomène est souvent lié à une forte activité métabolique et à une augmentation de l'expression des gènes et ainsi, un accroissement de la

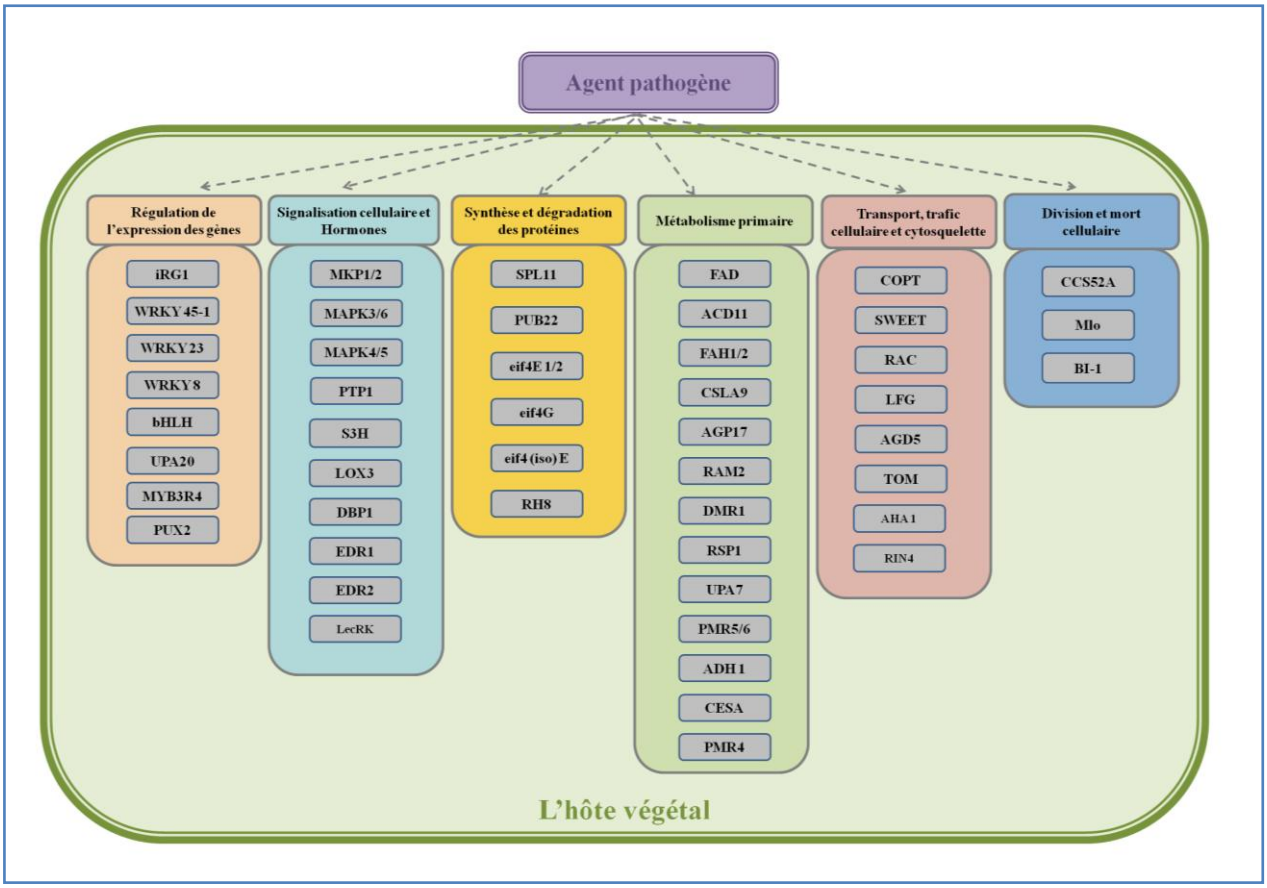

Figure 5 : Classification fonctionnelle des principaux gènes de sensibilité identifiés dans la littérature.

synthèse des protéines. Chez les cellules végétales, l'endoréduplication est une autre modification associée à la réponse à un agent pathogène. Les champignons biotrophes qui vivent et qui se nourrissent dans les cellules vivantes de l'hôte sont connus pour réguler le mécanisme de l'hôte impliqué dans le contrôle de la ploïdie. Par exemple, les cellules d'*A. thaliana* infectées par le champignon *Golovinomyces orontii*, un agent pathogène de l'oïdium, montre une induction du régulateur transcriptionel de l'endoréduplication *MYB3R4*. Cinq jours après inoculation avec *G. orontii*, les cellules du mésophylle qui sous-tendent les cellules épidermiques infectées ont montré une augmentation du niveau de ploïdie jusqu'à 64C. En revanche, le mutant *myb3r4* ne montre pas d'augmentation significative de la ploïdie au niveau des cellules du mésophylle infectées. Ce mutant montre également une croissance réduite du champignon (Chandran et al., 2010). De la même manière, les nématodes peuvent induire une endoréduplication dans les cellules des racines de plantes hôtes qui forment un site nourricier pour le nématode (de Almeida Engler and Gheysen, 2013). Chez *A. thaliana*, une surexpression de la protéine Kip 4 (KRP4), un inhibiteur du cycle cellulaire bloque l'endoréduplication et retarde le développement du nématode. L'augmentation des niveaux de ploïdie des cellules hôtes infectées par l'oïdium ou les nématodes est associée à une augmentation de l'activité métabolique de ces cellules par rapport aux cellules non-infectées. Ceci suggère que l'endoréduplication active le métabolisme de l'hôte afin de fournir les nutriments nécessaires aux agents pathogènes biotrophes hébergés au sein de l'hôte (Wildermuth, 2010). En conclusion, il est maintenant clair que les facteurs ou gènes de sensibilité peuvent être impliqués dans des processus biologiques variés et avoir différentes fonctions au cours de l'infection (**Figure 5**). Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes, dans la signalisation cellulaire, le métabolisme hormonal, la dégradation des protéines, le transport et le trafic cellulaire et enfin dans la division et le cycle cellulaire. Parmi tous ces gènes, plusieurs sont décrits comme gènes de sensibilité aux agents pathogènes d'origine fongique.

2-2-2-1- Utilisation possible des facteurs (gènes) de sensibilité comme source de résistances durables aux maladies ?

Les systèmes efficaces et «durables» de protection des plantes cultivées reposent le plus souvent sur l'utilisation des plantes avec des fonds génétiques résistants. Jusqu'à aujourd'hui, les sources de résistances génétiques utilisées sont :

(1) Des gènes de résistance (*R-genes*), qui ont l'avantage d'offrir une résistance totale, et les désavantages de ne contrôler qu'une fraction plus ou moins faible des populations

Tableau 2. La production mondiale de blé en tonnes/an et les rendements par hectare de surface cultivée d'après les données statistiques de la FAO (http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E)

Année	Production mondiale (tonnes/an)	Rendements (tonnes/hectar)
2000	585690886	2,718616
2001	589832752	2,748376
2002	574743265	2,688016
2003	560128836	2,696819
2004	632144104	2,918898
2005	626739459	2,854359
2006	602331547	2,852018
2007	612874012	2,828088
2008	683207030	3,073644
2009	686720279	3,057063
2010	649325445	2,992763
2011	699389499,6	3,176215
2012	671496872,2	3,089903
2013	713182914,3	3,264582

d'un agent pathogène donné et d'être assez rapidement contournés (Van der Hoorn et al., 2002).

(2) Des QTL de résistance, peu ou pas spécifiques, mais n'offrant qu'une résistance partielle.

Ces deux sources de résistance génétique peuvent être utilisées en combinaison, les QTL pouvant offrir de la durabilité aux gènes, qui pour leur grande majorité, n'en ont pas. La découverte récente des facteurs ou gènes de sensibilité, associée au problème de contournement rapides des gènes-*R* et à la difficulté à identifier de nouvelles sources de résistance classique, a conduit à proposer que ces gènes-*S*, ou tout du moins certains allèles de ces gènes, pourraient constituer des sources alternatives de résistance efficaces et durables. En effet, il a été montré que la perte de fonction de certains de ces gènes-*S* conduisait à la diminution significative de la sensibilité de la plante à une maladie, et donc *de facto*, augmentait la résistance de la plante. De plus, il a été montré que la perte de fonction des gènes-*S* conduit souvent à une résistance durable et à large spectre (non-hôte spécifique), telle que la résistance conférée par le gène *mlo* (Humphry et al., 2011). Ainsi, l'exploitation d'allèles de ces gènes-*S* peut fournir une stratégie prometteuse à l'utilisation des résistances médiées par les gènes-*R*. Toutefois, l'utilisation de ces gènes S peut se trouver une limitation liée à l'impact négatif possible d'une mutation de ces gènes-S sur la fitness des plantes, résultant de leur implication dans des processus biologiques majeurs (Pavan et al., 2010).

II- Le blé

2-1- Intérêt socio-économique du blé

Le blé est une des trois plus importantes céréales au niveau mondial, avec le riz et le maïs. Le blé est essentiellement utilisé pour l'alimentation humaine (panification, biscuits, …) (58 % de la récolte), et dans une moindre importance, pour l'alimentation d'animaux d'élevage comme fourrage (34 %), et pour l'industrie (8 %). La production mondiale de blé tendre est en constante augmentation, et elle a été estimée, en 2013, à plus de 713 millions de tonnes d'après la FAO (**Tableau 3**). Les stocks mondiaux de blé, estimés à 175 millions de tonnes, en 2014, par la FAO, sont très faibles et ne peuvent pas satisfaire la demande mondiale en constante augmentation, non seulement à cause des changements de pratiques alimentaires dans certains pays comme la Chine et l'Inde où la consommation du riz est en baisse, alors que celle du blé est en augmentation, mais aussi à cause des utilisations non-alimentaires (bioproduits et biocarburants). La culture du blé est soumise aux aléas climatiques, avec chaque année des perturbations importantes liées à la sécheresse, aux incendies ou aux inondations et enfin à

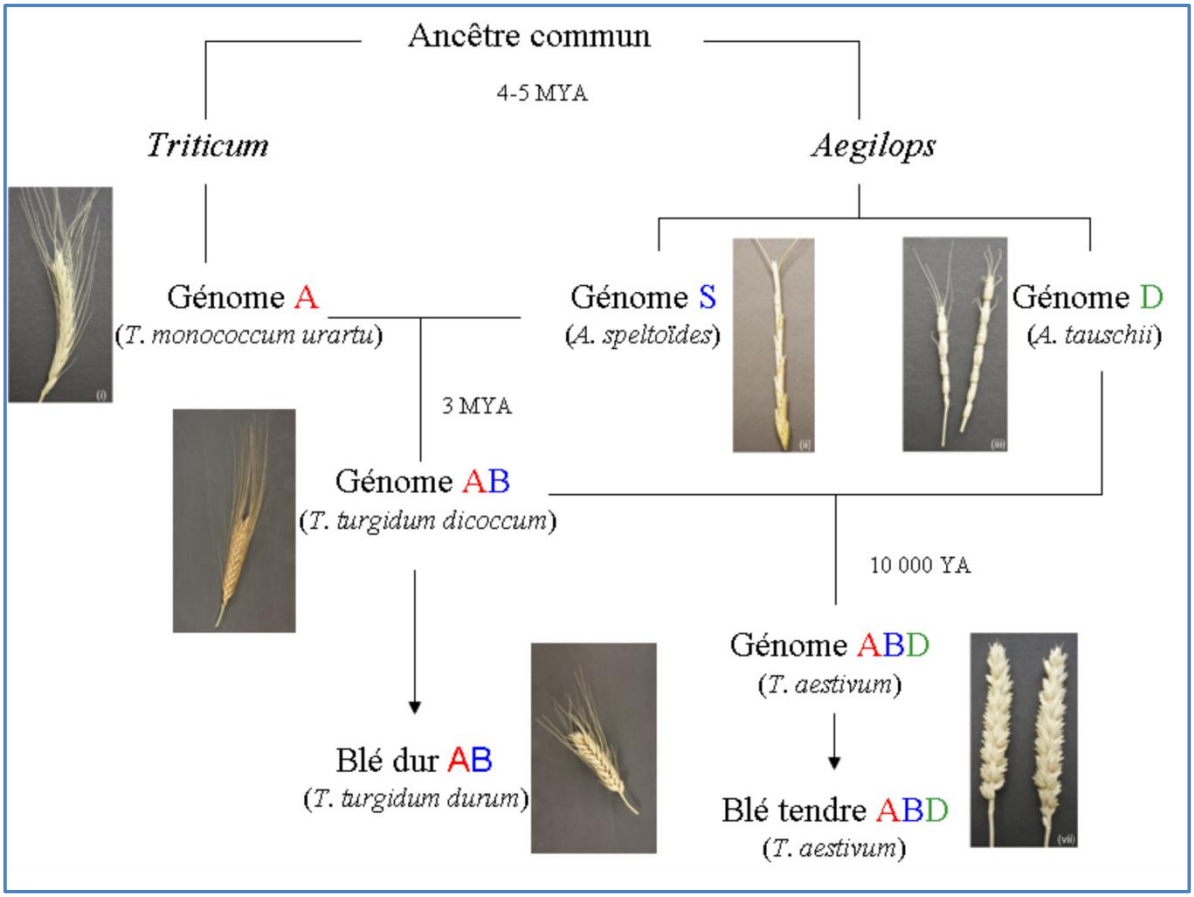

Figure 6 : Histoire évolutive du blé. L'hybridation de *Triticum monococcum urartu* (A) avec *Aegilops speltoïdes* (S) a conduit à la formation de *Triticum turgidum dicoccum* (AB) il y a environ 3 Millons d'années (MYA). Ce dernier a ensuite été domestiqué et selectionné pour donner le blé dur (AB). *Triticum turgidum dicoccum* (AB) s'est hybridé avec *Aegilops tauschii* (D) pour former *Triticum aestivum* (ABD) qui représente le blé tendre.

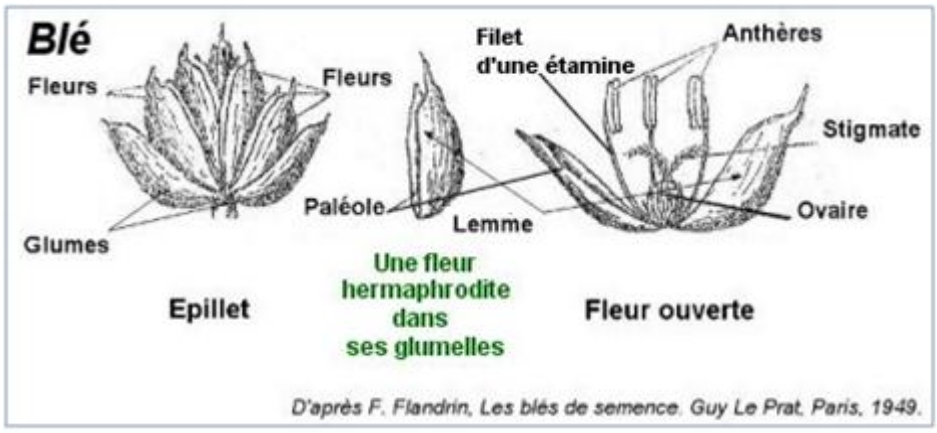

Figure 7 : Anatomie d'un épillet d'un épi de blé.

l'émergence de nouvelles pathologies comme, par exemple, le « Blast disease » en Amérique latine, ou l'apparition de souches hyper agressives de rouille noire en Asie et au Moyen-Orient (Singh et al., 2011). En conséquence, les stocks céréaliers chutent pour atteindre les plus bas niveaux depuis vingt ans. Ainsi, en 2008, les stocks mondiaux des céréales ont connu une perte de 22 millions de tonnes. Cette baisse des stocks a été l'origine de la hausse des prix du marché international du blé. L'indice FAO des prix des céréales est passé de 152 à 281 entre février 2007 et février 2008, alourdissant la facture des importations céréalières de certains pays et plongeant dans un état de crise quelques-unes des régions les plus pauvres, au monde, incapables d'assurer une sécurité alimentaire des populations et causant une instabilité politique et des émeutes dans plusieurs pays.

2-2- Description du blé

2-2-1- Caractéristiques génétiques

Il existe trois types différents de blé : des blés diploïdes ou le *Triticum monococcum* (2n=14), des blés durs tétraploïdes (*Triticum durum* (2n=28)) et enfin des blés tendre (*Triticum aestivum)*, allohexaploïdes (2n = 42) avec les trois génomes A, B et D provenant d'espèces diploïdes différentes. Le donneur du génome A est le blé diploïde *T. monococcum* ou *T. urartu*, le génome B aurait été apporté par un *Aegilops*, le génome D a pour origine *Aegilops tauschii* (**Figure 6**). La grande variabilité de *T. aestivum* est le résultat d'événements de polyploïdisation intervenus à la suite de croisements entre espèces : chaque génome fut entièrement conservé, ce qui explique l'augmentation de la ploïdie.

2-2-2- Caractéristiques botaniques

Le blé appartient à la famille des *Gramineae* et au genre *Triticum*. C'est une plante annuelle, monocotylédone, à feuilles alternes, formée d'un chaume portant un épi. L'épi de blé est formé de deux rangés d' « épillets » situés de part et d'autre du « rachis » émis par une base appelée le nœud. Chaque épillet est formé d'une paire de grandes glumes externes portant chacune trois ou quatre fleurs dont chacune est constituée de deux téguments extérieurs, appelés lemma et paléa, qui renferment les organes reproducteurs. L'organe reproducteur femelle est formé d'un stigmate attaché à l'ovaire par un stylet. L'organe reproducteur mâle ou les anthères en nombre de trois sont également portés par la même fleur (**Figure 7**). À la maturité, le pollen germe sur le stigmate et forme le tube pollinique renfermant deux gamètes mâles qui se développent le long du stylet lors de leur migration. Quand ils atteignent l'ovule et les noyaux polaires, ils les fertilisent et forment respectivement, l'embryon et l'albumen du grain. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec et indéhiscent (qui ne s'ouvre pas), appelé caryopse, constitué

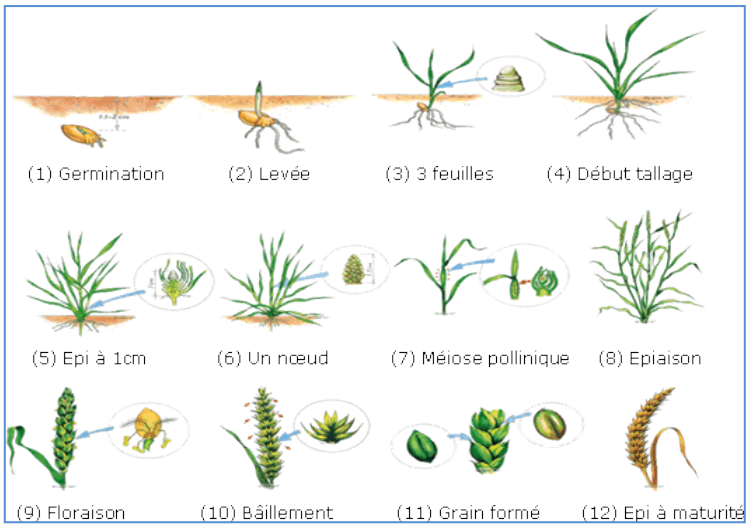

Figure 8 : schéma illustrant les différentes étapes du développement du blé. (D'après blé hybride HYNO (onglet "le blé en général") extraite du site de CNUCED)

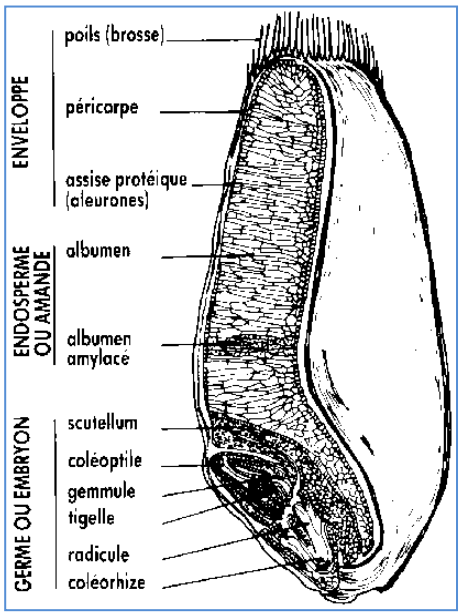

Figure 9 : Les différentes parties constituant un grain de blé mature. Le grain se compose de 3 parties principales : (i) **le péricarpe** ou enveloppe qui correspond à une pellicule cellulosique qui protège le grain pendant sa formation dans l'épi, au cours de sa conservation et aussi pendant la levée, dans le sol, en limitant l'entrée des moisissures et des bactéries. Toutefois, le péricarpe n'est pas étanche et permet le passage de l'air et de l'eau. L'**endosperme** ou **amande** qui constitue presque tout l'intérieur du grain et se compose principalement de minuscules grains d'amidon. On y trouve l'essentiel des réserves énergétiques qui nourrissent la plantule au moment de la germination et enfin le **germe** ou **embryon** comprend 2 parties : la plantule (future plante) et le cotylédon (réserve de nourriture très facilement assimilable, destinée à la plantule) qui contient l'essentiel des matières grasses du grain dans le cas des céréales.

d'une graine (composée d'un embryon et d'un tissu de réserve constitué de 70 % d'amidon et 15 % de gluten) et de téguments.

2-2-3- Caractéristiques culturales et développementales

Le blé peut être qualifié d'hiver ou de printemps. Le blé d'hiver est semé en automne et récolté en été, il caractérise les régions méditerranéennes et tempérées. Le blé de printemps est semé au printemps, ce genre de blé n'a pas besoin de vernalisation, il est plus répandu dans les régions à hiver très rude comme le Canada et les Etats-Unis. Après le semis et la « germination » des graines, la « levée » commence à environ 10 jours après la semence. Durant l'hiver, la plante croit pour donner de petites touffes herbacées, c'est le « tallage ». Ensuite, la plante pousse rapidement et fait de nouvelles feuilles, cette étape correspond à la « montaison ». À la fin du printemps, la plante passe à l'étape de l'« épiaison » pendant laquelle la plante fait des épis qui porteront le fruit ou le grain. Quand les conditions de températures sont favorables, la « floraison » des épis commence. Cette période constitue une phase sensible à la contamination de la plante par les spores de *Fg*. Le grain formé subit une étape de « maturation » qui nécessite de la chaleur et pas d'humidité (**Figure 8**).

2-3- Structure du grain de blé

Le grain de blé appelé également le caryopse est composé d'un « embryon », entouré d'un compartiment contenant les réserves, appelé « endosperme ». Ce dernier est composé de cellules contenant des granules d'amidon baignés dans une matrice protéique viscoélastique : le gluten. L'ensemble est recouvert par une « enveloppe » de structure pluri-lamellaire composée d'une grande diversité de tissus spécialisés (**Figure 9**). Le développement du grain se fait en trois importantes étapes : (1) étape de la croissance et du développement du grain, (2) le remplissage du grain et enfin (3) déshydratation et maturation du grain.

2-3-1- Croissance et développement du grain

Après la double fécondation, l'endosperme et le sac embryonnaire subissent des changements et des modifications dans leur structure. La formation de l'endosperme commence à cette phase avec deux étapes clés (Olsen, 2001) : (i) une étape de multiples divisions nucléaires qui aboutit à la formation du cénocyte (0-1 jours après l'anthèse) suivie d'une étape de (ii) cellularisation avec formation des différentes couches du grain dont la couche aleurone (3-6 jours après l'anthèse, 50-100°Cd (températures journalières cumulées)). La cellularisation se caractérise par l'initiation de la formation de la paroi cellulaire et d'une activité mitotique intense suivie par une endoréduplication qui se produit jusqu'à 8 ou 10 jours après l'anthèse (135-165°Cd).

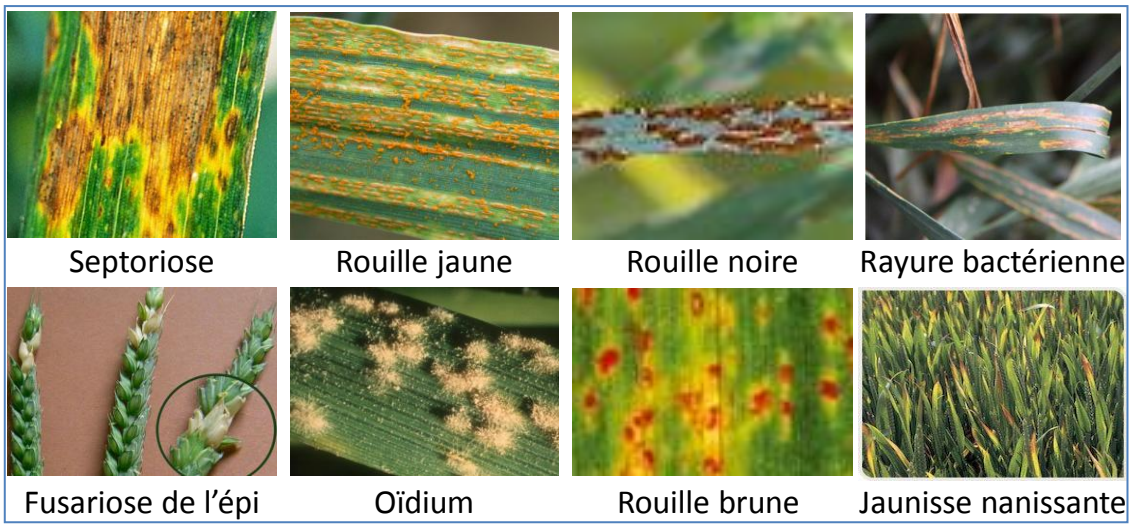

Figure 10 : Principales maladies du blé tendre. Symptômes des principales maladies foliaires (Serptoriose, rouilles, oidium, rayure) et de l'épi (Fusariose de l'épi) du blé tendre. Ces maladies ont principalement des origines fongiques mais il existe des maladies causées par des virus (jaunisse nanissante) ou des bactéries (rayure bactérienne) (d'après Photos d'après Arvalis, 2010).

Tableau 3. Estimation des pertes de rendement en blé (q/ha) causées par les maladies d'origine fongique dans différents pays Européens (Eurowheat**).**

Pays	Septoriose	Rouille jaune	Rouille brune	Fusariose	Oïdium	Total
France	15	0	10	2	1	0-20
Allemagne	3,2	2,5	2,7	0,4	1,7	
Angleterre	10	1	1	0,5	1	8
Hollande	5	1	1	2	1	1
Pologne	4	1	10	1		12
Danemark	8	1	1	1	2	3

L'étape de différenciation cellulaire inclut donc la formation des principaux types cellulaires du grain dont les cellules de transfert, la couche aleurone, l'endosperme et l'embryon.

2-3-2- Remplissage du grain

Cette étape correspond à la croissance des cellules de l'endosperme grâce à l'accumulation des réserves notamment de l'amidon et les protéines (Li et al., 2011). Pendant cette phase, les couches périphériques du grain se compressent avec l'endosperme qui croit avec l'accumulation des protéines de réserve dans les corps protéiques et la synthèse et l'accumulation de granules d'amidon. Quant à l'embryon, il continue de se diviser et devient de plus en plus important.

2-3-3- Déshydratation et maturation du grain

Les couches périphériques du grain subissent un processus de mort cellulaire programmée à ce stade et deviennent de couleur jaune. Le grain subit également une diminution de la teneur en eau et un arrêt de l'accumulation des réserves. L'embryon est complètement formé et continue de recevoir les réserves en lipide et en protéines à partir de l'endosperme.

2-4- Les principales maladies du blé tendre

Les cultures de blé sont soumises chaque année à une pression parasitaire importante et complexe, résultant d'un cortège parasitaire complexe (bactéries, champignons, virus, nématodes) et des ravageurs (limaces, pucerons, insectes), capables d'attaquer toutes les parties de la plante, à tous les stades de son développement. Les plus dommageables, sont les maladies d'origine fongique, dont les trois principales sont les rouilles, la septoriose et les fusarioses. Les agents responsables sont capables de provoquer des symptômes très variés (**Figure 10**), et de générer des impacts quantitativement très variables sur le rendement et/ou la qualité du blé (**Tableau 4**). Quelques rares espèces, comme le champignon *F. graminearum*, sont capables d'attaquer la plante à tous ses stades de développement (de la graine jusqu'à la formation de l'épi) d'où la nécessité de traiter à différents stades de la culture. Certaines maladies sont plus préjudiciables que d'autres. C'est le cas notamment de la septoriose, une maladie foliaire, et de la fusariose de l'épi (une maladie de l'épi), qui entrainent, chaque année, des pertes de rendement pouvant atteindre 40q/ha pour la septoriose, et plus de 30q/ha pour la fusariose (cf Bayer Cropscience). Pour ces raisons, ces maladies ont été identifiées par le CIMMYT (International Maize and Wheat Improvment Center) comme des facteurs majeurs limitant la production de blé dans de nombreuses parties du monde.

Tableau 4. Fréquence et nuisibilité des maladies des blés en France (d'après Bayer, 2014)

Maladies	Nuisibilité	Fréquence
Piétin verse des céréales	Faible	Faible
Oïdium	Faible	Faible
Septoriose (*Septoria tritici*)	Forte	Forte
Helminthosporiose (HTR)	Moyenne	Faible
Rouille jaune	Forte	Faible
Rouille brune	Forte	Moyenne à Forte
Fusariose sur épi		Faible à Moyenne
- *Fusarium roseum*	Forte	
- *Microdochium spp*	Forte	

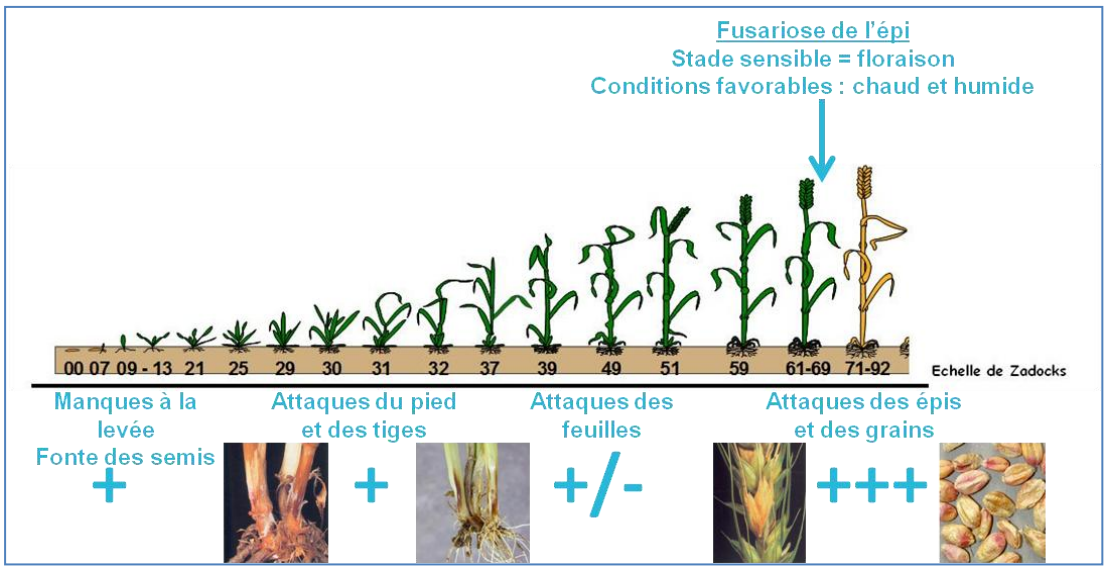

Figure 11 : *F. graminearum* est capable d'attaquer le blé à tous les stades de développement, de la semence à l'épi.

L'utilisation combinée de cultivars résistants, de traitements fongicides et de pratiques culturales reste la méthode la plus efficace pour lutter contre ces maladies. Toutefois, (i) l'évolution des réglementations européennes conduisant à l'interdiction d'utilisation de nombreuses matières actives, (ii) en France, l'application du plan Ecophyto 2018 proposé par le Grenelle de l'environnement en 2007, prévoit de diviser par deux, si possible, l'usage des pesticides avant 2018, (iii) l'absence pour certaines maladies du blé, de résistances génétiques efficaces (résistance contournée), (iv) l'émergence de nouvelles maladies à l'instar de la pyriculariose affectant les cultures de blé dans certaines régions du monde avec une association à des conditions climatiques favorisant l'apparition d'épidémie, exposent les cultures céréalières, et en particulier le blé, à des pertes de rendement et de qualité incompatibles avec les objectifs de l'augmentation régulière de la production et de sécurité alimentaires fixés par la FAO. En outre, ces problèmes de rendement et de qualité se doublent d'un risque sanitaire, notamment *via* la contamination des grains par les mycotoxines produites par certains champignons phytopathogènes. Les mycotoxines sont définies comme des métabolites secondaires produits, avant et après la récolte, par des champignons appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ces mycotoxines, souvent très résistantes aux traitements technologiques, se retrouvent accumulées dans les denrées alimentaires humaines et animales. La fréquence et la gravité de ces maladies restent inégales (**Tableau 5**).

III-La Fusariose de l'épi (FHB)

La fusariose est une maladie qui peut toucher tous les organes de la plante, de la graine à l'épi. Le terme "fusariose" regroupe trois types distincts de symptômes (Parry et al., 1995) : (i) Fusariose des semences ou fonte des semis (Seedling Blight), qui provoque des pertes de levée, (ii) Fusariose du collet (Foot Rot) entraînant la nécrose des tissus du collet, et (iii) Fusariose de l'épi (Head Blight) (**Figure 11**).

3-1-Définition et agent causal

La fusariose de l'épi (Fusarium Head Blight ou FHB) est une maladie d'origine fongique affectant toutes les céréales « à petits grains », et en particulier le blé et l'orge (Nelson et al., 1994) à travers le monde. Les épis atteints par la fusariose présentent un aspect décoloré et desséché (**Figure 12**). Les grains fusariés sont de petite taille, ridés et présentent souvent un duvet blanc ou rose (**Figure 12**). Le FHB peut être causé par des espèces appartenant à deux genres : le genre *Microdochium*, avec deux espèces connues *M. majus* et *M. nivale* (Glynn et al., 2005) et le genre *Fusarium* qui comprend plusieurs espèces (Bottalico and Perrone, 2002 ; Tan and Niessen, 2003 ; Ioos et al., 2005). Le genre *Fusarium* appartient à la division des



Figure 12 : Principaux symptômes de fusariose de l'épi sur épi (A) et grain de blé (B). L'infection entraîne souvent le blanchiment de tout ou partie de l'épi. Ce symptôme est observé lorsque les épis sont infectés aux premiers stades de floraison. Le lot de grains en haut représente les grains fusariés et le lot de d'en bas des grains non-fusariés. Les grains fusariés sont petits et ridés. Ils ont souvent un aspect crayeux (d'après Wegulo, 2012).

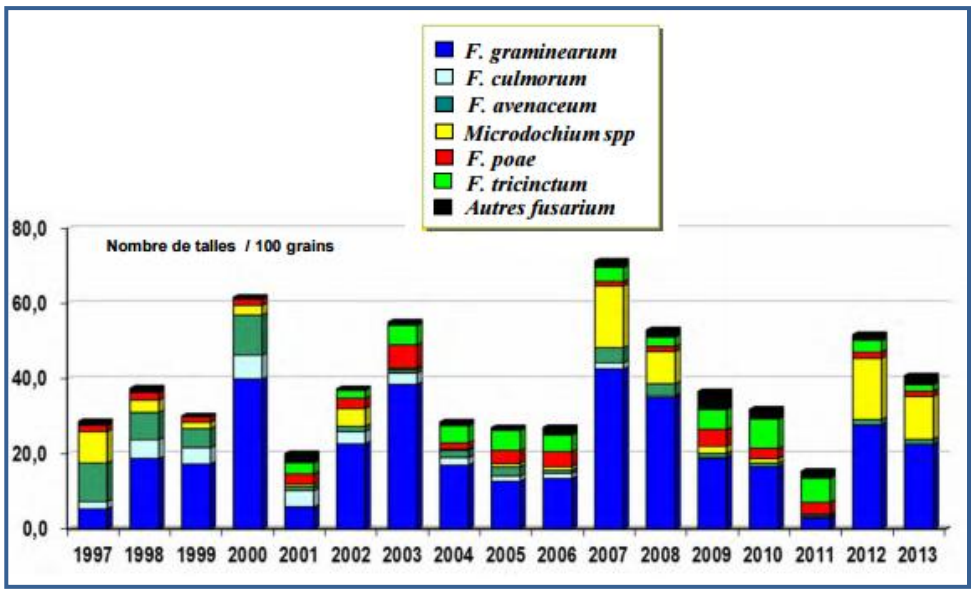

Figure 13 : Dynamique des espèces de *Fusarium* entre1997 et 2013 aux champs en France.

(d'après Bayer CropScience/Arvalis).

Ascomycètes et à la famille des Nectriacées. De nombreuses espèces fusariennes ont été identifiées dans la nature dont les principales capables d'induire la fusariose de l'épi de blé sont : *F. tricinctum, F. poae, F. langsethiae, F. graminearum, F. culmorum, F. arthrosporioides, F. avenaceum, F. sporotrichioides, F. equiseti* et *F. crookwellens* (Xu and Nicholson, 2009). Ce complexe d'espèces subit une dynamique au cours du temps (**Figure 13**). Les formes téléomorphes (formes parfaites) de quelques-unes d'entre elle sont bien connues. Cependant, plusieurs d'entre elles ont une forme téléomorphe toujours inconnue. Les champignons appartenant à ce genre présentent une grande diversité morphologique et une grande variabilité de croissance, ce qui rend plus difficile leur classification et leur caractérisation (Krŭstev and Khristov, 1981 ; Summerell et al., 2003). Outre des critères morphologiques et de croissance, des critères moléculaires sont utilisés pour affiner la caractérisation des différentes espèces de ce genre. Le genre *Fusarium* est présent dans toutes les régions du monde, des zones tempérées aux régions tropicales ou désertiques. L'agent principal responsable du FHB dans de nombreuses parties du monde est l'espèce *Fusarium graminearum*. *F. graminearum* est un pathogène qui attaque les graminées, plus généralement les céréales à petits grains tels que le blé et le maïs. *F. graminearum* possède deux formes : une forme sexuée (*Gibberella Zea*) et une forme asexuée (*Fusarium graminearum*) qui constitue la grande partie de son cycle biologique. Son génome séquencé et la capacité à réaliser des analyses fonctionnelles chez ce champignon en ont fait un modèle d'étude pour les champignons mycotoxinogènes. Les mycotoxines produites par les *Fusarium* ou fusariotoxines représentent la préoccupation majeure des filières céréalières du fait de leur occurrence et des conséquences économiques que leur présence engendre mais aussi parce qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune stratégie de maîtrise suffisamment efficace pour certifier le respect des limites réglementaires. Les fusariotoxines appartiennent à différentes familles : Trichothécènes, Fumonisines et Zéaralénone mais aussi Enniatines, Beauvéricine, Moniliformine et Fusarine C. Les trois premières familles sont les plus rencontrées dans les récoltes et les seules pour lesquelles les teneurs dans les grains sont réglementées (Gratz et al., 2014). Chaque souche de *F. graminearum* et *F. culmorum* peut produire plusieurs trichothécènes de type B: *F. graminearum* produit principalement du déoxynivalénol (DON) et ses dérivés acétylés, 3 et 15-acétyldésoxynivalénol (3- et 15-ADON) ou nivalénol (NIV), nous parlons donc de chémotype NIV, 3-ADON et 15-ADON. Ces trois chémotypes sont les seuls connus jusqu'à présent (Pasquali and Migheli, 2014).

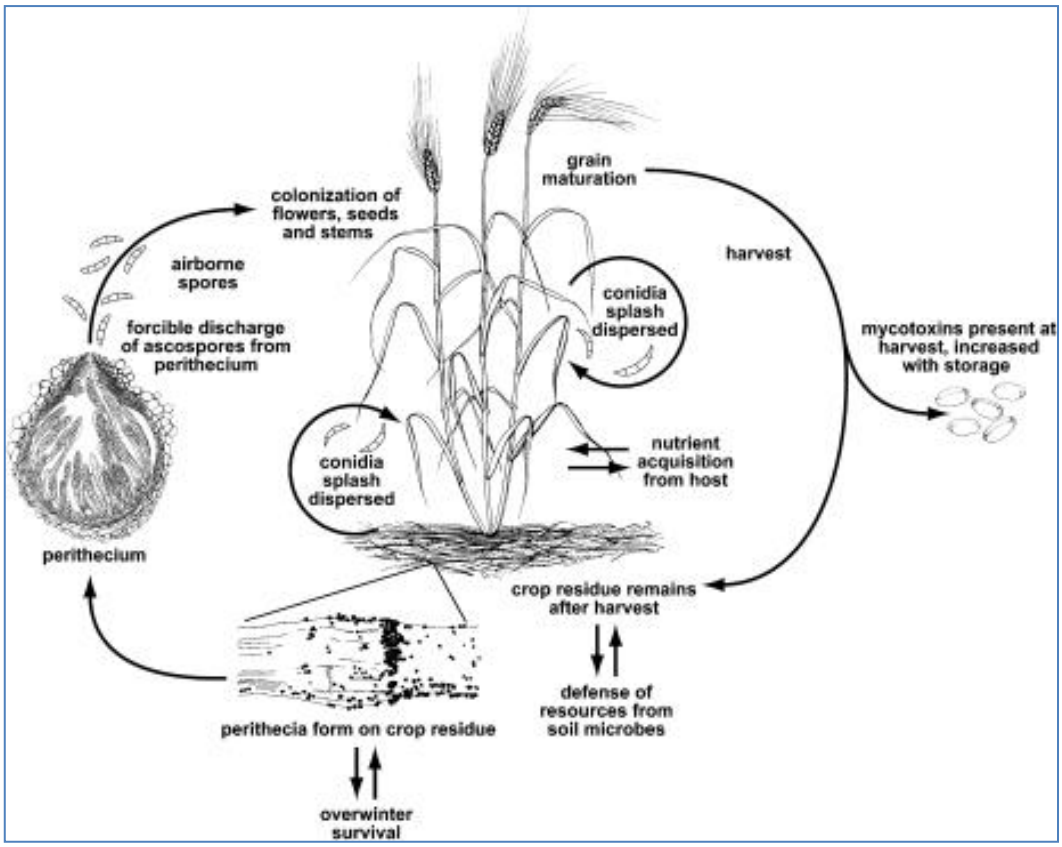

Figure 14 : Cycle de vie de *Fusarium graminearum* sur blé tendre (d'après Trail et al., 2002).

3-2- Cycle biologique de la maladie

F. graminearum est un champignon qui passe l'hiver sous forme de chlamydospores ou de mycélium dans le sol sur les résidus du précédent cultural et qui serviront d'inoculum primaire (initial) pour infecter les nouvelles cultures de blé au printemps (Trail et al., 2002) (**Figure 14).** De plus, le champignon peut aussi survivre sur les semences de blé. L'inoculum primaire se composant principalement d'ascospores produites dans les périthèces (structures de fructification sexuelle), qui se forment sur les débris végétaux du précédent cultural au printemps quand les conditions de températures et d'humidité lui sont favorables. La libération de ces ascospores et/ou conidies et leur dissémination par le vent et/ou les projections d'eau de pluie ou d'irrigation facilitent leur accrochage sur les épis de blé. Dans les conditions de température et d'humidité favorables, ces ascospores germent et infectent les glumes, les fleurs, ou autres parties de l'épi. Les infections surviennent surtout pendant la floraison (stade pendant lequel les anthères se rompent et libèrent leur pollen), qui est considérée comme un stade très sensible pour le déroulement de l'infection du fait de l'expression de certains stimulants comme la bétaïne et la choline qui pourraient contribuer à la germination des spores et à la croissance de l'agent pathogène (Strange and Smith, 1971 ; Nkongolo et al., 1993). Pour cela, les infections qui se produisent généralement à la floraison sont les plus dommageables. Les premiers symptômes sur épi apparaissent au bout de 2 à 6 jours après l'infection. La maladie est souvent amplifiée par les infections secondaires qui sont causées par les conidies formées sur les épis de blé et leur dissémination par le vent et le phénomène d'éclaboussement.

3-3-Conditions favorisant le développement du FHB

Trois facteurs indépendants conditionnent la sévérité des attaques des symptômes des épidémies de *Fusarium* : les facteurs climatiques, les facteurs culturaux et les facteurs physiologiques de la plante hôte (Sutton, 1982 ; Bai and Shaner, 2004 ; Alvarez et al., 2010 ; Walter et al., 2010).

3-3-1- Les facteurs climatiques

Les facteurs climatiques, en particulier, l'humidité et la température, jouent un rôle primordial, puisqu'ils vont conditionner à la fois la germination des spores du champignon et l'infection. Chaque espèce de *Fusarium* a des conditions optimales de température et d'humidité. Des souches de la même espèce issues de régions géographiques différentes peuvent également avoir des conditions de températures et d'humidité optimales différentes, suggérant l'existence chez certaines espèces de champignons phytopathogènes d'une spécialisation géographique et climatique (Xu and Nicholson, 2009 ; Doohan et al., 2003). *F. graminearum* et *F. avenaceum*

Tableau 5. Les principales mycotoxines produites par les différentes espèces du genre *Fusarium* identifiées chez le blé. (TCT: trichothécène, ZEA: zéaralénone, MON: moniliformine, BEA: beauvericine, ENN: enniantine, FUM: fumonisine)

Espèce	**Principales mycotoxines**
F. avenaceum	MON, BEA, ENN
F. croockwellense	TCT B, ZEA
F. culmorum	TCT B, ZEA
F. graminearum	TCTB, ZEA
F. poae	TCT B (NIV)
F. sambucinum	TCT A, ZEA, BEA
F. subglutinans	MON, BEA, FUM
F. sporotrichioides	TCT A
F. verticillioides	FUM
F. tricinctum	MON, BEA (TCT A)
F. langsethiae	TCT A
F. oxysporum	FUM
F. equiseti	TCT A, B, ZEA
F. acuminatum	TCT A
F. pseudograminearum	TCT B
F. heterosporum	ZEA

ont une température optimale de 28-29°C, alors que pour *M. nivale* et *F. culmorum*, la croissance optimale est obtenue à 18°C et 26.5°C, respectivement (Rossi et al., 2001). Ainsi, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum* et *M. nivale* sont préférentiellement retrouvées dans des zones géographiques à climat plutôt froid et humide, comme l'est et le nord de la France ou le Royaume-Uni, alors que *F. graminearum* est plutôt présent dans les régions plus tempérées (Doohan et al., 2003 ; Arseniuk et al., 1999).

3-3-2- Les facteurs culturaux

Ils ont un impact principalement sur le développement de l'inoculum primaire. Il est maintenant bien démontré qu'un précédent cultural utilisant une plante sensible à la fusariose (maïs, blé, orge) constitue une source potentielle d'inoculum pour la culture suivante *via* la présence du champignon (spores, mycélium) sur les résidus (McMullen et al., 1997). Toute pratique culturale associant gestion du précédent cultural et élimination des résidus de culture limite les risques de développement de la fusariose lors de la culture de blé suivante.

3-3-3- Les facteurs physiologiques et phénologiques

Les facteurs physiologiques et phénologiques impactant le développement du FHB sont nombreux. L'intensité de la maladie dépend bien de la quantité d'inoculum initial et de la virulence des souches pathogènes, mais aussi de la taille des plantes, de la structure des épis (barbus, fermés, ...), de la densité des épillets, de l'état de stress, du stade de développement, de la date et la durée de la floraison et du niveau de résistance de la variété (Bal, 1994 ; Champeil et al., 2004 ; Xu et al., 2005 ; Audenaert et al., 2009).

3-4-*Fusarium graminearum* & mycotoxines

3-4-1- Généralités

À l'exception du genre *Michrodochium*, la majorité des espèces impliquées dans la fusariose de l'épi sont capables de produire une large gamme de mycotoxines : Nivalénol (NIV), Déoxynivalénol (DON), Zéaralénone (ZEA), Fumonisines (FUM) (**Tableau 6**).

La toxine la plus commune aux espèces du genre *Fusarium* est le Déoxynivalénol (DON) qui appartient à au groupe de mycotoxines les plus présentes au champ, les trichothécènes de type B (TCT B). À des doses très élevées, ces mycotoxines peuvent entraîner chez l'homme et chez l'animal des problèmes de santé plus ou moins importants (Pinton et al., 2015 ; Pinton and Oswald, 2014). La biosynthèse des trichothécènes chez *Fusarium* est codée par un cluster de 15 gènes Tri. Ces gènes sont répartis en 3 loci sur différents chromosomes. Le premier locus est un ensemble de 12 gènes ; le second loci contient les gènes Tri1et Tri16 ; le troisième est formé par le gène Tri101(Alexander et al., 2011). Cette biosynthèse s'intègre dans la voie de

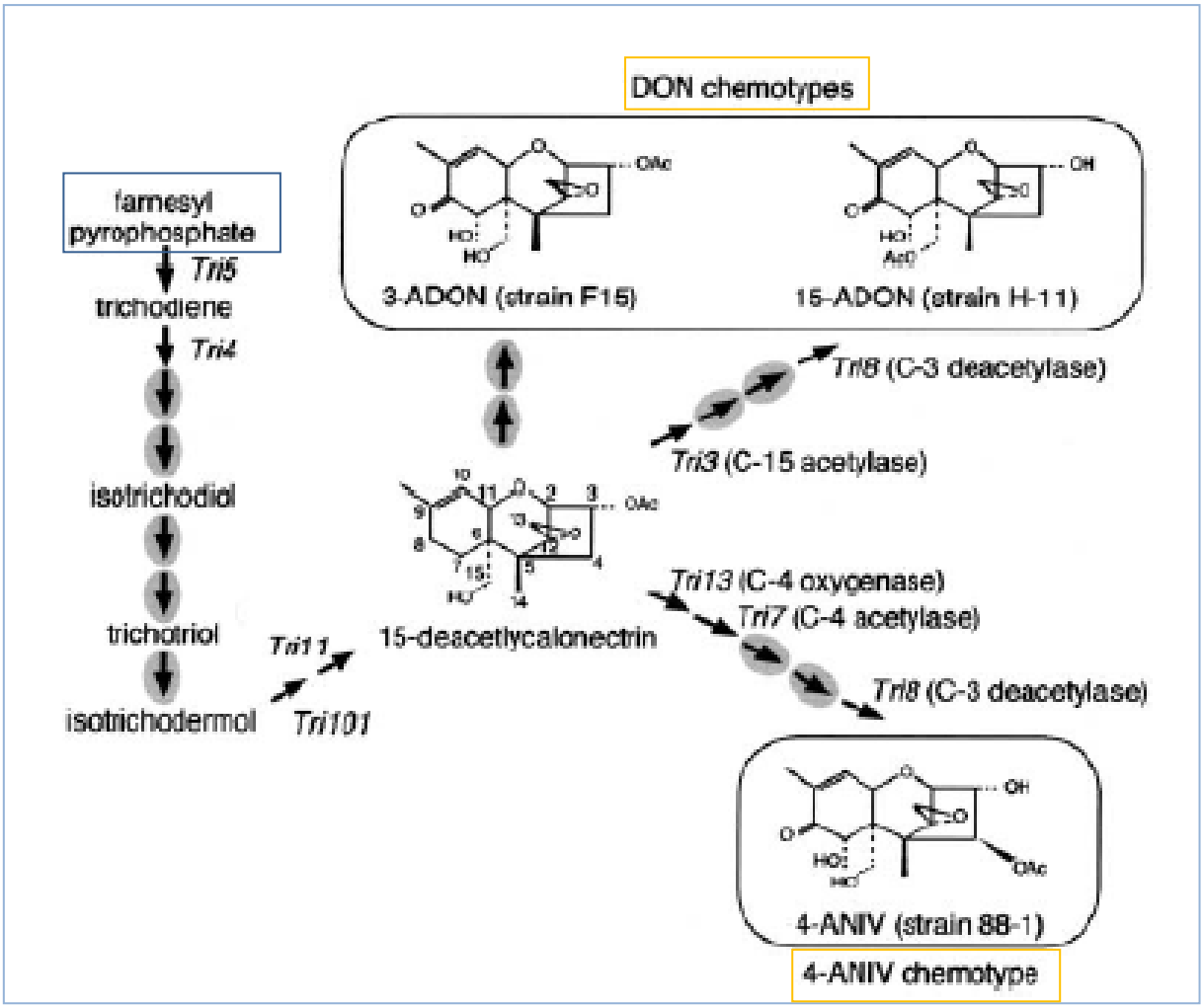

Figure 15 : Principales étapes de la biosynthèse des DON chez le champignon *Fusarium graminearum.* Les gènes codant pour une étape enzymatique sont identifiés à côté des flèches indiquant l'étape. Les flèches entourées en gris indiquent des étapes pour lesquelles aucun gène ne lui a encore été assigné. La molécule identifiée dans le rectangle bleu est le précurseur de la biosynthèse des DON. Les molécules identifiées dans le rectangle orange sont les trichothécènes de type B (Déoxynivalénol (DON), Acétyldéoxynivalénol (ADON), Nivalénol (NIV).

biosynthèse des stérols. En effet, le précurseur aux réactions conduisant à la biosynthèse des trichothécène est le farnésyl-pyrophosphate (FPP) qui est cyclisé en produit de trichothécène non-toxique le trichodiène. Cette première étape est catalysée par la trichodiène synthase codée par le gène Tri5 (Hohn and Beremand, 1989) (**Figure 15**). La synthèse de trichothécènes est influencée par des facteurs exogènes tels que la température, pH, pression atmosphérique, lumière, les nutriments disponibles. Ces facteurs influencent l'expression des gènes Tri6 et Tri10, identifiés comme les gènes régulateurs de la biosynthèse des trichothécènes (Seong et al., 2009). La différence génétique entre le chémotype 3-ADON et le chémotype 15-ADON viendrait du gène Tri8 (Alexander et al., 2011) (**Figure 15**). Le gène code une enzyme estérase, qui dans le cas du chémotype 3-ADON catalyse la déacétylation du C-15 de l'intermédiaire 3,15-diacetyldeoxynivalénol et dans le cas du chémotype 15-ADON catalyse cette même réaction, mais en C-3. De même, la possibilité pour une souche de produire du NIV serait corrélée aux gènes Tri 7 et Tri 13 qui seraient fonctionnels pour le chémotype NIV et pas pour le chémotype DON (Lee et al., 2002).

3-4-2- Rôle des mycotoxines

En dépit des nombreuses études sur le rôle des mycotoxines produites par les différentes espèces du genre de *Fusarium*, le rôle exact des trichothécènes, et particulier de la plus répandue, le DON, dans le processus infectieux de ces champignons reste mal connu, et fait encore l'objet de discussions. Chez le blé tendre, la souche non-productrice de mycotoxine (mutée dans le gène tri5, premier gène de la voie de biosynthèse) est toujours capable d'infecter l'épillet localisé au niveau du site d'inoculation, mais, elle est incapable de passer d'un épillet à un autre, et ainsi infecter l'ensemble de l'épi (Proctor et al., 1995 ; Gang et al., 1998). Le DON est donc considéré comme un facteur d'agressivité (Arseniuk et al., 1999). La production de DON serait donc un facteur de virulence essentiel à la colonisation des épis et grains de blé par *Fusarium*. Il a été montré que ces mycotoxines sont produites en avant du front de l'infection, associées à la colonisation des tissus végétaux. Il a été observé qu'une forte concentration des DON induirait une forte synthèse de H_2O_2 induisant la mort cellulaire programmée chez la plante hôte (Audenaert et al., 2014) (**Figure 16**). Au niveau moléculaire, les DON peuvent interagir avec différentes voies métaboliques de la plante hôte, comme le cycle du krebs et la voie de biosynthèse des polyamines (Audenaert et al., 2014) (**Figure 17**). Ces résultats confèrent au DON un rôle d'effecteur. D'autres facteurs interviennent dans le pouvoir pathogène de *F. graminearum*, tels que les enzymes de dégradation des parois, par exemple (Schwarz et al., 2002).

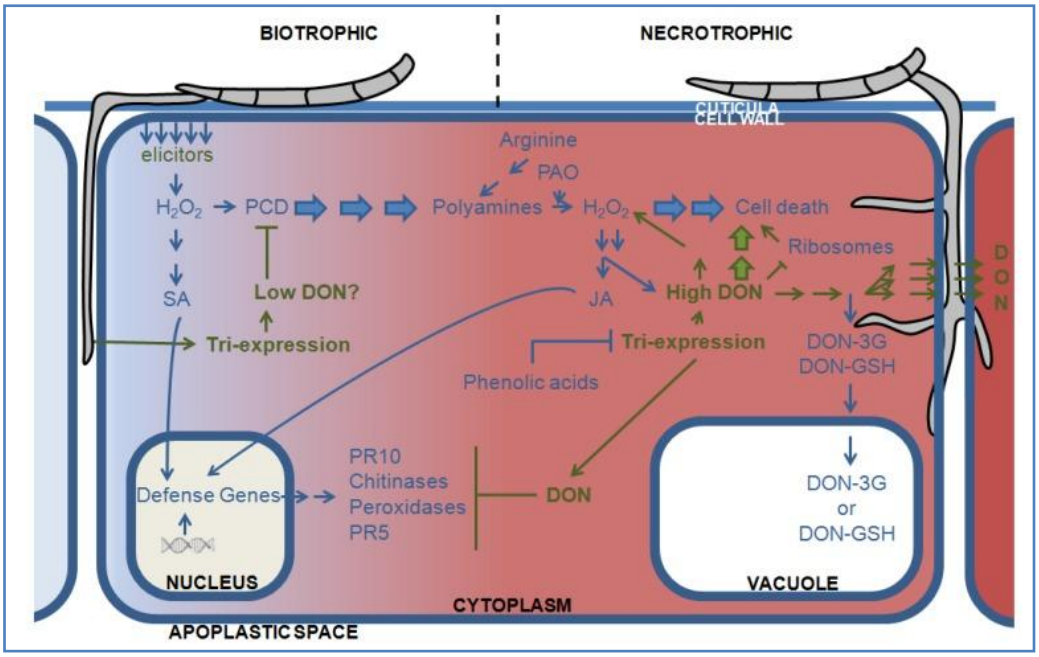

Figure 16 : Modèle hypothétique du rôle des DON dans l'induction de la mort cellulaire programmée (PCD) et dans la transition de la phase biotrophe vers la phase nécrotrophe (d'après Audenaert et al., 2014).

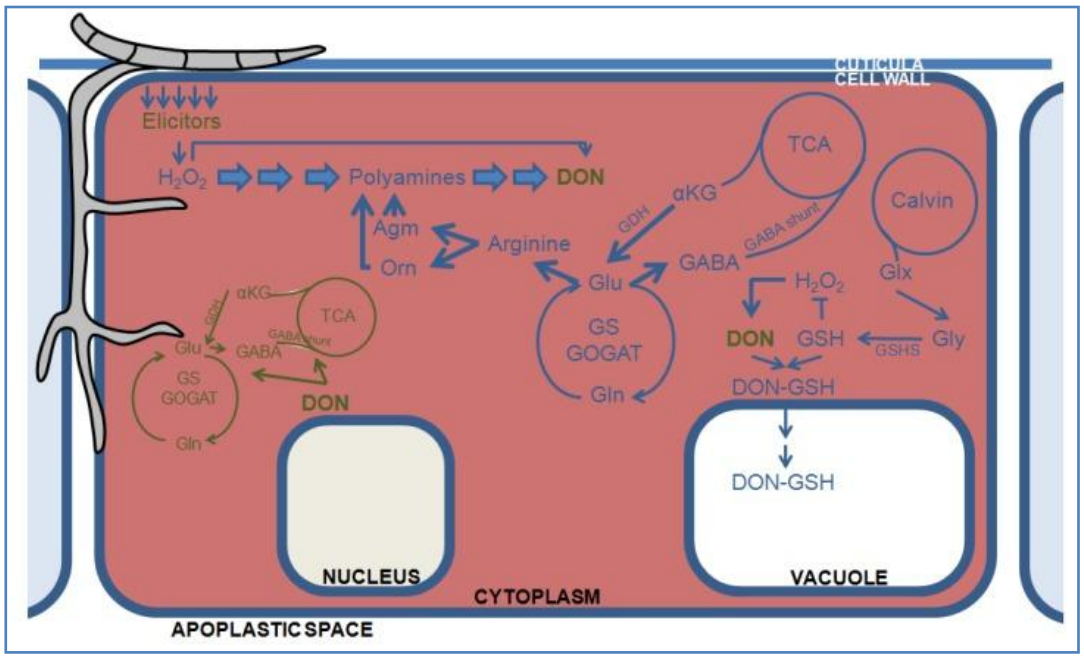

Figure 17 : Modèle hypothétique de l'interaction des DON avec le métabolisme primaire de l'hôte (en bleu) et du *Fusarium graminearum* (en vert).

3-4-3- Mécanismes de détoxification des mycotoxines

La plante hôte est capable de détoxifier les différentes mycotoxines produites par les différentes espèces du genre *Fusarium*. Ces processus de détoxification impliquent des modifications chimiques de ces toxines *via* l'action UDP-glycosyltransferases (UGTs), glutathione-*S*-transferase (GST) ou le cytochrome P450 mono-oxygenases (CYP). Ces métabolites chimiquement modifiés sont ensuite transportés vers les vacuoles pour leur dégradation, vers les parois végétales, ou vers l'apoplasme (Coleman et al., 1997). Plusieurs études portant sur ces mécanismes chez le blé et l'orge ont démontré leur induction sous l'effet des DON ou suite à l'inoculation avec des souches de *Fusarium* productrices des DON(Boddu et al., 2006).

3-5- Développement de la maladie sur un épi de blé

Une étude s'intéressant au parcours du champignon *Fg* sur un épi de blé tendre après une inoculation du rachis a permis de proposer un schéma d'infection d'un épi par *F. graminearum* en 5 étapes principales (Brown et al., 2010) (**Figure 18)** : une croissance du champignon d'abord inter et intracellulaire, verticale (vers le bas) dans le cortex et le système vasculaire du rachis (N°1 dans la **Figure 18C**) ; les hyphes intracellulaires déjà bien formées abordent une croissance latérale dans le sclérenchyme du rachis (N°2) ; les hyphes empruntent par la suite un chemin vertical du bas du rachis vers le haut du rachis (N°3 dans la **Figure 18D**) avec des croissances latérales et intercellulaires au niveau des tissus du sclérenchyme atteignant ainsi les nœuds du rachis (N°4 dans la **Figure 18D**) et enfin explosion de la croissance latérale fongique accompagnée d'une accumulation à la surface du champignon après rupture de l'épiderme et formation d'un mycélium aérien (N°5 dans la **Figure 18E**). L'utilisation combinée de souches de *Fg* exprimant des gènes rapporteurs fluorescents et de la microscopie confocale a largement contribué à une meilleure compréhension du processus infectieux de *Fg*. Par exemple, l'utilisation de la souche de référence de *Fg* Ph1, exprimant la GFP sous contrôle du promoteur du gène Tri5 (Ilgen et al., 2009) a permis de montrer clairement que l'induction du gène Tri5, gène régulé et utilisé comme « marqueur » de la synthèse, *in planta*, du DON était tissu spécifique. Ilgen et al. ont ainsi montré que le gène Tri5 n'est pas induit dans les anthères, cible initiale de l'agent pathogène après inoculation de la cavité florale alors que pendant les stades plus tardifs de l'infection (4-7 jours après l'inoculation), l'expression du gène Tri5 est détectée au niveau des nœuds du rachis. Ce résultat a été confirmé par des expériences de qRT-PCR sur des nœuds du rachis infectés montrant une forte induction de ce gène. Ces données suggèrent que la biosynthèse des DON commence au niveau du rachis qui constitue la première barrière à la propagation de *Fg* (résistance de type II), tout en montrant l'importance du DON dans le franchissement de cette barrière (Jansen et al., 2005 ; Maier et al., 2006). Par ailleurs, des

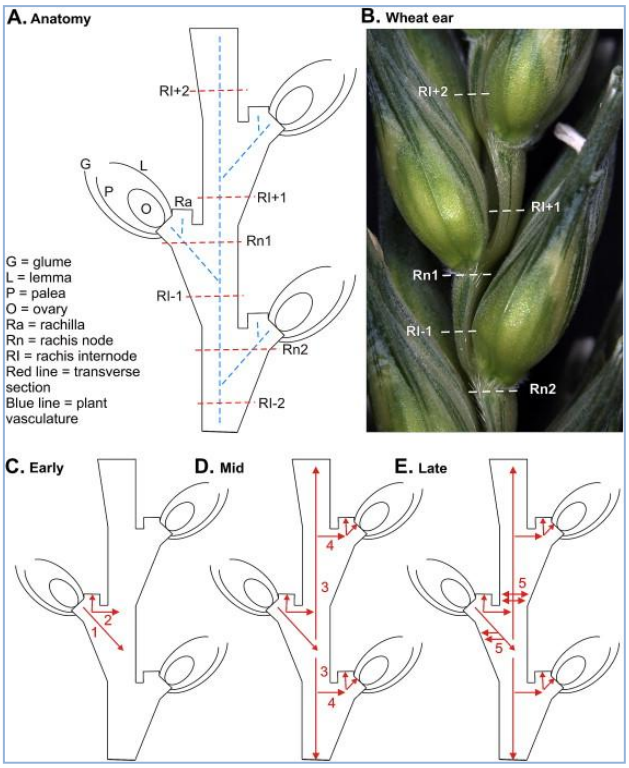

Figure 18 : Schéma illustrant le parcours du champignon *Fg* sur un épi de blé tendre (d'après Brown et al., 2010).

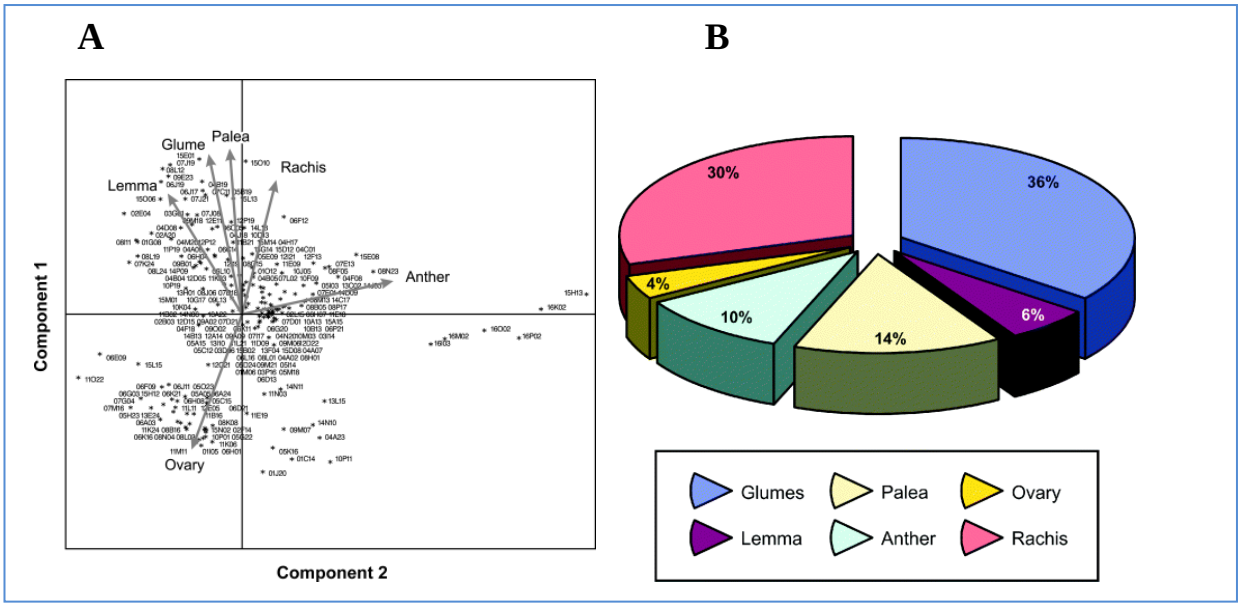

Figure 19 : Expression tissu-spécifique d'une partie du génome de blé tendre en réponse au FHB. A) Analyse en composante principale montrant une différence d'expression du génome des différentes parties de l'épi en réponse au FHB, **B)** Proportion des gènes up-régulés par différents tissus de l'épi en réponse au FHB (d'après Golkari et al., 2007).

données récentes soutiennent également l'importance de la colonisation du rachis dans le processus infectieux de *Fg*. L'introduction du bras long du chromosome 7 de *Thinopyrum elongatum*, un parent sauvage de blé, dans un blé de printemps hexaploïde, sensible à la fusariose de l'épi (*Chinese spring (CS))*, lui confère une résistance significative au FHB (Fu et al., 2012). L'analyse comparative du processus infectieux de *CS* et de *CS*-7L, en utilisant, une souche de *Fg* marquée par la protéine fluorescente GFP a montré que le passage des hyphes infectieux d'un épillet à un autre est bloqué au niveau du nœud du rachis de *CS*-7L et pas chez le *CS* et ce blocage est associé au dépôt d'une substance brune dont la nature n'est pas connue (Fu et al., 2012).

Une analyse comparée du transcriptome des différents organes d'un épi de blé infecté par *Fg* a révélé l'existence d'une réponse spécifique à chaque organe (Golkari et al., 2007). En effet, l'expression des gènes dans les organes non-reproductifs (glumes, les glumelles et le rachis) présente des profils d'expression similaires qui sont différents des profils d'expression des gènes exprimés dans les organes reproductifs (embryon et les anthères) (**Figure 19a**). De plus, cette étude a montré également que la différence est dans le nombre et la fonction des gènes induits après l'infection par *Fg*, le nombre de gènes induits dans les glumes et le rachis est supérieur au nombre de gènes induits dans les anthères et l'embryon (**Figure 19b**). Les gènes impliqués dans la réponse au stress comme les gènes codant les protéines PR, les protéines HSP, les protéines impliquées dans le stress oxydatif ou encore dans la synthèse des protéines sont induits dans tous les organes infectés par le FHB alors que les facteurs de transcription type-Wrky sont spécifiquement induits dans les anthères et les facteurs de transcription type métallothionéines (MT) dans le rachis. Ces résultats ont montré que les changements moléculaires induits par la fusariose exigent une analyse individuelle des différents organes formant un épi de blé (glumes, glumelles, rachis, anthères, embryon et grain). Beaucoup des gènes induits ont une réponse organe spécifique, en réponse à l'infection, peuvent ne pas être détectables lorsqu'un épi de blé entier est utilisé comme échantillon biologique pour une analyse.

3-6-Méthodes de lutte contre le FHB

Les stratégies de lutte contre le FHB peuvent être : (i) chimique (utilisation des fongicides), (ii) biologique (lutte biologique) ou (iii) génétique (utilisation de variétés résistantes sélectionnées génétiquement), mais les plus efficaces sont basées sur une combinaison de toutes ces méthodes de lutte, comme l'utilisation des variétés résistantes à la fusariose couplée à l'utilisation des traitements phytosanitaires et des pratiques culturales qui permettent de réduire

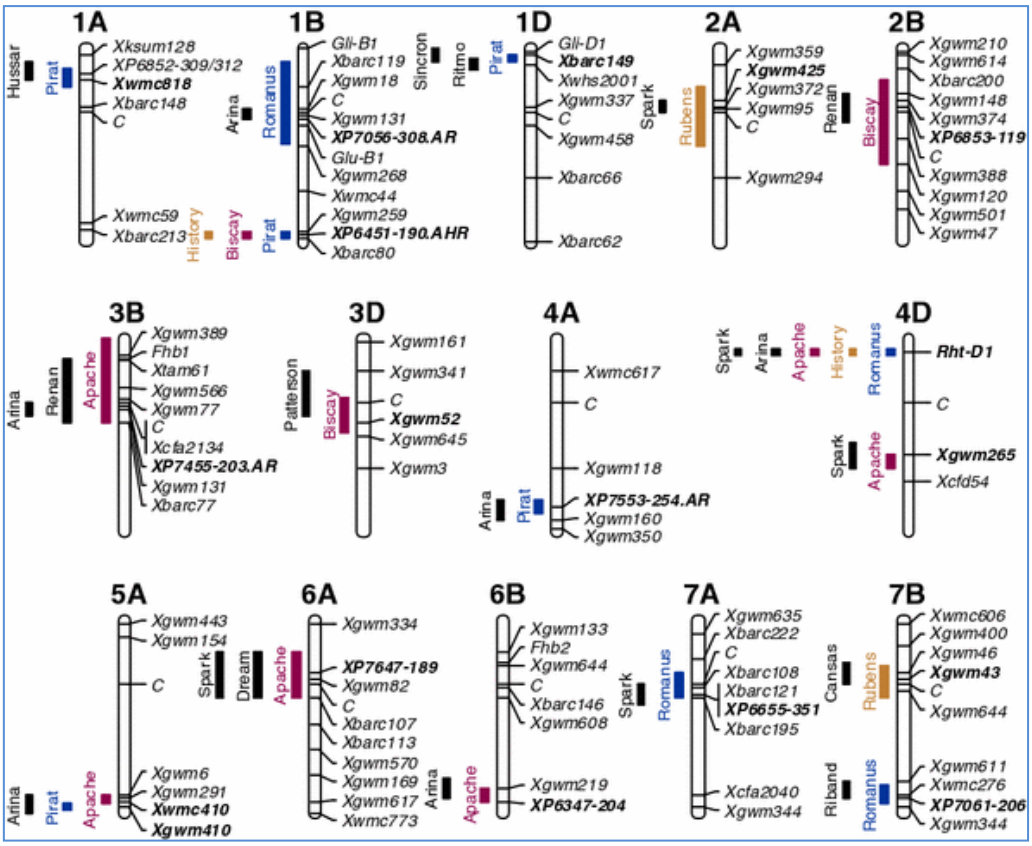

Figure 20 : Carte QTL avec les régions génomiques associées de la résistance à la fusariose dans les populations européennes de blé d'hiver. Les cultivars dans lesquels les QTLs ont été identifiés sont représentés par des couleurs différentes à côté de chaque chromosome où sont placés les marqueurs moléculaires.

les risques de contamination. En effet, l'élimination des débris végétaux limite l'apparition de l'inoculum primaire à proximité des cultures du blé tendre. De même, il est connu depuis longtemps que certains précédents culturaux augmentent les risques d'apparition des maladies. En particulier, un précédent maïs est extrêmement favorable au développement du FHB sur blé tendre.

3-7-Lutte génétique

La résistance à la fusariose de l'épi est de nature quantitative (QTLs) (**Figure 20**) (Bai and Shaner, 2004 ; Holzapfel et al., 2008). Cinq types de résistance à la fusariose de l'épi ont été décrits chez le blé (Miller et al., 1985 ; Trail, 2009 ; Mesterházy, 1995), mais seulement les trois premiers types sont utilisés par les sélectionneurs. Le type I correspond à la résistance à l'infection initiale des épillets (pénétration) ; le type II est la résistance à la propagation/extension du champignon entre les différents épillets ; le type III est la résistance à l'accumulation des mycotoxines ; le type IV est la résistance à l'infection des grains et le type V est la tolérance. Le choix variétal est un des leviers majeurs pour lutter contre les fusarioses de l'épi. Plus d'une centaine de QTLs ont été décrits dans la littérature (Buerstmayr et al., 2003a ; Yu et al., 2006), et environ 20 à 30 méta-QTLs de résistance à la fusariose de l'épi ont été cartographiés. Bien que la majorité de ces QTLs ait un effet mineur (inférieur à 10 %) sur l'incidence du FHB, quelques rares QTLs à effet majeur ont été identifiés : *Fhb1*, *Fhb2*, *Fhb4* et *Fhb5*. Ils peuvent entraîner une réduction des symptômes de 15 à 60 %. Le QTL *Fhb1*, localisé sur le chromosome 3B, est le plus important. Ce QTL, identifié chez la variété chinoise *Sumai*3, est le plus utilisé comme source de résistance à la fusariose de l'épi dans les programmes de sélection en Asie. Les effets délétères associés à l'introgression de ces QTL issus de variétés de blé de printemps asiatiques ont, jusqu'à aujourd'hui, considérablement limité leur utilisation dans des programmes de sélection en France et en Europe. Toutefois récemment, une nouvelle variété résistante au FHB a été développée par Syngenta, par l'introgression du QTL *fhb1* dans la variété française *Jaceo*. Cette variété est également résistante au froid et aux rouilles. D'autres sources de résistance utilisées en sélection ont été identifiées chez les variétés *Wangshuibai* (Ma et al., 2006), *Dream* (Schmolke et al., 2005), *Renan* (Gervais et al., 2003), *Frontana* (Mardi et al., 2006). En France, la variété résistante au FHB la plus cultivée est *Apache* (Holzapfel et al., 2008). Cependant, ces résistances deviennent inefficaces sous une forte pression parasitaire. De plus, les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces résistances sont encore largement inconnus. Si de nombreux programmes de recherche dans le monde ont comme objectifs de rechercher de nouvelles sources de résistance,

plus durables, il paraît intéressant sur cette maladie de diversifier les sources potentielles de résistance et d'explorer les possibilités d'exploiter des sources alternatives comme les gènes et facteurs de sensibilité.

IV- Problématique et objectifs de la thèse

L'Equipe Maladies des Céréales (MDC) a été créée en 2010. Elle est une des sept équipes de recherche de l'Unité de Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales (UMR INRA-UBP 1095 GDEC, Centre Inra d'Auvergne-Rhône-Alpes). MDC, aujourd'hui composée de 8 agents permanents (1 DR-CNRS, 1 CR-Inra, 1 MC-UBP, 1 MC-VAS, 2 IE-Inra, 2 TR-Inra). a comme objectif général l'identification de nouvelles sources de résistance à deux des principales maladies affectant les cultures de blé tendre : La **septoriose** (Septoria tritici Blotch ou STB), maladie foliaire présente sur l'ensemble du territoire Français, est régulièrement la plus dommageable pour la culture du blé tendre, avec des pertes pouvant atteindre 30-40 quintaux/ha dans des parcelles non traitées, et la **fusariose de l'épi** (Fusarium Head Blight ou FHB), affectant non seulement le rendement et la qualité des grains, mais également leur état sanitaire en raison de la production *in planta* de mycotoxines. Les projets développés par l'équipe MDC sont structurés autour de trois axes principaux :

I) Criblage des ressources génétiques et caractérisation des sources de résistance présentes dans les blés cultivés (STB & FHB) :

Le criblage des ressources génétiques afin d'identifier et de caractériser de nouvelles sources de résistance se fait par un criblage classique d'effecteurs et par la recherche d'allèles « résistants » de gènes de sensibilité.

II) Caractérisation des mécanismes moléculaires et physiologiques contrôlant la résistance (STB, FHB) :

Cet axe concerne l'analyse des étapes précoces de l'interaction blé tendre/*Fusarium graminearum* par la caractérisation d'effecteurs, des mécanismes de signalisation cellulaire et du remodelage de l'expression des gènes. Une analyse fonctionnelle des gènes de résistance comme *stb6* et *stb16q* et enfin l'analyse génétique et moléculaire de Renan, une source durable de résistance au FHB.

III) Identification des gènes de l'hôte nécessaires au développement de la maladie (gènes de sensibilité) :

Par criblage de collections de mutants, analyse fonctionnelle d'effecteurs de pathogénie et identification de leurs cibles végétales.

Mon projet de thèse s'inscrit clairement dans les axes II et III de l'équipe. Il s'articule autour de deux objectifs complémentaires :

1. Analyse du dialogue moléculaire s'établissant entre le blé tendre et *Fusarium graminearum*, et de ses conséquences chez le blé. L'objectif est de caractériser les bases moléculaires de la réponse et de l'adaptation d'un grain de blé tendre à l'infection par le FHB
2. Obtention d'une meilleure compréhension de la sensibilité du grain de blé tendre à la fusariose de l'épi, *via* la caractérisation des gènes, fonction et processus biologiques impactés par l'infection L'objectif est d'identifier les gènes (gènes de sensibilité) impliqués dans l'installation de *F. graminearum* dans les tissus de grains de blé tendre.

Pour cela, nous avons choisi de réaliser l'analyse comparée de deux séries d'échantillons biologiques correspondant à des épis de la variété sensible de blé tendre, infectés ou non, à différents stades de développement : de la floraison, stade auquel les épis ont été infectés ou non, jusqu'à des grains matures. Ces cinétiques d'infection (deux répétitions biologiques) ont été réalisées sur deux années consécutives en tunnel. Le protéome et le transcriptome de ces échantillons ont été successivement analysés. L'analyse transcriptomique a reposé sur l'utilisation d'une biopuce Nimblegene, comprenant >40 000 unigènes blé. Par choix, l'analyse n'a été réalisée que sur les stades qui nous paraissaient potentiellement informatifs : des points 50, 150, 250, 350 et 450°Cd. Ces différents points couvrent les stades importants non seulement du développement du grain, mais également de l'infection du grain par *F. graminearum.* L'analyse comparée a pris en compte non seulement la comparaison infecté/non infectée, mais également les différents stades phénologiques, ce qui a permis de faire ressortir la relation étroite existant entre infection et développement du grain. Ce travail a été rendu possible bien sur par une implication de l'ensemble de l'équipe MDC, mais également par une collaboration étroite avec l'équipe de G. Branlard (GDEC) et D. Biron (UMR LMGE, Clermont-Fd) pour la partie protéomique, et celle de JP Renou (IRHC, Angers) pour la partie Transcriptomique.

Le manuscrit est divisé cinq parties : l'introduction générale est suivie d'une synthèse bibliographique publiée dans la revue *Infection, Genetics and Evolution* sous le titre **« *Cross-talk in host-parasite associations : what do past and recent proteomics tell us* ?** » (Chapitre I). Cette revue est une présentation de l'état de l'art sur les différentes approches protéomiques utilisées pour déchiffrer et comprendre les interactions hôtes-agents pathogènes.

Les résultats originaux obtenus dans le cadre de ma Thèse sont présentés dans les Chapitres II et III sous la forme d'articles. Un premier article, publié dans la revue *European Journal of Plant Pathology* sous le titre « ***A proteomics survey on wheat susceptible to Fusarium Head blight during grain development*** » présentant l'analyse comparée du protéome de grains de blé tendre issus de la variété sensible Récital, à différents stades de développement et infectés ou non par *Fusarium graminearum*. Un second article présente quant à lui, l'essentiel des résultats obtenus via l'analyse du transcriptome des mêmes échantillons biologiques (Chapitre III). Cet article, intitulé « ***Transcriptome dynamics of a susceptible wheat upon Fusarium head blight reveals that molecular responses to Fusarium graminearum infection fits over the grain development processes***» a été soumis pour publication à la revue *Functional Integrative Genomics*.

Enfin, le manuscrit se termine par une discussion générale, qui reprend et discute les principaux résultats obtenus, et présente les perspectives possibles de ce travail.

CHAPITRE I : Etat de l'art sur les approches protéomiques et les interactions hôte-agent pathogène

Cet article de revue fait le bilan sur les récentes avancées obtenues par l'étude des interactions compatibles hôte animal/végétal-agent pathogène par utilisation des approches protéomiques. Après une introduction générale portant sur les interactions parasitaires dans le monde du vivant et sur l'intérêt que suscite la protéomique pour étudier ces interactions. La deuxième partie concerne l'évolution des approches protéomiques pendant ces dernières années avec les principales avancées des nouvelles méthodes tout en exposant les avantages et les limites de chaque approche. Ensuite, les principaux biais qui pourraient être introduits par ces différentes approches et comment les éviter. Cet article de revue a été publié dans le journal *Infection Genetics Evolution* sous le titre **« Cross-talk in host-parasite associations : what do past and recent proteomics approaches tell us ? »**.

La connaissance du mode de vie d'un agent pathogène est essentielle dans le choix des approches à utiliser pour étudier le dialogue moléculaire entre cet agent pathogène et son hôte. Les agents pathogènes se développant dans les espaces extracellulaires cellulaires, utilisent des stratégies parasitaires différentes que les agents pathogènes qui sont intracellulaires pour infecter la cellule-hôte. *Fusarium graminearum* est un champignon qui a à la fois un développement intra et extracellulaire. En effet, durant les premières phases infectieuses, le champignon se nourrit d'exsudats extracellulaires, mais n'induit pas encore de symptômes visibles (Guenther and Trail, 2005). Pendant cette phase, le champignon synthétise diverses molécules (protéases, protéines effectrices, mycotoxines…etc.). Dans un deuxième temps, les hyphes fongiques progressent dans les tissus vivants de l'hôte de façon radiale et induisent une colonisation intracellulaire et symptomatique des cellules de l'hôte.

En raison de l'intérêt qu'à susciter l'approche protéomique dans l'étude de la réponse de la plante aux différents types d'agents pathogènes : extra ou intracellulaire, nécrotrophe ou biotrophe. Nous avons fait le choix, pour répondre à nos objectifs, d'utiliser une approche protéomique en gel-2D.

Article de revue

Infection, Genetics and Evolution 33 (2015) 84–94

Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Review

Cross-talk in host–parasite associations: What do past and recent proteomics approaches tell us?

Chérif Chetouhi [a,b,1], Johan Panek [a,c,d,1], Ludovic Bonhomme [a,b], Hicham ElAlaoui [a,c,d], Catherine Texier [a,c,d], Thierry Langin [a,b], Charissa de Bekker [e], Serge Urbach [f], Edith Demettre [g], Dorothée Missé [h], Philippe Holzmuller [i], David P. Hughes [e], Andreas Zanzoni [j,k], Christine Brun [j,k,l], David G. Biron [a,c,d,⇑]

[a] Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II (UBP), Clermont Université, 34, Avenue Carnot, BP, 63006 Clermont-Ferrand Cedex, France
[b] INRA, UMR1095 Génétique Développement et Ecophysiologie des Céréales, 5 chemin Beaulieu, F-63039 Clermont-Ferrand Cedex 2, France
[c] Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE), CNRS: UMR6023, Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II, Campus des Cézeaux, 24, Avenue des Landais, BP 80026, 63 171 Aubière Cedex, France
[d] Université d'Auvergne – Clermont-Ferrand 1 (UDA), Clermont Université, 49, Boulevard François-Mitterrand, CS 60032, 63001 Clermont-Ferrand Cedex 1, France
[e] Department of Entomology and Department of Biology, Center for Infectious Disease Dynamics, Pennsylvania State University, University Park, State College, 16802 PA, United States
[f] Functional Proteomics Platform – FPP, UMR CNRS 5203, IGF, 141 rue de la Cardonille, F-34 094 Montpellier Cedex 5, France
[g] Functional Proteomics Platform – FPP, UMS CNRS 3426, IGF, 141 rue de la Cardonille, F-34 094 Montpellier Cedex 5, France
[h] Laboratoire MIVEGEC, UMR CNRS 5290/IRD 224/UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France
[i] UMR 15 CIRAD-INRA CMAEE "Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes", TA A-15/G Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France
[j] INSERM, UMR1090 TAGC, Marseille, France
[k] Aix-Marseille Université, UMR1090 TAGC, Marseille, France
[l] CNRS, Marseille, France

a r t i c l e i n f o

Article history:
Received 3 November 2014
Received in revised form 15 April 2015
Accepted 16 April 2015
Available online 22 April 2015

Keywords:
Host–parasite cross-talk
Parasitism
Parasite strategies
Host invasion
Quantitative proteomics

a b s t r a c t

A cross-talk in host–parasite associations begins when a host encounters a parasite. For many host–parasite relationships, this cross-talk has been taking place for hundreds of millions of years. The co-evolution of hosts and parasites, the familiar 'arms race' results in fascinating adaptations. Over the years, host–parasite interactions have been studied extensively from both the host and parasitic point of view. Proteomics studies have led to new insights into host–parasite cross-talk and suggest that the molecular strategies used by parasites attacking animals and plants share many similarities. Likewise, animals and plants use several common molecular tactics to counter parasite attacks. Based on proteomics surveys undertaken since the post-genomic era, a synthesis is presented on the molecular strategies used by intra- and extracellular parasites to invade and create the needed habitat for growth inside the host, as well as strategies used by hosts to counter these parasite attacks. Pitfalls in deciphering host–parasite cross-talk are also discussed. To conclude, helpful advice is given with regard to new directions that are needed to discover the generic and specific molecular strategies used by the host against parasite invasion as well as by the parasite to invade, survive, and grow inside their hosts, and to finally discover parasitic molecular signatures associated with their development.

Ó 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: 2DE, two-dimensional gel electrophoresis; APAF1, apoptotic protease-activating factor 1; CDWE, cell wall-degrading enzymes; CED4, cell death protein 4; ChIP seq, chromatin immunoprecipitation-sequencing; CoIP, co-immunoprecipitation; DIGE, fluorescence difference gel electrophoresis; HPRR, host pattern recognition receptors; HR, hypersensitive response; ICAT, isotope-coded affinity tag; iTRAQ, isobaric tag for relative and absolute quantitation; LRR, leucine-rich repeat; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MS, mass spectrometry; NBS, nucleotide-binding site; NIR, NOD-like receptors; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PR, pathogen-related; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SILAC, stable isotope labeling with amino acids in cell culture; TIR, Toll/interleukin-1 receptor; TLR, Toll like receptor; T3SS, type three secretion system; Y2H, yeast two hybrid.

⇑ Corresponding author at: Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement", UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. Tel.: +33 (0)4 73 40 74 58; fax: +33 (0)4 73 40 76 70.
E-mail addresses: david.biron1@univ-bpclermont.fr, dg.biron@hotmail.com (D.G. Biron).
[1] These authors contributed equally to the writing of this review.

http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.015
1567-1348/Ó 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 85
2. Similar cross-talk regardless of the kingdom of the host . . . 85
2.1. Parasite molecular strategies to invade and establish in host cells . . . 85
2.2. Host molecular strategies to counter parasite infection . . . 87
2.3. Non-immunological host defense . . . 88
3. Contribution of proteomics tools . . . 89
4. Pitfalls in cross-talk deciphering . . . 90
5. Guidelines to collect new key datasets . . . 91
6. Concluding remarks . . . 92
Acknowledgements . . . 92
References . . . 92

1. Introduction

Much of life on earth is parasitic and involves organisms from one domain of life exploiting another. To have access to the nutrients needed for their growth and their survival, parasites are required to reach an appropriate cellular niche (i.e. habitat) to create "metabolic modification zones" in one or more host compartments. Examples of such niches include parasitophorous vacuoles for *Leishmania sp.* in mammalian target cells, or mammalian blood and lymphoid organs for *Trypanosoma sp.*, and plant tumors induced by parasites including fungi, bacteria, nematodes, mites (small arthropods belonging to subclass Acari (also known as Acarina) and the class Arachnida), and insects (Agrios, 1997; Beyer et al., 2002; Rohfritsch, 2008). This parasite niche view implies that chemical changes, which occur dynamically over short periods of time due to host or parasite activity, are typical of the host–parasite interactions. For many host–parasite associations, this arms race has been in progress for several hundred millions of years (Schmid-Hempel, 2011). This has led to the selection of three parasitic cellular lifestyles: (i) extracellular, (ii) obligate and (iii) facultative intracellular. Crucial to a parasite's success are the evolved strategies to bypass host defenses, and/or allow the hijacking of host cellular functions (Elde and Malik, 2009). This raises the question whether there is a common ancient origin of the proximate mechanisms used by parasites to hijack host cellular functions. On the other hand, animal and plant defenses, acquired during the cross-talk against microbial and eukaryote parasite species since billions of years, could be the result of both divergent and/or convergent evolution.

In this review, we highlight and summarize molecular and evolutive discoveries on host–parasite cross-talk in plant and animal kingdoms, made over the past 15 years. For instance, present scientific knowledge shows that part of the molecular mechanisms that allow plants and animals to counter microbial and eurkaryote parasite infections exhibit impressive structural and strategic similarities (see Table 1 and Fig. 1). We highlight the proteins and biochemical pathways that have been detected by past and recent proteomics studies during those cross-talks between hosts (i.e. animal and plant kingdoms) and their parasites (from viruses to uni- and multi-cellular organisms). We also present several proteomics tools and strategies to study host–parasite cross-talk. Moreover, we discuss the pitfalls in these proteomics surveys. Finally, we argue for new avenues of research to reveal the molecular dialogue in both animal- and plant host–parasite associations. This will aid in the discovery of the general and specific molecular strategies used by the host against parasites, the parasitic strategies for invasion, survival, and growth in host tissues, and ultimately, the unraveling of parasite molecular signatures associated with parasite development in the host.

2. Similar cross-talk regardless of the kingdom of the host

Life began on our planet more than 3.5 billion years ago, and evolving single-cell organisms, archaea, bacteria and eukaryotes, have flourished ever since. About 600 million years ago, metazoans began to form, and this new species development in the Tree of Life was followed by a remarkable diversification of metazoan species. Where and when did the first host–parasite cross-talk occur during the divergent evolution in the three domains of life: Archaea, Bacteria and Eukaryota? The first species opting for a parasitic lifestyle probably originated from aquatic systems (e.g. viruses infecting Archaea and Bacteria) since a large part of the ancestral living organisms evolved in the ocean for thousand millions of years (Emilianowicz, 1952). Furthermore, over half of life on earth is parasitic and, as a life history strategy, parasitism has evolved more times than predation (Lafferty et al., 2006). A large part of the living organisms, at different times during the evolution of life and in each kingdom, have opted for and/or were under duress to invade other organisms. This invasion could be both within and across kingdoms as well as at the extra- and intra-cellular level. Next to that, parasitism has favored host speciation and the development of new host biological functions via an arms race that has been ongoing for several hundred million years (Karvonen and Seehausen, 2012; Schmid-Hempel, 2011).

Parasitic species have acquired tools through the selective pressure to bypass the host's defenses to win the molecular war and promote their life cycle. Many strategies to defeat host defense mechanisms were developed and selected: production of toxins and parasite effectors, adherence to host cell surfaces or to the extracellular matrix, invasion of host cells, evasion of adaptive immunity based upon antigenic variation, multiple types of secretion mechanisms (Type I, II, III and IV) that inject virulence factors into host cells, tight regulation of virulence factor production, iron sequestration, and host mimicry (Dean, 2011; Zhang et al., 2005). On the other hand, host species like plants and animals have acquired efficient molecular tools and immune mechanisms to discriminate between self and non-self, to recognize a diverse array of pathogen molecules expressed during the molecular cross-talk, to counter parasite invasion, and to kill or tolerate invading pathogens (Burnet, 1961). Here, we will summarize parasite (see Section 2.1) and host (see Section 2.2) molecular strategies shaped through host–parasite co-evolution in plant and animal kingdoms for many hundred million years.

2.1. Parasite molecular strategies to invade and establish in host cells

Parasitic microorganisms and parasitic eukaryotes are notably characterized by specific arrangements of key molecules called microbial- or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs or

Table 1
Similarities and differences in molecular strategies used by plants, and animals (invertebrates and vertebrates) to counter parasite invasions.

Taxonomic group	Innate immunity (nonspecific) Ancient (plants, insects, vertebrates)/Billions of years old, Perfect self–nonself discrimination, Recognition: PAMPs, Time to onset: Immediate; Memory: No			Adaptive immunity (specific) Modern (jawed vertebrates)/400 million years old, Imperfect self–nonself discrimination (ex.: allergy), Recognition: Specific structure of parasite molecules, Time to onset: Delayed; Memory: Yes		
	Immune mechanisms					
	Recognition receptors	Antimicrobial peptides	Phagocytose	Antibodies	Lymphocyte cells	Protective enzymes induced by the infection
Plants	(+)	(+)	(−)	(−)	(−)	(+)
Invertebrates						
Prorifera (sponges)	(+)	(+)	(+)	(−)	(−)	?
Annelids (earthworms)	(+)	(+)	(+)	(−)	(−)	?
Arthropods (insects)	(+)	(+)	(+)	(−)	(−)	(+)
Vertebrates						
Fish	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Amphibia	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Reptiles	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Birds	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Mammals	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+) Present.
(−) Absent.
(?) Not identified.

PAMPs), such as flagellin6. MAMPs and PAMPs include, for instance, lipopolysaccharide (LPS), lipoproteins, peptidoglycan, lipoarabinomannan, oligosaccharides eubacterial flagellin and unmethylated bacterial DNA fragments (Aderem and Ulevitch, 2000; DeYoung and Innes, 2006; Girardin et al., 2002; Medzhitov and Janeway, 2002). MAMPs and PAMPs are vital structures of parasite species that have altered little over evolutionary time-spans. These molecules have distinct nucleic acid motifs that are unique to parasite species (Aderem and Ulevitch, 2000; Medzhitov and Janeway, 2002; Teixeira et al., 2002). Moreover, unifying features of MAMPs and PAMPs are their highly conserved structures, their functional importance for and their presence in various parasite species, and their absence in cells of potential host organisms (McGuinness et al., 2003; Teixeira et al., 2002; Underhill and Ozinsky, 2002). The high conservation of sequences and molecular structure of MAMPs and PAMPs could be explained by the functional similarity of host molecules that recognize parasite molecules. For instance, MAMPs and PAMPs are recognized by host pattern recognition receptors (HPRRs). These HPRRs are expressed on both the surface (e.g. Toll-like receptor (TLR) in animals and receptor kinases in plants) and the cytoplasm of host cells (e.g. nucleotide-binding oligomerization domain (Nod-like) receptors in animals, and nucleotide-binding site and leucine-rich repeat (NBS-LRR) domains of plant receptors) (Fig. 1).

The most common mechanisms shared by extra- and intra-cellular parasites at the beginning of the infection process of an animal or a plant are the strategies to recognize and adhere to host cells. An example is the protein OmpA of *Dickeya dadantii* (ex-*Erwinia chrysanthemi*), an extracellular parasite of plants that causes soft rot. The OmpA protein is involved in the recognition and adhesion process to plant cells (Babujee et al., 2007). A second key step for extra- and intra-cellular parasites is the secretion of molecules including proteins and peptides (ex.: MAMPs, PAMPs) to favor the invasion of host cells. Parasites will secrete effective molecules (i.e. effectors) or toxins in the extracellular environment or in the cytoplasm of host cells to promote a compatible interaction with the host. This will allow the development and multiplication of extra-cellular parasites or the penetration of intra-cellular parasites in the host cell after the degradation of the cell walls by using cell wall-degrading enzymes (CWDEs) (Mehta et al., 2008a; Zhang et al., 2005) or after a receptor-assisted entry to create a parasitophorous vesicle (e.g. Leishmania) (Antoine et al., 1998) (Fig. 1). Many studies have been performed to study the CWDEs used by parasites attacking animals since they are relatively easy to obtain and correspond to economic interests.

For parasites attacking plants, the CWDEs are generally secreted during short periods of time in small quantities. This results in the necessity to follow the kinetics of infection in many host samples during a short period of infection to be able to extract enough proteins to detect the effectors. A study of the exoproteome of a water mold, *Phytophtora ramorum*, has demonstrated that it produces CWDEs (namely six putative mucins, five putative glycoside hydrolases, two transglutaminases, one annexin-like protein and one Kazal-type protease inhibitor) to invade oak cells (Meijer et al., 2006). For the enteroparasite, *Escherichia coli*, a shotgun study on its secreted proteins detected seven effective proteins known to be carried by the T3SS (Type III secretion system) including the Tir protein that induces the development of actin pedestals in infected host cells (Roe et al., 2007). Actin pedestals are formed in host infected cells, which push the host membrane to lengths up to 10 μm away from the host cell surface. The role of pedestals in pathogenesis is not completely understood. To ensure their need to find nutrients (e.g. amino acids, sugar, and metabolites) without being detected by the host immune system, parasites use antigenic variation or mimicry strategies (Higgins and Carrington, 2014). Furthermore, they have to control the cellular cycle of their hosts (e.g. root-knot nematodes) and, in the case of intracellular parasites, the cellular traffic (Hewezi and Baum, 2013).

Parasite virulence is defined as the damage done to the host during host–parasite interaction, and can be measured, for example, as premature host death or decreased fecundity. Parasite virulence is a key pressure in the arms race taking place since several hundred millions of years in host–parasite associations. Therefore, as a response to parasite virulence, the immune system of the phylum vertebrata has evolved to express nonspecific immune strategies (innate immunity) and specific immune strategies (adaptive immunity) to counter invasion and infection by uni- and multi-cellular parasite species. The birth of the adaptive immune system is believed to have occurred when an Ig superfamily (Igsf) gene of the variable (V) type was invaded by a transposable element containing RAG1 and RAG2 genes (Fugmann, 2010).

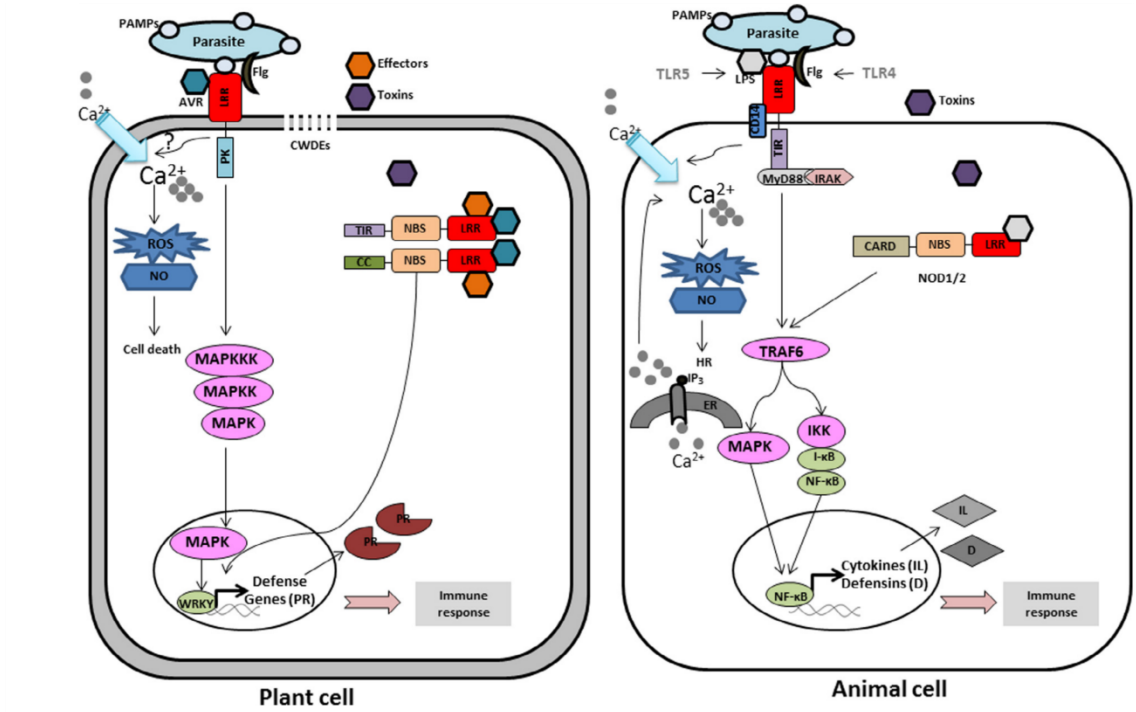

Fig. 1. The current known cross-talk taking place when parasites invade and establish in animal or in plant cells. leucine rich repeat (LRR) associated to protein kinase (PK) in plants and LRR-TIR (TLR 4 and TLR 5) in animals are examples of the transmembrane receptors for the recognition of the pathogen associated molecular patterns (PAMPS), lipopolysaccharides (LPS), flagellin (Flg), effectors or avirulence (Avr) signals. In animals, the recognition of LPS, the complex combined LRR proteins, CD14 and TLR4 (containing TIR cytoplasmic domain) is formed. TLR5 is involved for flagellin recognition. Subsequently, TLRs interact via adapter proteins like (MyD88 (myeloid differentiation factor) or with the serine/threonine kinases IRAK that share homology with the kinase domains of receptor-like kinases from plants. A series of protein kinases, including mitogen-activated protein kinases (MAPKs) mediate activation of transcription factors (NF-κB) and the transcription of genes encoded proteins involved in immune response such as Interleukin (IL) and defensin (D). In plants, several LRR proteins present similarity with animal receptors (CD14 and TLR) are involved in parasite defense activation. Avirulence (Avr) proteins are recognized by LRR proteins with a high-affinity binding site which actives the MAPK. In addition, the translocation of PAMPs-activated plant MAPKs into nucleus has been showed. In the nucleus, these MAPKs activate the Wrky transcription factors which induce gene expression of pathogenesis related proteins (PR). Intracellular recognition of LPS in animals is mediated by the NBS-LRR receptors NOD1/2 while intracellular recognition in plants has not been observed. In plants, intracellular R genes (TIR-NBS-LRR or CC-NBS-LRR) recognized Avr proteins which confer pathogen race/plant cultivar-specific immunity to several parasites (virus, bacteria, oomycetes and fungal). Parasite recognition induces changes in calcium level (Ca^{+2}) in the cytoplasm. This calcium is involved in transduction signal, in the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric acids (NO). In plants, the elevated cytoplasmic level of Ca^{+2} is due to influx of calcium from extracellular space. However, in animals this calcium is mostly due to inositol-3-phosphate (IP_3) receptor mediated release of calcium from endoplasmic reticulum (ER) internal stores. ROS/NO are essential factors for the activation of innate immune response in animals by cell death induction and by hypersensitive reaction (HR) in plants.

2.2. Host molecular strategies to counter parasite infection

One of the main threats for living organisms in the biosphere is the invasion and infection by a parasite. Therefore, the availability of an efficient immune system (i.e. afferent (sensing) and efferent (effectors) molecular mechanisms), which permits recognition and killing of the invading parasite, is of high adaptive value. Not surprisingly, the immune system of almost all uni- and multi-cellular organism is extremely complex. The most impressive example is found in higher vertebrates (ex.: mammals). Here, the immune defense consists of two main parts: an innate immediate response and an adaptive response that is delayed but highly specific and long lasting (Boehm, 2012; Charley et al., 2006; Lepargneur and Abbal, 2012). All living organisms except vertebrates (i.e. unicellular, invertebrates, plants, and fungi) rely exclusively on innate immunity to counter parasite invasion and infection. Interestingly, many features of the innate system are highly similar among these living organisms, suggesting that they have a common origin and have subsequently been conserved.

At the beginning of the attack by extra- or intra-cellular parasites, the first essential step for animals or plants is the detection of parasite molecules (ex.: MAMPs, PAMPs) via its HPPRs (host pattern recognition receptors) on both the surface and in the cytoplasm. Animal TLRs (Toll-like receptors) and RLKs (plant receptors like kinases) used to detect MAMPs and PAMPs are similar in overall structure in that all are transmembrane receptors that have C-terminal LRRs (leucine-rich repeat domains). However, the cytoplasmic domains (i.e. adapters) are not conserved: TIR (Toll/Interleukin-1 receptor/resistance motif) domain for animals and Kinase domain for plants (see Fig. 1). TIR domain is an ancient protein fold that has been associated with disease resistance since a time before the divergence of plants and animals. A total of five cytoplasmic adapter proteins are presently known to be available in mammals to carry signals from the TLRs into the cytoplasm: MyD88, MAL (or Tirap), TRIF (or Ticam-1), MyD88-4, and MyD88-5. After many hundred millions years of arms race between hosts and parasites, the same biochemical modules (LRR) coupled with a proteinic intracellular domain were selected for recognition of MAMPs and PAMPs in the animal and plant kingdoms. The absence of sequence similarity of LRR modules might further suggest that both proteins arose independently as a result of convergent evolution. This hypothesis is corroborated by the fact that both receptors apparently recognize different structures of flagellin (Donnelly and Steiner, 2002; Felix et al., 1999).

A structural (but not conceptual) difference between FLS2 and TLR5 concerns the intracellular-signaling domain of the receptor proteins (Fig. 1). FLS2 harbors a cytoplasmic kinase domain, of which phosphorylating activity is crucial to flagellin sensitivity (Gómez-Gómez and Boller, 2000; Gómez-Gómez et al., 2001), while TLR5 carries an intracellular TIR domain that is indirectly associated with the IL-1-receptor-associated kinase (IRAK) via the adapter protein MyD88 (Fig. 1). Moreover, plants have a family of RLKs. Although the overall structure of the RLKs signaling pathway seems similar to that of the HPRR signaling pathways in animals, there is no conservation of any individual components and the similarity most likely reflects the ubiquity of eukaryotic MAPK (mitogen-associated protein kinase) stress-responses to environmental signals.

When parasite effectors are released in the host cytoplasm, host intracellular receptors must act to counter the parasite invasion. Plant NBS-LRR proteins confer resistance to diverse parasites, including fungi, oomycetes, bacteria, viruses and insects (DeYoung and Innes, 2006). NBS and LRR domains are also present in NOD-like immunoreceptors (NIRs), which are involved in PAMPs' induction of innate immunity responses in animals, and in the animal apoptotic protease-activating factor 1 (APAF1) and cell death protein 4 (CED4). Many plant NBS-LRR proteins also contain an N-terminal TIR (Toll, interleukin-1 receptor, resistance protein) domain related to the intracellular signaling domain of animal Toll-like receptors. The presence of TIR domains in conifers and mosses indicate that TIR may represent an ancestral resistance gene family with shared functionality with their mammalian and insect homologs with regard to innate immunity (Girardin et al., 2002; Meyers et al., 1999). Although the presence of the TIR domain in some NBS-LRR plant disease-resistance proteins suggests a common evolutionary origin of plant and animal PRRs, the downstream signaling pathways have nothing in common. The overall conservation of the tripartite structure of animal CLR and plant NBS-LRR proteins also suggests evolutionary conservation, but these proteins are not present in invertebrates, suggesting independent evolutionary origins in plants and animals.

After the recognition of attack by the parasite(s), the host needs to set a group of response mechanisms in motion especially via the innate or adaptive immune systems (Fig. 1). For instance, the plant basal defense, which is the first defense response, triggers a generic mechanism consisting of plant cell wall thickening, papilla deposition, apoplast acidification, signal transduction and transcription of defense genes (Dangl and Jones, 2001). Superimposed on the basal defense, some plant varieties express a hypersensitive response (HR) to parasite(s) and subsequent programmed cell death. The function of the HR is to contain parasite(s), and it is typified by various biochemical perturbations such as changes in ion fluxes, lipid hyperperoxidation, protein phosphorylation, nitric oxide generation and a burst of reactive oxygen species and antimicrobial compounds. Plant cells produce key pathogen-related (PR) proteins involved in the basal immune defense. To date, 17 PR protein families are known. These defense proteins show a diversity of biological activity (e.g. anti-fungal for PR1, protease inhibitor for PR2) and multiple sites of action (e.g. fungal cell wall for PR2, PR3 and PR4; cell membrane for PR5). Animal and plant cells also use non-specific defense mechanisms against parasite infections, such as reactive oxygen and nitrogen species (ROS-RNS), and other redox active molecules (Table 1 and Fig. 1).

Furthermore, one topic that has received a lot of attention is MAPK signaling. MAPK pathways are ubiquitous signal transduction components in eukaryotes that are activated by diverse stimuli such as growth factors, cytokines, neurotransmitters and various cellular stresses, and transfer signals from extracellular receptors to cellular responses (Dóczi et al., 2012). A MAPK cascade typically consists of a modular complex consisting of a MAPK kinase kinase (MAPKKK), which phosphorylates a MAPK kinase (MAPKK), which phosphorylates a MAPK (Pitzschke et al., 2009). These pathways regulate the activity of various substrates, such as transcription factors and protein kinases, and have been demonstrated in the nematode model *Caenorhabditis elegans* to constitute a functional pathway in an intestinal innate immunity system that protects worms from pathogen infection (Sakaguchi et al., 2004).

After around three decades of proteomics surveys on deciphering of cross-talk in host–parasite associations, actual knowledge strongly suggest that plant and animal hosts use similar strategies and biochemical pathways to counter parasite attacks (Biron et al., 2011; Keen et al., 2000; Mehta et al., 2008a; Zhang et al., 2005). Thus, although the overall structure of parasite-associated molecule signaling pathways in plants and animals is similar (see Fig. 1) in that both involve (i) transmembrane LRR receptors, (ii) MAPK mitogen-associated protein kinase (MAPK) signaling cascades, (iii) production of active oxygen and nitrogen species, (iv) calcium fluxes, (v) activation of transcription factors and (vi) the inducible expression of immune effectors, there is no proof that this similarity reflects evolutionary conservation of an ancient host signaling pathway strategy to counter parasite invasion and infection. Indeed, this apparent evolutionary conservation seems to be equally well explained as being a reflection of the overall conservation of the components of canonical MAPK signaling cascades that form a bridge between diverse signal sensors and/or receptors and target genes in eukaryotes (Ausubel, 2005; Jones and Dangl, 2006; Nürnberger et al., 2004). These MAPK signaling pathways are present in plants, invertebrates and vertebrates, and presumably appeared early during the divergent evolution of ancestral unicellular species (i.e. before the emergence of metazoans) (Ausubel, 2005; Jones and Dangl, 2006; Nürnberger et al., 2004).

Significant differences remain between molecular mechanisms and strategies used by plants and animals for the nonself recognition and for the killing of nonself. For example, specialized cell types (macrophages, neutrophils, and dendritic cells), which as parts of a circulatory blood system are the key players of the animal immune system, are not found in plants (Jones and Dangl, 2006; Nürnberger and Brunner, 2002) Moreover, vertebrates have specialized cells issued from the adaptive immune system: B and T lymphocytes. These adaptive cells have B and T lymphocyte receptors respectively, which are clonal and rearranged during development following somatic recombinations, and they are involved in immunological memory.

2.3. Non-immunological host defense

Arms races in host–parasite associations have favored intensive cross-talk between organisms resulting in the selection of host defense mechanisms. One important host defense in the animal kingdom against parasites is the immune system. However, there are also several mechanisms of defense that have evolved in invertebrates about one hundred million years ago. These invertebrate defense mechanisms fall outside of what is traditionally considered to be the immune system. These non-immunological defenses are for instance selected host behaviors: (i) behavioral thermoregulation, (ii) behavioral avoidance, (iii) self-medication, (iv) anorexia, and (v) social immune mechanisms (Parker et al., 2011). To our knowledge, no studies were done to decipher cross-talks involved in these non-immunological defenses. These studies could help to identify new host and parasite molecules as well as biochemical pathways involved in the dynamic host–parasite interactions when a parasite tries to invade, infect, and establish in an invertebrate species. Moreover, these types of studies could be done for many vertebrate species, including humans. Furthermore, the deciphering of the cross-talk involved in host cell death programs (apoptosis or necrosis) used by animals and plants to counter

parasite invasion and infection is another interesting research avenue to improve our understanding of the dynamics of host–parasite interactions, as well as to discover new molecules and new biochemical – and signaling pathways involved in the arms race between a host and a parasite.

3. Contribution of proteomics tools

The genome represents the first step in the complexity of biological functions involved in any molecular cross-talk between host and parasites. Transcriptomic studies using RNAseq and microarrays methods have been conducted to provide the foundation of understanding the host–parasite molecular cross-talk (Mei et al., 2014; Pombo et al., 2014; Rudd et al., 2015). Although transcriptomics allows an exhaustive view of gene regulations that can specifically respond to a parasitic infection (virus, bacteria, fungi, etc.), it does not provide a full understanding of the whole range of cellular regulations. Firstly because gene expression is widely regulated post transcriptionally and also because proteins which are responsible for the cell biological functions are expressed in a highly dynamic process and are interacting with high specificity (Dhingra et al., 2005). Understanding protein abundance changes, their interactions and their localizations is thus of particular interest and a promising way to go further in deciphering host–parasite interactions. Proteomics includes the systematic study of all the proteins expressed by a genome in cells or tissues upon specific physiological states (Coiras et al., 2008). Currently, proteomics has established as an indispensable technology to interpret the genomic information and has been successfully applied in protein identification, protein quantification, post translational modifications (PTMs) and protein interactions (Fig. 2) (Aebersold and Mann, 2003). The knowledge about host–parasite interaction has evolved over the time as the proteomic methods and techniques have improved. In most proteomics studies, using both old and recent tools, many similar host proteins were found to be differentially produced during the parasite infection. These proteins are involved in many biochemical pathways to detect, to prevent, and to counter parasite attacks. For instance, several proteins involved in immune defenses are similar in animal and plant kingdoms.

In plants, the molecular cross-talk between host and pathogen in the compatible (disease development after infection) and incompatible (no disease after infection) interactions implicate hundreds of proteins involved both in the early and the late stages of the interaction. Thus, several pathogenesis related proteins (PR) such as chitinases, glucanases, thaumatin like protein, GST, peroxidase, heat shock proteins (HSP) were profiled from the early proteomic experiments interesting to plant/fungi (Kim et al., 2003; Rep et al., 2002), plant/bacteria (Jones et al., 2004; Wan et al., 2005), plant/nematode (Mehta et al., 2008b) and plants/Oomycete (Colditz et al., 2004) interactions by using the in gel-based quantification approaches (Fig. 2). These proteins are highly expressed or induced upon pathogen infection and easily detectable by the gel-based approaches. In animals, several proteins related to immune responses such as proteases and protease inhibitors were identified in *Drosophila* (Levy et al., 2004; Verleyen et al., 2006). Macroglobulin, transglutaminase cyclophilin, and vinculin were identified in hemocyte cells after bacterial infection (Herbinière et al., 2008) as well as the appearance of an intelectin-2 in response to nematode infection in mouse (Pemberton et al., 2004). A proteomics study on the hemolymph of *Drosophila* larvae treated with lysis cells of many pathogenic bacteria (*Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenza*, and *Streptococcus pyogenes*) revealed an induction of proteins involved in the detoxification of host cells including increasing amount of thioredoxin peroxydase 1 and 3, gluthatione transferase and thioredoxin reductase (de Morais Guedes et al., 2005). Considering the few amounts of parasite proteins in the host tissues, most proteomics studies have focused on unraveling changes in the host proteome. However, some pivotal pathogen proteins were identified including the flagellin of the *Burkholderia cenocepacia* bacteria increasing during murine infection when the alkyl hydroperoxide reductase subunit C protein disappears (Chung and Speert, 2007). Some constitutive and highly abundant proteins of the pathogens (actin, tubulin, ribosomal proteins) have also been detected as a way to confirm the presence of the pathogen, especially when symptoms are lacking (during the early stages of the molecular dialogue for instance), but in any case they do not provide sufficient information to understand the infectious strategies implemented by parasites (searching for effectors proteins). Deciphering pathogen proteomic adjustments usually requires the isolation of the pathogen before any proteomics approach.

Searching to improve the access to the parasite proteins has been a challenge for studying a number of host–parasite interactions. Successful developments have allowed the identification of different proteins involved in primary and secondary metabolisms and putatively connected to the infectious processes. These proteins displaying usually enzymatic activity, were mostly localized in the cytoplasm and harbored chemical properties that are compatible with further proteomics analyses. Unfortunately, scarce proteins with fundamental roles in the cell regulations such as transcription factors and protein kinases are poorly identified using in-gel quantification approaches. Most of the time, they represent a very small proportion of the whole set of detectable proteins and are submitted to slight changes that do not fit with such proteomics approaches. Improved methods were then developed to increase the sensitivity and to identify such low abundant proteins (e.g. 2D-DIGE; Ünlü et al., 1997; Coiras et al., 2008). This opened new avenues in the identification of several compounds involved in signaling pathways (MAPK, transcription factors such as Wrky and NAC, hormones components such as ABA-related pathways and auxin-related pathways, etc.) (Amey et al., 2008; Schenkluhn et al., 2010).

In addition, many small proteins involved in plants/pathogens cross-talk such as inhibitors of xylanases (Dornez et al., 2010) and cytoplasmic receptors (LRR-NBS) (Yao et al., 2012) were identified from such 2D-DIGE analyses. In animals, several components involved in the gene remodeling were also identified upon pathogen infection. The transcription NF-κB involved in the regulation of apoptosis as well as in innate and adaptive immunity responses were highlighted by such methods (Niederberger and Geisslinger, 2013). Although gel-based quantification methods have substantially increased our knowledge of the molecular determinism of host–parasite interaction, many technical limitations have made the development of quantitative mass spectrometry a new way to dig into the molecular determinism of host–parasite interactions. Mass spectrometry has become a promising strategy in the quantitative proteomics toolbox (Otto et al., 2014). At present only few studies on host–parasite cross-talk have adopted label-free approaches (Dreisbach et al., 2011). The recent metaproteomics approach, developed thanks to improvements in protein and peptide separation efficiencies and mass spectrometry, offers the possibility to study the collective proteome of the host and the pathogen (Gunnaiah et al., 2012), and of the microbial communities to further improve the understanding of the microbes' dynamics inside and around their potential hosts (Kolmeder and de Vos, 2014). Techniques using the labeling of the host or the pathogen proteins before inoculation in order to follow the host–parasite cross-talk have been developed (e.g. SILAC method) in viruses/mammalian interactions (Barrero et al., 2013;

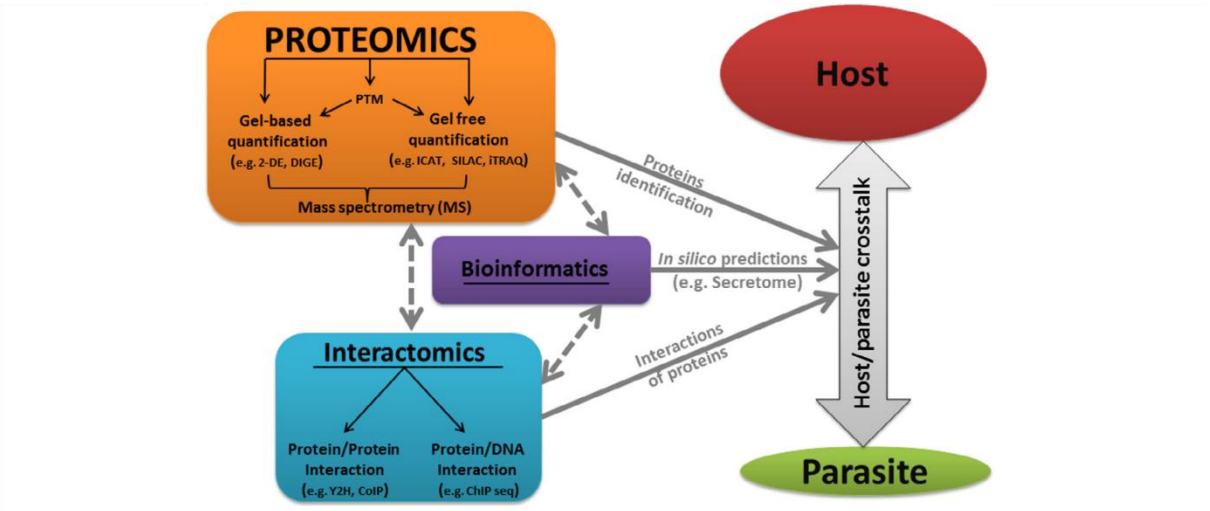

Fig. 2. Schematic representation of the principal workflows used in proteomics and interactomics for host–parasite cross-talk deciphering. The proteomics approaches concern protein identification, differential analysis, protein quantification by using the gel-based quantification methods (e.g. 2D, DIGE) and gel free methods (e.g. SILAC, iTRAQ) and post translational modifications (PTM). Interactomics concern the study of protein–protein interaction (e.g. Y2H, CoIP), protein–DNA interaction (ChIP) and protein/small molecules interaction. Bioinformatics tools are used for Omics data mining and *in silico* predictions (e.g. PTM, secretome, interactome).

Berard et al., 2012) and in the case of human-parasitic fungus interactions (Reales-Calderón et al., 2013). Three available label combinations can be used to compare up to 3 treatments in a single MS/MS analysis. This is the most common experimental design for a SILAC experiment, but variations in the amino acids used can permit comparison of more samples (e.g. 5 treatments) (Molina et al., 2009).

Currently, only few SILAC studies have focused on eukaryotic parasites (e.g. trypanosomatids), but they have proven their relevance in assessing the dynamic of the *Trypanosoma brucei* proteome during the parasite life cycle (i.e. between the bloodstream stage in the mammalian host and the procyclic stage in the tsetse fly) (Urbaniak et al., 2012) as well as in exploring the molecular mechanisms underlying drug resistance in *Leishmania* (Brotherton et al., 2013) and human fibroblast cells response to *Anncaliia algerae* (Panek et al., 2014). Other MS-based quantitative approaches were developed to study the molecular cross-talk *in vitro* (Cultured cells and parasite) (iTRAQ: Isobaric tags for relative and absolute quantification). One advantage of iTRAQ compared to SILAC is that it can be used on any type of cells or tissues since it does not rely on *in vivo* isotope incorporation (Hughes and Krijgsveld, 2012). The use of these labeling methods to decipher host–parasite interactions has resulted in new ways to improve the diagnosis and control of important zoonoses. For instance, the use of iTRAQ technology allowed for the detection of specific biomarkers for *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) and *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's disease in cattle and Crohn's disease in humans) (Lamont et al., 2014). With the same methodology, Cui et al. (2013) provided valuable data on the molecular mechanisms defining host-*Echinococcus granulosus* interactions. This increased the potential for characterizing new therapeutic targets and vaccine candidates and will speed up the development of protein probes for selective and accurate diagnosis of hydatid disease (Cui et al., 2013). In the case of *Campylobacter jejuni*, the predominant agent causing sheep abortion and human gastroenteritis, proteomics analysis of immunodominant antigens provided a new basis for vaccine development (Wu et al., 2014). The iTRAQ method was also used in plants to measure the proteomic changes between a resistant genotype and susceptible genotype of tomato at different time points after *Pseudomonas syringae* (bacteria) infection. Among 2369 proteins, identified, 447 demonstrated significant changes in expression following pathogen inoculation (Parker et al., 2013).

Another level of regulations between the host and the pathogen concerns the post-translational modifications (PTM) (phosphorylation, glycosylation, acetylation and ubiquitination, sulfation, sumoylation) (Fig. 2). These modifications play an important role in the control of the activity, localization and stability of proteins, and their interactions with other macromolecules (Gstaiger and Aebersold, 2009). Functional genomics and transcriptome analysis cannot provide experimental evidence for protein modifications other than protein sequence information for the *in silico* prediction of candidate sites of modification (Gstaiger and Aebersold, 2009). PTM of proteins can occur very rapidly after infection. The treatment of cells by microbes elicitors induced phosphorylation changes (Dietrich et al., 1990; Felix et al., 1991; Lecourieux-Ouaked et al., 2000; Viard et al., 1994). Most of these proteins differentially phosphorylated are proteins involved in the signal transduction pathways (e.g. LRR-containing proteins, MAP kinase and transcription factors). During this last decade, several PTM of hosts or pathogens proteins were identified using mass spectrometry tools. In host/bacteria interactions, the bacteria can affect the phosphoproteome either directly through the action of bacterial effectors, and/or indirectly through downstream effects of host proteins modified by the effectors (Grishin et al., 2015; Rayapuram et al., 2014). In the *Magnaporthe oryzae*/rice pathosystem, phosphoproteome analysis revealed 53 phosphoproteins belonging to 12 functional categories in resistant or susceptible background (Li et al., 2015). The changes in the plasma membrane protein phosphorylation were investigated in *Arabidopsis* cells after their treatment with the bacterial elicitor flagellin. Two phosphorylation sites that are strongly induced after the treatment seem required for NADPH oxidase activation (Nühse et al., 2007).

4. Pitfalls in cross-talk deciphering

Many cell biologists, microbiologists, and parasitologists used proteomics surveys as a mean to explain cross-talk in

host–parasite associations. Early "parasito-proteomics" studies have provided a wealth of information about the cross-talk during the attack of a host by a parasite and the hijacking of its cellular functions (Biron et al., 2005). Unfortunately, to date, due to very low dynamic ranges, most of these proteomics data reveal only the host response to parasitism, i.e. host molecules and host biochemical pathways involved in host–parasite cross-talk (Biron et al., 2013, 2011; Mehta et al., 2008a; Patramool et al., 2012). Consequently, proteomics studies and related tools so far have not revealed the complete host/parasite (i.e. proteins, peptides, and metabolites) expressed during the invasion of host compartments (i.e. cells and tissues) and the hijacking of host cellular functions that ensure parasite growth to increase the likelihood of completing its life cycle. In many associations, the main difficulty is the organism size. Since parasites are often smaller than their hosts it can be difficult to obtain enough parasite-derived proteins that make possible their detection and profiling during host–parasite cross-talk. However, thanks to the improved methodologies, massive amount of data have been produced. Today, their interpretation turns into a labor-intensive job. All identified proteins can interact with each other, or interact with proteins non-identified by proteomic approaches cited above. The information about the dynamics of these interactions is required for an in-depth deciphering of the molecular cross-talk.

Interactomics is an emerging discipline in the proteomics field (Fig. 2), which aims at identifying all the amenable molecular interactions in a given cell or other biological environment (apoplast, extracellular medium, blood, xylem, etc.). Any identified protein putatively encounters dynamic interactions with other molecules that could control a range of specific functions. Hence, a candidate protein could interact with others proteins (Fig. 2), or with DNA and RNA sequences (Fig. 2) to achieve a particular cellular role. Besides the bioinformatics methods that could predict many interactions of a candidate protein based on several criteria (Amino acids sequence of protein, 3D structure of the protein, sub-cellular localization, biochemical characteristics of the protein, etc.). More technical means are now available to validate the predicted interaction. Protein–protein interactions have been mainly performed using yeast two-hybrid screening (Y2H), tandem affinity purification (TAP) and coimmunoprecipitation (co-IP). For instance, a nice example is the identification of the CaHIR1 protein in the plant hypersensitive response (HR) and in the induction of cell death to *Xanthomonas* filamentous (Choi and Hwang, 2011). By using additional interactomics studies based on the Y2H and CoIP experiments, the authors revealed that small filamentous hemagglutinin-like protein (Fha1) of *Xanthomonas sp* interacts with CaHIR1 protein *in planta*. This protein acts as a virulence factor in host plants (Choi et al., 2013). Such techniques have also allowed the evidence of the gene for gene interaction in plants showing that a direct interaction of a plant resistant gene and parasite avirulence gene product confers resistance to several pathogens (Cesari et al., 2013; Deslandes et al., 2003; Dodds et al., 2006; Jia et al., 2000). In addition, several interactions between pathogen effectors and animal genes were observed (Blasche et al., 2013; Yang et al., 2013).

To analyze the interaction between a candidate protein and the DNA sequence, ChIP-sequencing, also known as ChIP-Seq is the mostly used method. ChIP-seq combines chromatin immunoprecipitation (ChIP) with extensive parallel DNA sequencing to identify the binding sites of DNA-associated proteins. It can be used to precisely map global binding sites for any protein of interest. These techniques could be used to study the involvement of proteins secreted and injected by the pathogens in host cells in order to regulate the infected host. These secreted proteins could be involved in hijacking of the host cells by remodeling of the host genome expression. Noteworthy, interactomics of host–parasite association is not restricted to study molecular interactions involving both host and parasite components. The study of host-specific interactomics during the infection process (during the host-pathogen interaction), could provide valuable information about the host genome regulation (Berghout et al., 2013). Likewise, focusing on the pathogen side could provide useful information about the remodeling of pathogen molecular strategies during infection process (Mouveaux et al., 2014).

5. Guidelines to collect new key datasets

Collecting relevant data using the proteomics tools is far from trivial. To go further in the understanding of the complex host–parasite molecular cross-talk, our use of proteomics strategies needs to fit with the intricacy of the studied pathosystem. Whatever the question is, temporal variations in the cross-talk are crucial as relevant biological information is difficult to extract from a single time point and since most of molecular events are highly dynamic during the infection processes. Furthermore, the biological compartment (i.e. tissues) that will be submitted to differential proteomics must be carefully chosen in order to prevent non-specific responses and a failure to detect lowly abundant proteins from being detected because of major proteins being present. Tissue micro-dissection could be a strategy to reduce sample complexity by ways of excluding non-infected regions of the organ from the sample, or intracellular fractioning. Another approach would be to reduce complexity by studying specific parasite-host interactions in an *ex vivo* tissue culture system in which the parasite is presented with one tissue type of interest at a time (de Bekker et al., 2013). When studying a model where the parasite is suspected to hijack the host cell cycle, it could be pertinent to study the nuclear proteome variations. It is also crucial to focus on relevant protein populations that once again depend on the question raised. For example, the analysis of early molecular events and their cell signaling will be predominantly found within a specific subset of the proteome such as the phosphoproteome, whereas long-lasting responses controlling a sustainable gene expression remodeling could be seen in the whole proteome (Rayapuram et al., 2014).

In order to reduce some of the technical pitfalls that befell earlier proteomics methods, new strategies such as metabolic labeling can represent interesting alternatives. Although SILAC has several advantages, it is not always the best choice since this method is developed for cell cultures and its *in vivo* application is actually limited to model species with completely sequenced genome. However, it is possible to generate a database from transcriptomics data from a unsequenced organism and use this for mass spectrometry analysis bypassing this issue (Evans et al., 2012). New experimental methods such as SILAC and iTRAQ can give access to the interactome integration level which consists in all the host protein-parasite protein interactions that occur within a cell at a given time (Munday et al., 2012). Since these interactions, that can involve either two partners or large complexes, form the core of a wide number of cellular processes, their studies are of great importance to decipher the host–parasite molecular cross-talk. Currently, approaches in genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics and interactomics combined with bioinformatics allow an *in silico* modeling of host–parasite protein–protein interactions that will facilitate our understanding of the host–parasite molecular cross-talk. A high-throughput generic and multidisciplinary approach is missing to reveal parasite proteins and host–parasite protein–protein interactions (PPI) during the dynamics of an infection. Recent studies on parasite strategies of infection through the examining of the parasite-human interactome suggest that parasites belonging to the Bacteria Kingdom and to the viruses

could share molecular strategies to take control of host cellular functions. Moreover, their proteins seem to preferentially target "hubs," i.e. highly connected proteins in the human PPI network (Durmuş Tekir et al., 2012; Khadka et al., 2011). These results therefore reveal a possible evolutionary convergence of molecular strategies in the hijacking of human cellular functions by parasites. However, no global study with parasites and hosts belonging to Phyla of different Kingdoms and portraying different parasite lifestyles exists. We believe that a multidisciplinary approach combining efficient quantitative proteomics techniques and bioinformatics methods can deliver a temporal view of the molecular strategies employed by parasites belonging to different Kingdoms and Phyla. This approach, applied from sub-cellular compartments (nucleus, mitochondria, cytoplasm, and membrane) to the cellular level, should (i) reveal the host–parasite cross-talk implemented during hijacking, and (ii) allow us to test the hypothesis of a molecular convergence of parasite strategies in different Phyla of the Tree of Life.

6. Concluding remarks

Living organisms are constantly exposed to parasites. Whereas most host species have acquired strategies through selective pressure to mislead the parasite and to win the fight during their cross-talk, many parasite species have developed strategies to bypass the host's defenses and to ensure the completion of their life cycle, ultimately, winning the molecular war. New research challenges for the scientific community that tries to understand host–parasite cross-talk are: (i) how are the proteins involved in cross-talk activated? (ii) is the regulation/activation of host proteins induced at transcriptional, translational or post-translational level? (iii) can proteins identified in proteomics studies explain resistance or permanent susceptibility of hosts to (a) parasite(s)? (iv) what is the host–parasite cross-talk implemented during hijacking of host cellular functions by extra- and intra-cellular parasites? (v) which host cellular functions are perturbed by extra- and intra-cellular parasites to take control of host cell functioning? Indeed, elucidation of these complex molecular dialogues between hosts and parasites is clearly desirable not only to improve our understanding of parasite virulence but also to identify parasite-specific host biomarkers, and to define novel therapeutic targets. Among available quantitative approaches, the best one to adopt depends on the nature of the host–parasite association under investigation.

Acknowledgements

J.P. was supported by a scholarship from the Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). C.C. was supported by a scholarship from the French National Institute for Agronomic Research (INRA).

References

Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature 406, 782–787.
Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422, 198–207.
Agrios, G.N., 1997. Plant Pathology, Experimental Agriculture. Elsevier Science & Technology Books.
Amey, R.C., Schleicher, T., Slinn, J., Lewis, M., Macdonald, H., Neill, S.J., Spencer-Phillips, P.T.N., 2008. Proteomic analysis of a compatible interaction between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae*. Eur. J. Plant Pathol. 122, 41–55.
Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T., Courret, N., 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. Trends Microbiol. 6, 392–401.
Ausubel, F.M., 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? Nat. Immunol. 6, 973–979.
Babujee, L., Venkatesh, B., Yamazaki, A., Tsuyumu, S., 2007. Proteomic analysis of the carbonate insoluble outer membrane fraction of the soft-rot pathogen *Dickeya dadantii* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) strain 3937. J. Proteome Res. 6, 62–69.
Barrero, C.A., Datta, P.K., Sen, S., Deshmane, S., Amini, S., Khalili, K., Merali, S., 2013. HIV-1 Vpr modulates macrophage metabolic pathways: a SILAC-based quantitative analysis. PLoS One 8, e68376.
Berard, A.R., Cortens, J.P., Krokhin, O., Wilkins, J.A., Severini, A., Coombs, K.M., 2012. Quantification of the host response proteome after mammalian reovirus T1L infection. PLoS One 7, e51939.
Berghout, J., Langlais, D., Radovanovic, I., Tam, M., MacMicking, J.D., Stevenson, M.M., Gros, P., 2013. Irf8-regulated genomic responses drive pathological inflammation during cerebral malaria. PLoS Pathog. 9, e1003491.
Beyer, T.V., Svezhova, N.V., Radchenko, A.I., Sidorenko, N.V., 2002. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). Cell Biol. Int. 26, 861–871.
Biron, D.G., Loxdale, H.D., Université, C., Pascal, U.B., Génome, M., 2013. Host – parasite molecular cross-talk during the manipulative process of a host by its parasite. J. Exp. Biol., 148–160
Biron, D.G., Moura, H., Marche, L., Hughes, A.L., Thomas, F., 2005. Towards a new conceptual approach to "parasitoproteomics". Trends Parasitol. 21, 162–168.
Biron, D.G., Nedelkov, D., Missé, D., Holzmuller, P., 2011. Proteomics and host pathogen interactions: bright future? In: Genetics and Evolution of Infectious Diseases, {E}lsevier {I}nsights {S}eries. Elsevier, pp. 263–303.
Blasche, S., Mörtl, M., Steuber, H., Siszler, G., Nisa, S., Schwarz, F., Lavrik, I., Gronewold, T.M.A., Maskos, K., Donnenberg, M.S., Ullmann, D., Uetz, P., Kögl, M., 2013. The *E. coli* effector protein NleF is a caspase inhibitor. PLoS One 8, e58937.
Boehm, T., 2012. Evolution of vertebrate immunity. Curr. Biol. 22, R722–R732.
Brotherton, M.-C., Bourassa, S., Leprohon, P., Légaré, D., Poirier, G.G., Droit, A., Ouellette, M., 2013. Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant. PLoS One 8, e81899.
Burnet, F.M., 1961. Immunological recognition of self. Science 133, 307–311.
Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., Rivas, S., Alaux, L., Kanzaki, H., Okuyama, Y., Morel, J.-B., Fournier, E., Tharreau, D., Terauchi, R., Kroj, T., 2013. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. Plant Cell 25, 1463–1481.
Charley, B., Riffault, S., Van Reeth, K., 2006. Porcine innate and adaptative immune responses to influenza and coronavirus infections. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081, 130–136.
Choi, D.S., Hwang, B.K., 2011. Proteomics and functional analyses of pepper abscisic acid-responsive 1 (ABR1), which is involved in cell death and defense signaling. Plant Cell 23, 823–842.
Choi, H.W., Kim, D.S., Kim, N.H., Jung, H.W., Ham, J.H., Hwang, B.K., 2013. *Xanthomonas* filamentous hemagglutinin-like protein Fha1 interacts with pepper hypersensitive-induced reaction protein CaHIR1 and functions as a virulence factor in host plants. Mol. Plant Microbe Interact. 26, 1441–1454.
Chung, J.W., Speert, D.P., 2007. Proteomic identification and characterization of bacterial factors associated with *Burkholderia cenocepacia* survival in a murine host. Microbiology 153, 206–214.
Coiras, M., Camafeita, E., López-Huertas, M.R., Calvo, E., López, J.A., Alcamí, J., 2008. Application of proteomics technology for analyzing the interactions between host cells and intracellular infectious agents. Proteomics 8, 852–873.
Colditz, F., Nyamsuren, O., Niehaus, K., Eubel, H., Braun, H.-P., Krajinski, F., 2004. Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. Plant Mol. Biol. 55, 109–120.
Cui, S.-J., Xu, L.-L., Zhang, T., Xu, M., Yao, J., Fang, C.-Y., Feng, Z., Yang, P.-Y., Hu, W., Liu, F., 2013. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host–parasite interactions. J. Proteomics 84, 158–175.
Dangl, J.L., Jones, J.D., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411, 826–833.
De Bekker, C., Smith, P.B., Patterson, A.D., Hughes, D.P., 2013. Metabolomics reveals the heterogeneous secretome of two entomopathogenic fungi to ex vivo cultured insect tissues. PLoS One 8, e70609.
De Morais Guedes, S., Vitorino, R., Domingues, R., Tomer, K., Correia, A.J., Amado, F., Domingues, P., 2005. Proteomics of immune-challenged *Drosophila melanogaster* larvae hemolymph. Biochem. Biophys. Res. Commun. 328, 106–115.
Dean, P., 2011. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. FEMS Microbiol. Rev. 35, 1100–1125.
Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y., 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 8024–8029.
DeYoung, B.J., Innes, R.W., 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. Nat. Immunol. 7, 1243–1249.
Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., Fu, Z.F., 2005. New frontiers in proteomics research: a perspective. Int. J. Pharm. 299, 1–18.
Dietrich, A., Mayer, J.E., Hahlbrock, K., 1990. Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. J. Biol. Chem. 265, 6360–6368.
Dóczi, R., Okrész, L., Romero, A.E., Paccanaro, A., Bögre, L., 2012. Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. Trends Plant Sci. 17, 518–525.

Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., Ellis, J.G., 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 8888–8893.
Donnelly, M.A., Steiner, T.S., 2002. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. J. Biol. Chem. 277, 40456–40461.
Dornez, E., Croes, E., Gebruers, K., Carpentier, S., Swennen, R., Laukens, K., Witters, E., Urban, M., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2010. 2-D DIGE reveals changes in wheat xylanase inhibitor protein families due to *Fusarium graminearum* DeltaTri5 infection and grain development. Proteomics 10, 2303–2319.
Dreisbach, A., van der Kooi-Pol, M.M., Otto, A., Gronau, K., Bonarius, H.P.J., Westra, H., Groen, H., Becher, D., Hecker, M., van Dijl, J.M., 2011. Surface shaving as a versatile tool to profile global interactions between human serum proteins and the *Staphylococcus aureus* cell surface. Proteomics 11, 2921–2930.
Durmuş Tekir, S., Cakir, T., Ulgen, K.Ö., 2012. Infection strategies of bacterial and viral pathogens through pathogen-human protein–protein interactions. Front. Microbiol. 3, 46.
Elde, N.C., Malik, H.S., 2009. The evolutionary conundrum of pathogen mimicry. Nat. Rev. Microbiol. 7, 787–797.
Emilianowicz, W., 1952. Viability of anti-Vi bacteriophage in aquatic environment; comparative study with viability of homologous typhoid bacteria. Biul. Państw. Inst. Med. Morsk. Trop. J W Gdańsku 4, 331–338.
Evans, V.C., Barker, G., Heesom, K.J., Fan, J., Bessant, C., Matthews, D.A., 2012. De novo derivation of proteomes from transcriptomes for transcript and protein identification. Nat. Methods 9, 1207–1211.
Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T., 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant J. 18, 265–276.
Felix, G., Grosskopf, D.G., Regenass, M., Basse, C.W., Boller, T., 1991. Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells: characterization and use as a bioassay for elicitor action. Plant Physiol. 97, 19–25.
Fugmann, S.D., 2010. The origins of the Rag genes – from transposition to V(D)J recombination. Semin. Immunol. 22, 10–16.
Girardin, S.E., Sansonetti, P.J., Philpott, D.J., 2002. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens – common concepts in mammals and flies. Trends Microbiol. 10, 193–199.
Gómez-Gómez, L., Bauer, Z., Boller, T., 2001. Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FSL2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell 13, 1155–1163.
Gómez-Gómez, L., Boller, T., 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. Mol. Cell 5, 1003–1011.
Grishin, A.M., Beyrakhova, K.A., Cygler, M., 2015. Structural insight into effector proteins of Gram-negative bacterial pathogens that modulate the phosphoproteome of their host. Protein Sci.
Gstaiger, M., Aebersold, R., 2009. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. Nat. Rev. Genet. 10, 617–627.
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, e40695.
Herbinière, J., Grève, P., Strub, J.-M., Thiersé, D., Raimond, M., van Dorsselaer, A., Martin, G., Braquart-Varnier, C., 2008. Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*. Dev. Comp. Immunol. 32, 875–882.
Hewezi, T., Baum, T.J., 2013. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. Mol. Plant Microbe Interact. 26, 9–16.
Higgins, M.K., Carrington, M., 2014. Sequence variation and structural conservation allows development of novel function and immune evasion in parasite surface protein families. Protein Sci. 23, 354–365.
Hughes, C., Krijgsveld, J., 2012. Developments in quantitative mass spectrometry for the analysis of proteome dynamics. Trends Biotechnol. 30, 668–676.
Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., Valent, B., 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. EMBO J. 19, 4004–4014.
Jones, A.M.E., Thomas, V., Truman, B., Lilley, K., Mansfield, J., Grant, M., 2004. Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. Phytochemistry 65, 1805–1816.
Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. Nature 444, 323–329.
Karvonen, A., Seehausen, O., 2012. The role of parasitism in adaptive radiations—when might parasites promote and when might they constrain ecological speciation? Int. J. Ecol. 2012, 1–20.
Keen, N., Staskawicz, B., Mekalanos, J., Ausubel, F., Cook, R.J., 2000. Pathogens and hosts: the dance is the same, the couples are different. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 8752–8753.
Khadka, S., Vangeloff, A.D., Zhang, C., Siddavatam, P., Heaton, N.S., Wang, L., Sengupta, R., Sahasrabudhe, S., Randall, G., Gribskov, M., Kuhn, R.J., Perera, R., LaCount, D.J., 2011. A physical interaction network of dengue virus and human proteins. Mol. Cell. Proteomics 10 (M111), 012187.
Kim, S.T., Cho, K.S., Yu, S., Kim, S.G., Hong, J.C., Han, C., Bae, D.W., Nam, M.H., Kang, K.Y., 2003. Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. Proteomics 3, 2368–2378.
Kolmeder, C.A., de Vos, W.M., 2014. Metaproteomics of our microbiome – developing insight in function and activity in man and model systems. J. Proteomics 97, 3–16.
Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Kuris, A.M., 2006. Parasites dominate food web links. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 11211–11216.
Lamont, E.A., Janagama, H.K., Ribeiro-Lima, J., Vulchanova, L., Seth, M., Yang, M., Kurmi, K., Waters, W.R., Thacker, T., Sreevatsan, S., 2014. Circulating *Mycobacterium bovis* peptides and host response proteins as biomarkers for unambiguous detection of subclinical infection. J. Clin. Microbiol. 52, 536–543.
Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A., Lebrun-Garcia, A., 2000. Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. Mol. Plant Microbe Interact. 13, 821–829.
Lepargneur, J.-P., Abbal, M., 2012. Innate and adaptative immunity of the female genital tract. J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris) 41, 612–622.
Levy, F., Rabel, D., Charlet, M., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Ehret-Sabatier, L., 2004. Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. Biochimie 86, 607–616.
Li, Y., Ye, Z., Nie, Y., Zhang, J., Wang, G.-L., Wang, Z., 2015. Comparative phosphoproteome analysis of *Magnaporthe oryzae*-responsive proteins in susceptible and resistant rice cultivars. J. Proteomics 115, 66–80.
McGuinness, D.H., Dehal, P.K., Pleass, R.J., 2003. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. Trends Parasitol. 19, 312–319.
Medzhitov, R., Janeway, C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science 296, 298–300.
Mehta, A., Brasileiro, A.C.M., Souza, D.S.L., Romano, E., Campos, M.A., Grossi-de-Sá, M.F., Silva, M.S., Franco, O.L., Fragoso, R.R., Bevitori, R., Rocha, T.L., 2008a. Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? FEBS J. 275, 3731–3746.
Mehta, A., Magalhães, B.S., Souza, D.S.L., Vasconcelos, E.A.R., Silva, L.P., Grossi-de-Sa, M.F., Franco, O.L., da Costa, P.H.A., Rocha, T.L., 2008b. Rooteomics: the challenge of discovering plant defense-related proteins in roots. Curr. Protein Pept. Sci. 9, 108–116.
Mei, B., Ding, X., Xu, H.-Z., Wang, M.-T., 2014. Global gene expression changes in human peripheral blood after H7N9 infection. Gene 551, 255–260.
Meijer, H.J.G., van de Vondervoort, P.J.I., Yin, Q.Y., de Koster, C.G., Klis, F.M., Govers, F., de Groot, P.W.J., 2006. Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. Mol. Plant Microbe Interact. 19, 1348–1358.
Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W., Young, N.D., 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant J. 20, 317–332.
Molina, H., Yang, Y., Ruch, T., Kim, J.-W., Mortensen, P., Otto, T., Nalli, A., Tang, Q.-Q., Lane, M.D., Chaerkady, R., Pandey, A., 2009. Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. J. Proteome Res. 8, 48–58.
Mouveaux, T., Oria, G., Werkmeister, E., Slomianny, C., Fox, B.A., Bzik, D.J., Tomavo, S., 2014. Nuclear glycolytic enzyme enolase of *Toxoplasma gondii* functions as a transcriptional regulator. PLoS One 9, e105820.
Munday, D.C., Surtees, R., Emmott, E., Dove, B.K., Digard, P., Barr, J.N., Whitehouse, A., Matthews, D., Hiscox, J.A., 2012. Using SILAC and quantitative proteomics to investigate the interactions between viral and host proteomes. Proteomics 12, 666–672.
Niederberger, E., Geisslinger, G., 2013. Proteomics and NF-κB: an update. Expert Rev. Proteomics 10, 189–204.
Nühse, T.S., Bottrill, A.R., Jones, A.M.E., Peck, S.C., 2007. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. Plant J. 51, 931–940.
Nürnberger, T., Brunner, F., 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Curr. Opin. Plant Biol. 5, 318–324.
Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L., 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunol. Rev. 198, 249–266.
Otto, A., Becher, D., Schmidt, F., 2014. Quantitative proteomics in the field of microbiology. Proteomics 14, 547–565.
Panek, J., El Alaoui, H., Mone, A., Urbach, S., Demettre, E., Texier, C., Brun, C., Zanzoni, A., Peyretaillade, E., Parisot, N., Lerat, E., Peyret, P., Delbac, F., Biron, D.G., 2014. Hijacking of host cellular functions by an intracellular parasite, the microsporidian *Anncaliia algerae*. PLoS One 9, e100791.
Parker, B.J., Barribeau, S.M., Laughton, A.M., de Roode, J.C., Gerardo, N.M., 2011. Non-immunological defense in an evolutionary framework. Trends Ecol. Evol. 26, 242–248.
Parker, J., Koh, J., Yoo, M.-J., Zhu, N., Feole, M., Yi, S., Chen, S., 2013. Quantitative proteomics of tomato defense against *Pseudomonas syringae* infection. Proteomics 13, 1934–1946.
Patramool, S., Choumet, V., Surasombatpattana, P., Sabatier, L., Thomas, F., Thongrungkiat, S., Rabilloud, T., Boulanger, N., Biron, D.G., Missé, D., 2012. Update on the proteomics of major arthropod vectors of human and animal pathogens. Proteomics 12, 3510–3523.
Pemberton, A.D., Knight, P.A., Wright, S.H., Miller, H.R.P., 2004. Proteomic analysis of mouse jejunal epithelium and its response to infection with the intestinal nematode, *Trichinella spiralis*. Proteomics 4, 1101–1108.
Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H., 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. Curr. Opin. Plant Biol. 12, 421–426.
Pombo, M.A., Zheng, Y., Fernandez-Pozo, N., Dunham, D.M., Fei, Z., Martin, G.B., 2014. Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the

Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins. Genome Biol. 15, 492.
Rayapuram, N., Bonhomme, L., Bigeard, J., Haddadou, K., Przybylski, C., Hirt, H., Pflieger, D., 2014. Identification of novel PAMP-triggered phosphorylation and dephosphorylation events in *Arabidopsis thaliana* by quantitative phosphoproteomic analysis. J. Proteome Res. 13, 2137–2151.
Reales-Calderón, J.A., Sylvester, M., Strijbis, K., Jensen, O.N., Nombela, C., Molero, G., Gil, C., 2013. *Candida albicans* induces pro-inflammatory and anti-apoptotic signals in macrophages as revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. J. Proteomics 91C, 106–135.
Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., Speijer, D., Back, J.W., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C., 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. Plant Physiol. 130, 904–917.
Roe, A.J., Tysall, L., Dransfield, T., Wang, D., Fraser-Pitt, D., Mahajan, A., Constandinou, C., Inglis, N., Downing, A., Talbot, R., Smith, D.G., Gally, D.L., 2007. Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in *Escherichia coli* O157: H7. Microbiology 153, 1350–1360.
Rohfritsch, O., 2008. Plants, gall midges, and fungi: a three-component system. Entomol. Exp. Appl. 128, 208–216.
Rudd, J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., Lysenko, A., Saqi, M., Desai, N., Powers, S., Hooper, J., Ambroso, L., Bharti, A., Farmer, A., Hammond-Kosack, K., Dietrich, R., Courbot, M., 2015. Transcriptome and metabolite profiling the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat (*Triticum aestivum*) reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions, and a variation on the hemibiotro. Plant Physiol.
Sakaguchi, A., Matsumoto, K., Hisamoto, N., 2004. Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans*. J. Biochem. 136, 7–11.
Schenkluhn, L., Hohnjec, N., Niehaus, K., Schmitz, U., Colditz, F., 2010. Differential gel electrophoresis (DIGE) to quantitatively monitor early symbiosis- and pathogenesis-induced changes of the *Medicago truncatula* root proteome. J. Proteomics 73, 753–768.
Schmid-Hempel, P., 2011. Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics/by Paul Schmid-Hempel. Oxford University Press, Oxford.
Teixeira, M.M., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T., 2002. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. Microbes Infect. 4, 883–886.
Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr. Opin. Immunol. 14, 103–110.
Ünlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis 18, 2071–2077.
Urbaniak, M.D., Guther, M.L.S., Ferguson, M.A.J., 2012. Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. PLoS One 7, e36619.
Verleyen, P., Baggerman, G., D'Hertog, W., Vierstraete, E., Husson, S.J., Schoofs, L., 2006. Identification of new immune induced molecules in the haemolymph of *Drosophila melanogaster* by 2D-nanoLC MS/MS. J. Insect Physiol. 52, 379–388.
Viard, M.P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.P., 1994. Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. Plant Physiol. 104, 1245–1249.
Wan, J., Torres, M., Ganapathy, A., Thelen, J., DaGue, B.B., Mooney, B., Xu, D., Stacey, G., 2005. Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant Microbe Interact. 18, 458–467.
Wu, Z., Sahin, O., Wang, F., Zhang, Q., 2014. Proteomic identification of immunodominant membrane-related antigens in *Campylobacter jejuni* associated with sheep abortion. J. Proteomics 99, 111–122.
Yang, H., Tan, Y., Zhang, T., Tang, L., Wang, J., Ke, Y., Guo, Z., Yang, X., Yang, R., Du, Z., 2013. Identification of novel protein–protein interactions of *Yersinia pestis* type III secretion system by yeast two hybrid system. PLoS One 8, e54121.
Yao, Y.A., Wang, J., Ma, X., Lutts, S., Sun, C., Ma, J., Yang, Y., Achal, V., Xu, G., 2012. Proteomic analysis of Mn-induced resistance to powdery mildew in grapevine. J. Exp. Bot. 63, 5155–5170.
Zhang, C.G., Chromy, B.A., McCutchen-Maloney, S.L., 2005. Host-pathogen interactions: a proteomic view. Expert Rev. Proteomics 2, 187–202.

CHAPITRE II : Analyse comparée du protéome du grain de blé tendre à différents stades de développement, infecté ou non par une souche mycotoxinogène de *Fusarium graminearum*

Les travaux de cette partie ont fait l'objet d'une publication dans *European Journal of plant pathology* sous le titre de : **« *A proteomics survey on wheat susceptibility to Fusarium head blight during grain development* ».**

1- Etat de l'art

La protéomique permet l'étude du protéome défini comme l'ensemble des protéines exprimées par un génome donné dans des conditions données et à un moment donné (Wasinger et al., 1995). L'Analyse protéomique des interactions entre une plante et son agent pathogène a connu une augmentation spectaculaire au cours de ces dernières années (Rampitsch and Bykova, 2012). Cela a été favorisé par l'évolution des techniques de protéomique, de la spectrométrie de masse, des outils bio-informatiques et par le séquençage massif des génomes (plante hôte et agent-pathogène). Ces approches ont permis d'une part d'analyser le protéome du parasite, et d'autre part, de contribuer à l'enrichissement de nos connaissances sur la réponse de la plante aux agents pathogènes que ce soit dans un contexte résistant (recherche des gènes de résistance) ou dans un contexte sensible (recherche des facteurs de sensibilité).

Plusieurs études de protéomique (*in planta* et *in vitro*) ont été déjà réalisées pour explorer l'interaction *Fusarium*/blé ou *Fusarium*/orge (**Tableau 7**). Cependant, à notre connaissance aucune ne s'est intéressée d'une manière spécifique aux différentes modifications induites par le développement et de l'infection par le champignon *Fusarium graminearum* sur le protéome du grain. Le suivi des changements moléculaires induits par la fusariose sur le grain au cours de son développement permettra non seulement de définir les différentes étapes de l'installation du champignon sur le grain, mais aussi de mieux caractériser les voies biochimiques et les processus biologiques ciblés par l'agent pathogène et contribuant à la sensibilité de la plante.

2- Stratégie

2-1- Cinétique d'infection

Afin de caractériser les bases moléculaires impliquées dans l'adaptation d'un grain de blé tendre à l'infection par la fusariose et de caractériser les gènes, les fonctions et les processus biologiques impliqués dans l'installation de la maladie sur un grain, nous avons choisi de travailler sur un cultivar français « Récital » sensible à la fusariose de l'épi. Une cinétique d'infection sur des grains de blé tendre infectés par la souche de *Fusarium graminearum (Fg1)* a été réalisée. Les points de la cinétique choisis correspondent à des phases clés du développement du grain (Nadaud et al., 2010). Le premier point est à 50°Cd (phase précoce de la division cellulaire) ou 3 JPI (jours post inoculation), le deuxième point correspond à 150°Cd

ou 7 JPI (phase tardive de la division et phase de la différenciation cellulaire) et le troisième est le 250°Cd ou 15 JPI (phase précoce du remplissage du grain).

2-2- Approche protéomique

Cette méthode consiste à extraire les protéines de grains infectés et de grains non infectés (témoins). Pendant cette étape, les protéines sont précipitées pour enlever les contaminants- non protéiques (sucres essentiellement) puis resolubilisées dans une solution compatible avec les techniques de séparation. Les protéines sont ensuite séparées dans un premier temps en fonction de leur charge (isoélectrofocalisation, IEF), puis dans un second temps en fonction de leur masse moléculaire au travers d'un gel de poly-acrylamide (SDS-PAGE). Les gels obtenus sont colorés, puis scannés, et l'abondance relative des protéines est comparée par analyse d'image. Les spots protéiques présentant un intérêt sont excisés puis identifiés par spectrométrie de masse (**Figure 21**).

3- Principaux résultats et conclusions

L'analyse du protéome des grains infectés a conduit à l'identification de 73 protéines différentiellement exprimées sur un total de 2000 analysées entre les grains témoins et infectés à ces trois points de la cinétique étudiée et appartenant à cinq processus biologiques distincts. Même si la technique de PCR quantitative a mis en évidence la présence du champignon dans les grains inoculés ne présentant pas de symptômes visibles à l'œil nu, aucune protéine fongique n'a été détectée dans notre analyse protéomique. Ce résultat a été observé également dans une étude récemment publiée par Masci et al., 2015 dans *Journal of Agricultural and food chemistry* où aucune protéine fongique n'a été détectée malgré la détection des mycotoxines dans les échantillons de grains inoculés. Cette étude a permis d'établir ces quatre principales conclusions discutées dans l'article publié dans *European Journal of Plant Pathology* :

- L'infection des grains par le FHB n'induit pas de changements drastiques du protéome du grain, à l'exception de certains spots protéiques différentiellement régulés, les profils protéiques entre les grains témoins et les grains infectés restent semblables à chacun des trois stades du développement du grain analysé. Des résultats similaires ont été également obtenus par Masci et al., 2015 **;** Eggert and Pawelzik, 2011 qui soulignent également que l'infection des grains par le champignon *F. graminearum* n'affecte pas sévèrement les patterns protéiques. La concordance de ces résultats suggère que l'infection ne perturbe pas la cinétique de développement du grain d'autant plus les 73 protéines identifiées ne sont pas impliquées directement dans le développement du grain et sa régulation.

Tableau 6. Etudes protéomiques portant sur l'interaction *F. graminearum* avec le blé et l'orge.

(Yang et al., 2013)

Growth conditions	Sampling times	Sample materials	Proteomics techniques	Remarks	Reference
In the growth media containing either glucose or hop cell walls	6 d, 9 d	Culture supernatants	1-DE, 2-DE, LC-MS/MS	Analysis of the fungal *in vitro* secretomes	Phalip et al. (2005)
In the synthetic media containing polysaccharide supplements	7 d	Culture supernatants	1-DE, LC-MS/MS	High-throughput analysis of the fungal *in vitro* secretomes	Paper et al. (2007)
In the wheat grains	Maturity	Fungal secretome	1-DE, LC-MS/MS	Analysis of the fungal *in planta* secretomes	Paper et al. (2007)
In the growth medium promoting trichothecene biosynthesis after 2-day growth in the rich medium	0, 4 d, 9 d, 12 d	Fungal tissues	iTRAQ, LC-MS/MS 2-DE, MS/MS	*In vitro* time course study of the changes in fungal intercellular proteomes due to the induction of trichothecene production	Taylor et al. (2008)
In the growth media containing only barley or wheat flour	7 d	Culture supernatants	2-DE, MALDI-MS/MS	Study of the fungal *in vitro* secretomes under growth conditions which mimic *in planta* nutritional situation	Yang et al. (2012)
In the growth medium with limited nitrogen after 2-day growth in the rich medium	0, 6 h, 12 h	Fungal tissues	2-DE, MALDI-MS, 1-DE, IMAC, TiO_2, LC-MS, SAX, IMAC, LC-MS/MS	Analysis of the fungal phosphoproteomes under the *in vitro* growth condition that activates trichothecene pathway	Rampitsch et al. (2010)
In the growth medium with unlimited nutrients	1 d	Fungal tissues	SCX, IMAC, LC-MS/MS	Analysis of the fungal *in vitro* phosphoproteomes	Rampitsch et al. (2012)
Virus-free and -infected strains grown in the complete medium	5 d	Fungal tissues	2-DE, LC-MS/MS	Study of the fungal proteomes in response to viral infection	Kwon et al. (2009)
In the resistant wheat spikes	6 h, 12 h, 24 h	Wheat spikes	2-DE, MALDI MS	Study of the differential expressed wheat proteins in response to fungal infection	Wang et al. (2005)
In the susceptible and resistant wheat spikes	5 d	Wheat spikelets	2-DE, LC-MS/MS	Study of the differential expressed wheat proteins in response to fungal infection	Zhou et al. (2005)
In the susceptible wheat spikes	1 d, 2 d, 3 d	Wheat spikelets	2-DE, LC-MS/MS	Identification of wheat proteins regulated by the fungus and fungal expressed proteins *in planta*	Zhou et al. (2006)
In the susceptible wheat ears	5 d, 15 d, 25 d	Wheat ears	DIGE, MALDI MS/MS	Investigation of the changes in xylanase inhibitors (iso)forms of wheat due to fungal *Tir5* mutant infection	Dornez et al. (2010)
In the susceptible and resistant wheat spikes	12 h	Wheat spikes	2-DE, MALDI MS	Study of the differential expressed wheat proteins and genes in response to fungal infection	Ding et al. (2011)
In the moderate resistant wheat spikes	48 h	Wheat spikes	2-DE, MALDI MS	Study of the differential expressed wheat proteins in response to fungal infection	Shin et al. (2011)
In wheat carrying either resistant or susceptible alleles at the *Fhb 1* locus	72 h	Wheat spikelets	LC-MS/MS, spectral counting	Identification of mechanisms of resistance governed by the FHB resistance locus *Fhb 1*	Gunnaiah et al. (2012)
In emmer heads and co-colonization with *Fusarium culmorum*	Maturity	Emmer grains	2-DE, LC-MS/MS	Study of the differential expressed emmer seed proteins in response to fungal infection	Eggert et al. (2011)
In the spikes of six barley genotypes of varying resistance	3 d	Barley spikelets	2-DE, LC-MS/MS	Study of the differential expressed barley proteins in response to fungal infection	Geddes et al. (2008)
In the susceptible barley spikes grown under different N fertilizers	Maturity	Barley seeds	2-DE, MALDI MS/MS	Investigation of effect of nitrogen fertilizer mounts on the severity of FHB and identification of fungal proteins *in planta*	Yang et al. (2010a)
In the susceptible barley spikes	2 d	Barley spikelets	2-DE, MALDI MS/MS	Definition of infection levels correlated to fungal induced plant proteome degradation and identification of the differential expressed barley proteins in response to fungal infection	Yang et al. (2010b)
In the susceptible barley seeds	3 d	Germinating barley seeds	2-DE, MALDI MS/MS	Study of the differential expressed barley seed proteins in response to fungal infection during germination	Yang et al. (2011)
In the spikes of eleven barley genotypes of varying resistance	Maturity	Barley seeds	2-DE, LC-MS/MS	Study of the differential expressed barley seed proteins in response to fungal infection	Zantinge et al. (2010)
In the naked barley heads and co-colonization with *Fusarium culmorum*	Maturity	Naked barley grains	2-DE, MALDI MS, LC-MS/MS	Identification of the differentially expressed seed proteins in response to fungal infection and to growing location of the plant	Eggert and Pawelzik (2011)

- Le FHB induit des changements fins et ciblés comme dans le métabolisme primaire avec un impact majeur sur la synthèse de l'amidon *via* une sous-expression de la starch synthase 1 et une activation des mécanismes impliqués dans la dégradation de sucres complexes comme l'amidon. Par ailleurs, des dosages d'amidon ont été réalisés par D'Ovidio et al en 2012 sur des grains infectés. Le résultat montre une diminution importante en contenu d'amidon dans les grains infectés par rapport aux grains sains (Proceedings, 11th International Gluten Workshop, Beijing, China 2012). Les conséquences de ces changements métaboliques de la plante ont à la fois un impact sur le grain de blé qui devient de moins bonne qualité avec une diminution des réserves en amidon et en protéines de réserve, mais aussi sur le champignon qui va puiser les sources indispensables pour son développement et son installation sur grain.

- Cette analyse a également mis en évidence un lien entre le développement du grain et du champignon *F. graminearum.* La spécificité de la réponse de la plante à chacun des stades étudiés suggère que le développement et le cycle infectieux de l'agent pathogène est calé sur les différentes phases du développement du grain. Ce résultat préliminaire sera pris en considération dans le CHAPITRE III, notamment dans la conception du dispositif expérimental (d'autres points à analyser) et dans l'analyse des données transcriptomiques.

- L'utilisation de l'approche protéomique pour comprendre la réponse de la plante au FHB peut présenter certaines limites, les plus importantes sont : (i) le faible nombre de protéines différentiellement régulées identifiées et de leurs fonctions, ce qui rend difficile l'établissement d'un scénario du processus infectieux sur le grain de blé d'où le besoin d'élargir le catalogue des gènes et des fonctions impactés par le FHB, (ii) difficulté à détecter certaines protéines comme les protéines faiblement abondantes qui pourraient être cruciales dans la compréhension du processus infectieux (facteurs de transcriptions, certains inhibiteurs enzymatiques et les protéines membranaires), ou des protéines très basiques ou acides qui sont difficile à mettre en évidence par une approche en gel. Pour palier ces limites, nous avons décidé de compléter cette étude par une analyse de la dynamique du transcriptome du grain en développement infecté par le FHB.

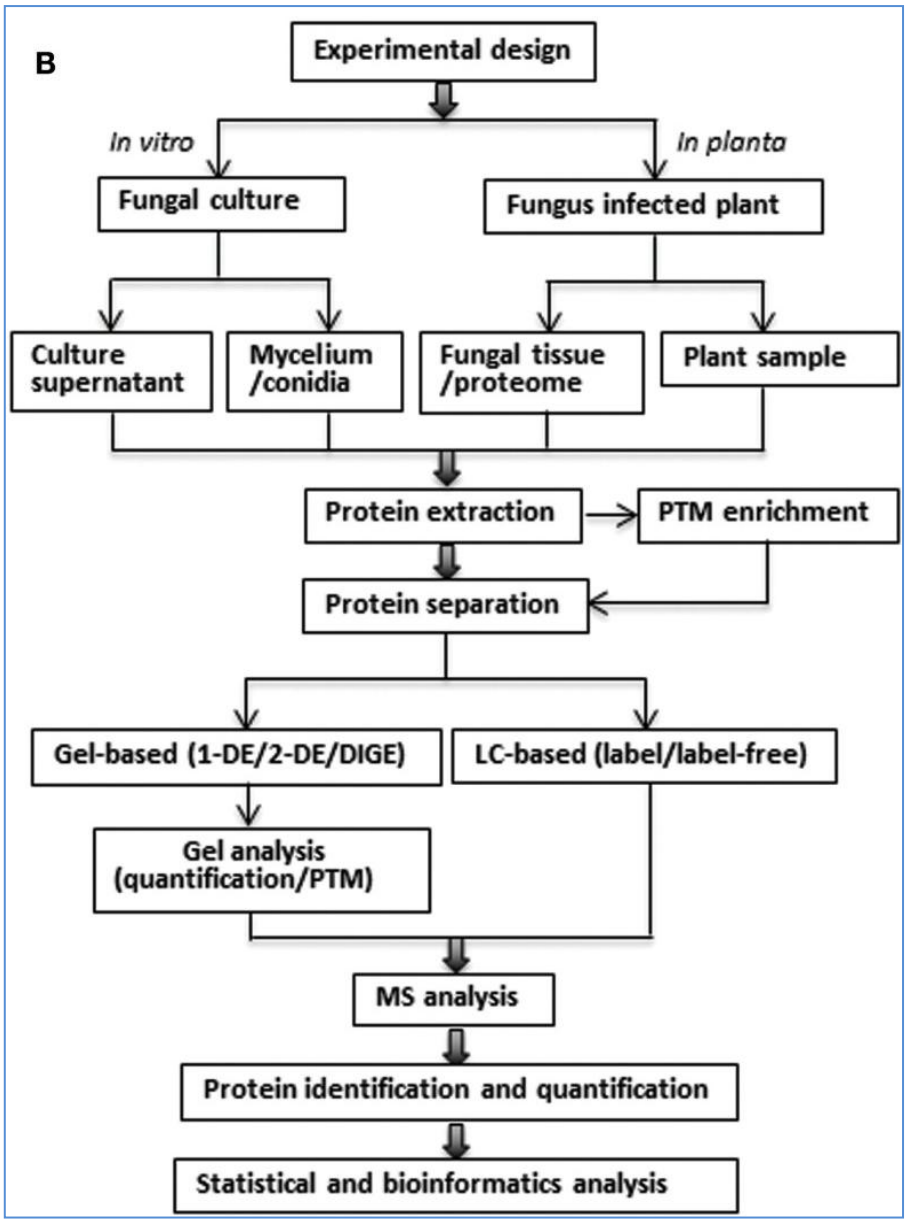

Figure 21 : Schéma illustrant les différentes étapes de protéomique pour une étude *in vitro* et *in planta* de l'interaction *Fusarium*/plante (d'après Yang et al., 2013).

Article de recherche I

Eur J Plant Pathol
DOI 10.1007/s10658-014-0552-0

A proteomics survey on wheat susceptibility to *Fusarium* head blight during grain development

Cherif Chetouhi · Ludovic Bonhomme · Philippe Lecomte · Florence Cambon · Marielle Merlino · David Georges Biron · Thierry Langin

Accepted: 8 October 2014
© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2014

Abstract The mycotoxigenic fungal species *Fusarium graminearum* is able to attack several important cereal crops, such as wheat and barley. By causing *Fusarium* Head Blight (FHB) disease, *F. graminearum* induces yield and quality losses and poses a public health concern due to *in planta* mycotoxin production. The molecular and physiological plant responses to FHB, and the cellular biochemical pathways used by *F. graminearum* to complete its infectious process remain still unknown. In this study, a proteomics approach, combining 2D-gel approach and mass spectrometry, has been used to determine the specific protein patterns associated with the development of the fungal infection during grain growth on susceptible wheat. Our results reveal that *F. graminearum* infection does not deeply alter the grain proteome and does not significantly disturb the first steps of grain ontogeny but impacts molecular changes during the grain filling stage (impact on starch synthesis and storage proteins). The differentially regulated proteins identified were mainly involved in stress and defence mechanisms, primary metabolism, and main cellular processes such as signalling and transport. Our survey suggests that *F. graminearum* could take advantage of putative susceptibility factors closely related to grain development processes and thus provide new insights into key molecular events controlling the susceptible response to FHB in wheat grains.

Keywords Susceptibility factors · Wheat · *Fusarium graminearum* · FHB · Mycotoxin

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10658-014-0552-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Chetouhi · L. Bonhomme (✉) · P. Lecomte · F. Cambon · M. Merlino · T. Langin
INRA, UMR 1095, Genetics, Diversity and Ecophysiology of Cereals,
F-63100 Clermont-Ferrand, France
e-mail: ludovic.bonhomme@clermont.inra.fr

C. Chetouhi · L. Bonhomme · P. Lecomte · F. Cambon · M. Merlino · T. Langin (✉)
UBP, UMR Genetics, Diversity and Ecophysiology of Cereals,
F-63100 Clermont-Ferrand, France
e-mail: thierry.langin@clermont.inra.fr

D. G. Biron
Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement,
Clermont-Ferrand, France; CNRS, UMR 6023, LMGE,
Aubière, France

Introduction

Pathogen-susceptible plants could be connected at least in part to host-susceptibility genes or more broadly, to host-susceptibility factors including a range of determinative factors able to favour pathogen growth (Li et al. 2013; González-Lamothe et al. 2012). Increasing evidence has already shown that lacking of these pivotal host genes/factors could hamper the infection process or even confer plant resistance while they could be essential for plant growth. More than 30 potential host susceptibility genes (S-genes) in different plant species have been reported in the literature (Pavan et al. 2010),

depicting either that transient knock-down of such genes could increase the plant resistance or that the over-expression of other ones could lead to increasing susceptibility. For instance, among S-genes, *PMR6* and *MLO* genes were discovered as genes coding for susceptibility factors promoting growth of powdery mildews (Eckardt 2002), *ADH1* gene modulates the susceptibility of *hordei spp* plant to *Blumeria graminis* fungus (Pathuri et al. 2011) and recently *IAA-Asp* gene was identified as a susceptibility gene as it promotes the growth of *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* (González-Lamothe et al. 2012). Digging into S-genes or S-factors could provide a wealth of additional knowledge to understand plant susceptibility and could be a means to find new strategies aiming at sustainable plant resistance.

Fusarium Head Blight (FHB) is among the most devastating disease worldwide, affecting wheat and other small grains cereals (Goswami and Kistler 2004). This destructive and economically important disease is caused primarily by the mycotoxigenic ascomycetous fungus *Fusarium graminearum (Fg)*. FHB causes not only lower yields, but also grain contamination by producing mycotoxins (e.g., deoxynivalenol, DON) which are very harmful for human and animal supplies (Bottalico and Perrone 2002; Jansen et al. 2005; Ilgen et al. 2009). The plant symptoms and responses to *Fg* attack are diverse, tissue-specific and vary according to the plant species. Up to now, several resistant genotypes are used as a means to control FHB in field. Three main types of FHB resistance can be described: type I refers to the resistance to initial infection (Mesterházy 1995), type II depicts the resistance to the spread of pathogen within the spike (Schroeder 1963) and type III refers to the resistance to DON synthesis (Miller et al. 1985). To our knowledge, FHB determinism has been mainly assessed from resistant genotypes to trace the so-called resistance genes (R-genes). Resistance to FHB in wheat is quantitative and is governed by many QTLs which control different types of resistance (Bai and Shaner 2004). Among the one hundred FHB resistance QTLs identified in wheat, the *Fhb1* locus, which was located in chromosome 3BS, explains up to 60 % of the phenotype variation for type II FHB resistance and is seen as a major QTL for this disease (Cuthbert et al. 2006; Buerstmayr et al. 2009). Comparisons of protein expression profiles between the unique pair NILs contrasting in *Fhb1* alleles allowed the identification of nine types of either induced or up-regulated proteins that were associated with wheat FHB resistance in the *Fhb1*+ NIL. These differentially expressed proteins may be involved in multiple processes which make difficult the understanding of molecular events linked to FHB resistance (Zhang et al. 2013a). Likewise, many data have been accumulated about the defence mechanisms involved in wheat resistance to FHB (Zhou et al. 2002; Buerstmayr et al. 2003), either by using transcriptomic (Gottwald et al. 2012a; Kugler et al. 2013) or proteomic approaches (Zhou et al. 2005; Ding et al. 2011; Gunnaiah et al. 2012; Zhang et al. 2013b). Most of these studies were primarily focused on understanding the genetic basis of major QTLs (e.g., fhb1). Proteomic studies pointed diverse mechanisms of resistance such as oxidative burst, oxidative stress, response and induction of PR proteins, changes in hormones and secondary metabolism in barley (Yang et al. 2013) and in wheat (Hamzehzarghani et al. 2005; Yang et al. 2013). Another study combining proteomics and metabolomics approaches suggested that the fhb1 resistance is mainly associated with cell wall thickening due to deposition of hydroxycinnamic acid amides, phenolic glucosides and flavonoides, but not with the conversion of DON to less toxic DON 3-O-glucoside (Gunnaiah et al. 2012). Furthermore, transcriptomics also revealed the activation of ABC transporters, UDP-glucosyltransferases and proteases in different FHB resistant genetic backgrounds (Gottwald et al. 2012b). The *Fhb1* QTL derived from the resistant genotype *sumai3*, showed greater accumulation of transcripts of Pathogen-Related proteins such as PR5, PR14, ABC transporter and JA signalling pathway (Xiao et al. 2013). In addition, Kugler et al. (2013) found that the G-protein coupled receptor kinase and biosynthesis genes for jasmonate and ethylene were earlier induced in plants including *Fhb1* QTL, and they found genes involved in biosynthesis and metabolism of riboflavin were more abundant in plants displaying *Qfhq.ifa-5A* QTL. These results show that many efforts have been undertaken to decipher the molecular determinism of plant resistance. Conversely, the understanding of plant susceptibility is still poorly documented in wheat while identification of susceptibility factors has already been reported using deletion mutants (Ma et al. 2006).

Plant susceptibility and related susceptibility factors are expected to be part of the whole range of FHB responses found in susceptible genotypes. Therefore,

to gain insights into susceptibility putative responses in wheat grains, the plant molecular changes occurring during the compatible interaction between a mycotoxigenic *Fg* strain and the susceptible French wheat cultivar Recital were examined during 14 days. In wheat, the grain development involves three main steps: (i) the cell division occurs within 3–6 days after anthesis (daa), and is associated with cell wall initiation and intense mitotic activity; (ii) the differentiation step and endoduplication (7–10 daa) includes the formation of the main cell types (transfer cells, aleurone, starchy endosperm and cells surrounding the embryo); and (iii) the grain filling stage (12–28 daa) (Nadaud et al. 2010). By using proteomic tools (i.e. 2-DE combined to mass spectrometry), we assessed the dynamics of molecular events that occurred specifically in the grain tissue at these three key growth stages to provide for the first time a mapping of *Fg*-responsive proteins and to investigate FHB susceptibility factors during *Fg*-wheat compatible interaction.

Materials and methods

Host and fungal material

During 2009 and 2010, a winter wheat cultivar, so-called "Recital", was grown in a greenhouse at the INRA Research Center of Clermont-Ferrand (France) without treatment and pesticide protection. Inoculation (i.e. infection) of wheat ears by *Fg1* strain was done at the flowering stage (~14 weeks after sowing), especially at mid-anthesis, when about 50 % of the stamens were visible. The inoculum (10^5 spores per ml) was deposited by spraying about 50 μl on both sides of the ears. A mock treatment was applied by spraying water without spores and served as control. After spraying, mock- and *Fg1*-treated ears were covered with a bag for 2 hours to maintain sufficient moisture and to promote attachment of the *Fg1* spores in inoculated ears. The infection process was surveyed during 14 days at three key grain developmental stages in comparison to control plants: cell division, cell differentiation, and grain filling (Fig. 1a). As a whole, 10 infected and 10 control ears were randomly harvested at 3, 7, and 14 days after inoculation (dai) and immediately frozen in liquid nitrogen. The grains of control and inoculated ears were dissected and ground under liquid nitrogen. Samples were stored at −80 °C until proteomic analysis.

Fg biomass quantification and *Fg*Tri-5 expression

Relative *F. graminearum* biomass quantification was performed on the genomic DNA by using qPCR. The DNA was extracted from 250 mg fresh material according to Rogers and Bendich (1994). DNA quality and concentration were inspected on a Nanodrop system (ThermoScientific, Bonn, Germany). For qPCR, the samples were prepared using the 480 Syber Green I Master Kit (Roche Diagnostics, Mannhein, Germany) according to the manufacturer protocol and carried out according to the following protocol: denaturation at 95 °C for 5 min, 35 repeats of 95 °C for 10 s, 60 °C for 20 s and 72 °C for 20 s. A melting curve analysis was conducted from 55 °C-95 °C in 0.5 °C steps and 10 s dwell time to confirm the amplification of single amplicons. The amplicon size was confirmed on a 2 % agarose gel. The ratio of *F. graminearum (Fg)* to *T. aestivum (Ta)* gDNA was determined by qPCR by using primers amplified *FgIGS* (Inter Genic Spacer) and *Ta*18S (ribosomal DNA), respectively. The *FgTRI5* (gene coding for the trichodiene synthase) expression was followed to assess the induction of trichothecene pathway (mycotoxins biosynthesis) during grain colonization (Ilgen et al. 2009; Jurado et al. 2005). Total RNA was extracted from approximately 250 mg bulk grains using the phenol/chloroform/isoamylic treatment (Bogorad 1983). Then, the RNA was precipitated using isopropanol. DNAse I treatment was applied to remove contaminating genomic DNA. First strand cDNA was synthesized with 1 μg of purified RNA using the iScript reverse transcriptase (Biorad kit). The *TaRLI* (RNase L inhibitor protein) served as reference gene (Giménez et al. 2011). The primers used for qPCR in this analysis are listed in Table 1S. The ratio *FgIGS* to *Ta18S* and the ratio *FgTri5* to *TaRLI* were calculated using the ΔCt method (Pfaffl 2001).

Proteomics analysis and proteins identification by mass spectrometry (LC-MS/MS)

Protein samples were extracted using the TCA/acetone procedure described by Wang (Wang et al. 1996). The Bradford method was used to quantify protein concentration with BSA as standard (Bradford 1976). Two-dimensional electrophoresis was achieved by using 300 μg of solubilized protein sample. Following IEF and equilibration, the second separation was performed using 24-cm wide gels; the strips were positioned on top

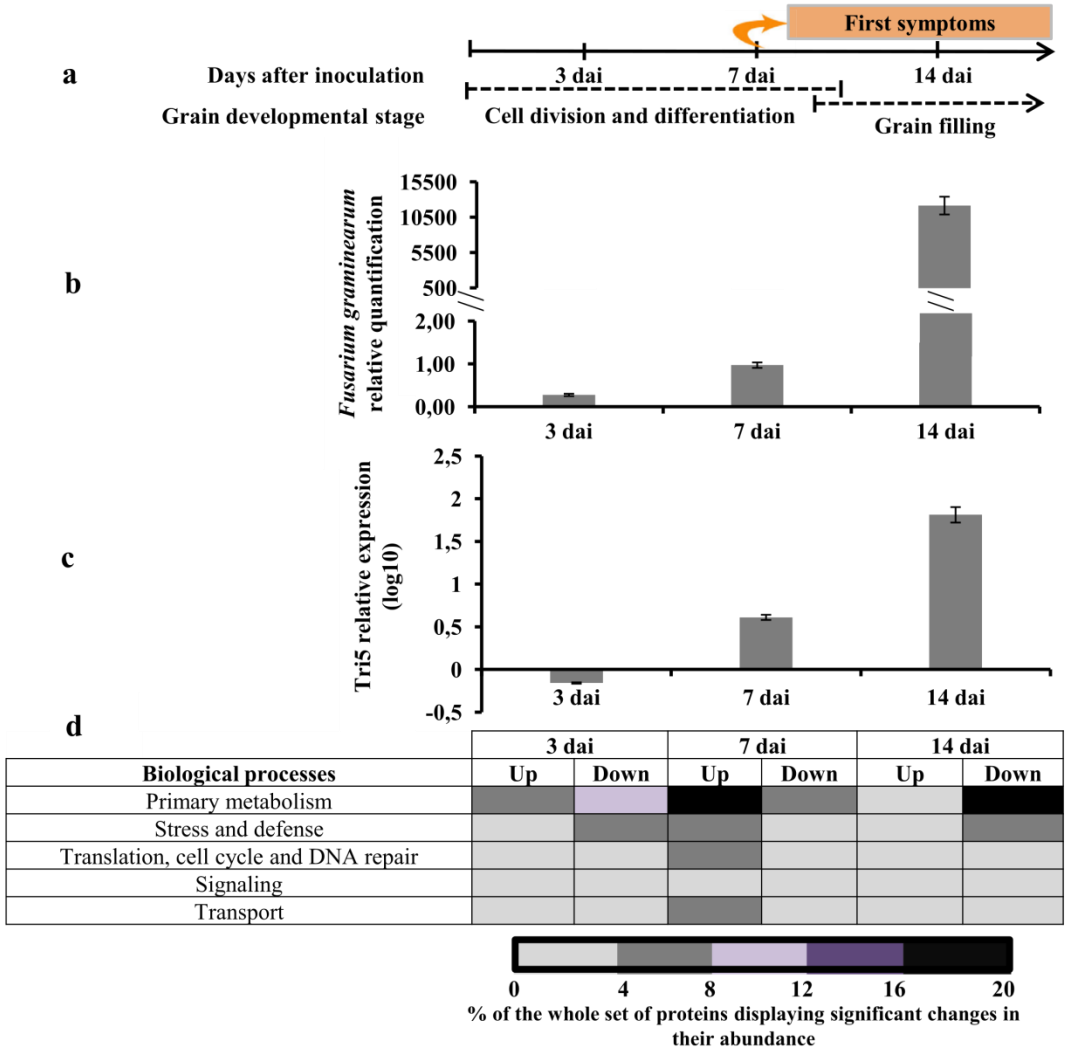

Fig. 1 Impact of *Fusarium graminearum* on wheat grain tissue. (**a**) Symptoms observed during susceptibility responses to *Fusarium graminearum* at the three time points of infection in wheat grains (3, 7, 14 days after inoculation; 3, 7, 14 dai), (**b**) and (**c**) *F. graminearum* biomass quantification and FgTri5 relative gene expression assessed at 3, 7 and 14 dai by using qPCR method, (**d**) distribution of the differentially regulated proteins according to the biological processes

of a 14 % polyacrylamide gel in the presence of SDS and sealed with 0.5 % agarose. The gels were run for 30 min at 5 watts per gel followed by 6 h at 10 watts per gel. The gels were then stained using colloidal blue brilliant coomassie CBB G-250 (Sigma, St. Louis, MO, USA) according to Rabilloud (2002). As a whole, four 2-DE gels were run for each treatment from two protein extractions of the 10 pooled ears collected during each experimented year. Gels were scanned with a G-800 scanner (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) at 300 dpi and 16-bit grayscale. Image analysis was achieved using Samespots software v4.1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). After spot detection and spot matching, spot intensities were normalized in Progenesis PG240 software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) using the total quantity in valid spot method: the quantity of each spot in the gel is divided by the total quantity of all spots in the reference gel. An ANOVA test was then performed on the log-normalized quantities. Spots of interest that were deemed significant ($P \leq 0.05$) for any abundance changes were excised, destained and trypsin-digested as described in Nadaud et al. (2010). LC-MS/MS analysis was performed using the Ultimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 15 cm nanocapillary columns of an internal diameter of 75 μm (Acclaim Pep

Map RSLC, Dionex). The solvent gradient was run from 4 to 50 % acetonitrile in 0.5 % formic acid at a flow rate of 300 nl min^{-1} for 30 min. Peptides were electrosprayed into an LTQ Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) through a nanoelectrospray ion source. The LTQ Velos was operated in a CID top 10 mode (i.e. one full scan MS from which ten major peaks are selected for MS/MS fragmentation). Xcalibur interface was used to monitor data-dependent acquisition of peptide ions. Database searches were achieved using X!Tandem (http://www.thegpm.org/TANDEM). For protein identification, the wheat and *Brachypodium* protein databases were combined with *Fg* database (*Fusarium graminearum* Genome Database V3.2, 2011/03/27; http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/FGDB/) and completed to common contaminants. Protein identification was parsed and validated using the X!Tandem Pipeline tool when at least two peptides originating from a single protein were significant (http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/).

Results

Fg development on wheat grain tissue

The *Fg*-induced responses were surveyed at three key grain developmental stages over a 14-days period (Fig. 1a). During the earliest stage at 3 dai, no obvious symptoms were observed on inoculated spikes while the *FgIGS* qPCR quantification enables a faint detection of *Fg* (Fig. 1b). However at 7 dai, a 3-fold increase of *Fg* biomass occurred along with the appearance of symptoms reaching some of the spikelets and some of the grains. A weak detection of *FgTri5* transcript was also observed, indicating the synthesis of the deoxynivalenol mycotoxin (DON) (Fig. 1c). Finally, at 14 dai, the ears were thoroughly infected and the grains were massively colonized by *Fg* (Fig. 1 and 1S); *FgIGS* quantification depicted abundance 12.000 times greater as 7 dai while *FgTri5* displayed a 15-fold increase.

Comparative analysis of the wheat grain proteome during a time course of *Fg* infection

2-DE gels were analyzed at each developmental stage to detect grain proteins that were reproducibly regulated in response to *Fg* inoculation over the two experimental years. About 2000 protein spots were resolved on all proteome maps. Comparison of protein abundance patterns between control plants versus infected plants at the same developmental stage showed that most of the protein spots did not display any change in their abundance. As a whole, 22 protein spots displayed significant abundance changes at 3 dai, 32 were detected at 7 dai and 21 at 14 dai; noteworthy, each was specific to the developmental stage. Out of these 75 *Fg*-responsive protein spots (Fig. 2S), 73 were successfully identified by LC-MS/MS, 36 were up-regulated (7 at 3 dai, 25 at 7 dai and 4 at 14 dai) whereas 37 were down-regulated (13 at 3 dai, 7 at 7 dai and 17 at 14 dai) (Table 1) . The identification results are listed in Table 1 (see Table 2S and 3S for details). Changes detected at 3 dai and 14 dai gathered mainly decreasing protein abundances (31 out of 43 spots) while changes induced at 7 dai gathered mainly increasing protein abundances (Fig. 3S).

To investigate which biological processes the differentially regulated proteins may be involved in, we classified proteins according to the functional categories previously defined in the functional catalogue recently published (Tasleem-Tahir et al. 2012). In our study, responsive proteins to *Fg* infection belonged to five main functional groups including primary metabolism (60 %), translation, cell cycle and DNA repair (19 %), stress and defence (15 %), transport (5 %) and signalling (1 %) (Table 1, Fig. 1d). Whatever the developmental stage, the primary metabolism group was the most widely impacted process including proteins involved in carbohydrate metabolism, storage proteins, energy metabolism, amino acids and fatty acids metabolism. Moreover, the primary metabolism group gathered 16, 26 and 18 % of the whole regulated protein set at 3 dai, 7 dai and 14 dai, respectively. At 3 dai, changes concerned both increasing and decreasing protein abundances, while 7 dai and 14 dai, the changes consisted of contrasted trends, including mostly up-regulation at 7 dai and mostly down-regulation in the latter stage (Fig. 1d). In the stress and defence protein group, 11 proteins displayed changes in their abundance during *Fg* infection. They gathered nearly 10 % of the whole regulated protein set detected at 3 dai and 14 dai, and less than 5 % at 7 dai. Most of them were down-regulated especially at 3 dai and 14 dai while those detected at 7 dai were all up-regulated. Other proteins related to transport, signalling, translation and cell cycle control including DNA repair and cellular organization were also differentially regulated. Within these functional groups, most of the responsive proteins displayed increasing abundances

Table 1 List of grain proteins displaying significant changes in their abundance as a consequence of *Fg* inoculation. U: up-regulated proteins, D: down regulated proteins after *Fg* inoculation

Spot Id	Protein description	Log$_2$ Ratio (±SD) 3 dai	7 dai	14 dai	Functional category	Accession number
	Primary metabolism					
174	Pyruvate,orthophosphate dikinase	-1,17(±0,01)	NS	NS	Pyruvate metabolism	Bradi2g25745.1
215	plastid alpha-1,4-glucan phosphorylase (Pho1)	0,97(±0,07)	NS	NS	Polysaccharides catabolism	B2LXU4
219	plastid alpha-1,4-glucan phosphorylase (Pho1)	0,98(±0,07)	NS	NS	Polysaccharides catabolism	B2LXU4
322	Glutaminyl-tRNA synthetase	-1,26(±0,09)	NS	NS	AA metabolism	Bradi2g05460.1
358	HMW-glutenin By subunit	NS	-0,95(±0,07)	NS	Storage protein	Q6UJY7
367	methionine-tRNA ligase activity,ATP binding	NS	NS	0,66(±0,007)	AA metabolism	Bradi1g69880.1
402	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	NS	0,61(±0,05)	NS	Energy metabolism	P12862
487	Starch synthase 1, chloroplastic amyloplastic	NS	NS	-1,01(±0,01)	Starch synthesis	Q43654
502	Transketolase, thiamine diphosphate binding domain	NS	NS	-0,6(±0,01)	Energy metabolism	Bradi1g51670.1
506	Transketolase, thiamine diphosphate binding domain	NS	NS	-0,61(±0,07)	Energy metabolism	Bradi1g51670.1
684	Phosphoglucomutase	NS	NS	-1,58(±0,02)	Glucose metabolism	Q8VX48
715	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	NS	0,86(±0,0001)	NS	Energy metabolism	P12112
731	Succinate-CoA ligase activity	NS	NS	-0,713(±0,05)	C3 and C4 cycle	Bradi1g07020.1
770	Methylenetetrahydrofolate reductase	NS	0,91(±0,001)	NS	AA metabolism	A6XMY8
823	glutathione-disulfide reductase activity	NS	-0,59(±0,05)	NS	Energy metabolism	Q6UQ06
829	Acetohydroxyacid synthase	NS	0,91(±0,07)	NS	Energy metabolism	Q84U05
842	ketol-acid reductoisomerase activity	NS	NS	-1,2(±0,16)	AA metabolism	Bradi2g15790.1
870	Pyruvate,orthophosphate dikinase	-0,4(±0,0001)	NS	NS	Pyruvate metabolism	Bradi2g25745.1
959	Cytosolic glutathione reductase	NS	NS	-0,62(±0,07)	Energy metabolism	Q6UQ06
980	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	NS	NS	-0,92(±0,04)	Starch synthesis	Q7XJA9
1032	glutathione-disulfide reductase activity	NS	0,9(±0,0)	NS	Energy metabolism	Q6UQ06
1061	Phosphoglycerate kinase, cytosolic	NS	NS	-0,81(±0,03)	C3 and C4 cycle	P12783
1134	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	NS	0,63(±0,001)	NS	Starch synthesis	P12299
1392	Low molecular weight glutenin subunit	NS	-0,86(±0,01)	NS	Storage protein	B2Y2Q1
1400	Glutamine synthetase	NS	NS	-0,8(±0,02)	AA metabolism	Q6RUJ1
1425	Aspartate aminotransferase/Glutamic oxaloacetic tra nsaminase AAT1/GOT2	-0,8(±0,15)	NS	NS	AA metabolism	Bradi3g09050.3
1474	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NS	0,54(±0,05)	NS	Glycolysis	C7C4X1
1478	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NS	0,82(±0,03)	NS	Glycolysis	C7C4X1
939	transcription corepressor activity, phosphopyruvate hydratase activity	NS	NS	-1,08(±0,01)	Glycolysis	Bradi3g22550
1496	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	-0,74(±0,03)	NS	NS	Xylose biosynthesis	Bradi1g66440.1
1548	Malate dehydrogenase	NS	0,98(±0,13)	NS	C3 and C4 cycle	A3KLL4
1549	Aestivum stearoyl-ACP desaturase	NS	0,61(±0,06)	NS	Fatty acid metabolism	E9N9R5
1577	High-molecular-weight glutenin subunit	NS	NS	-0,56(±0,08)	Storage protein	A9ZMG8
1594	Fructose-bisphosphate aldolase	-0,86(±0,06)	NS	NS	Glycolysis	C1J959
1602	LMW-GS	NS	NS	-0,7(±0,07)	Storage protein	H6VLQ4
1662	NAD-dependent malate dehydrogenase	-0,86(±0,03)	NS	NS	C3 and C4 cycle	Bradi2g15740.1
1733	S-malonyltransferase	0,72(±0,06)	NS	NS	Energy metabolism	Bradi1g65140.2
1931	Globulin 1 OS	NS	-0,89(±0,08)	NS	Storage protein	Q0Q5D4
1991	SUGAR-1-PHOSPHATE GUANYL TRANSFERASE	NS	0,43(±0,06)	NS	Lipopolysaccharide biosynthesis	Bradi1g19770.1
2034	SUGAR-1-PHOSPHATE GUANYL TRANSFERASE	NS	-1(±0,02)	NS	Lipopolysaccharide biosynthesis	Bradi1g19770.1
2064	oxidoreductase activity/NAD or NADH binding	NS	0,67(±0,03)	NS	Energy metabolism	Bradi2g20370.1
2227	Aci-reductone-dioxygenase-like protein	NS	0,65(±0,08)	NS	AA metabolism	C4PK50
2346	lactoylglutathione lyase/metal ion binding	0,8(±0,09)	NS	NS	Energy metabolism	Bradi5g03830.1
2448	Triticin	0,61(±0,01)	NS	NS	Storage protein	B2CGM6
	Stress and defense					
352	Molecular chaperone (HSP90 family)	-1,22(±0,06)	NS	NS	Protein folding	Bradi4g06370.1
379	Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases	-1,09(±0,15)	NS	NS	Protein folding	I1IA06
435	Molecular chaperone (HSP90 family)	-0,91(±0,03)	NS	NS	Protein folding	Bradi4g32941.1
602	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)	NS	NS	-1,37(±0,005)	Stress and defense	Q9LD25
628	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase	NS	NS	-0,72(±0,08)	Protein folding	Q43207
641	Heat shock protein 70	NS	NS	-1,44(±0,05)	Protein folding	C3V133
907	Chaperonin complex component, TCP-1 beta subunit (CCT2)	-1,09(±0,17)	NS	NS	Protein folding	I1HGE3
1173	Putative PDI-like protein	NS	0,58(±0,04)	NS	Cell redox homeostasis	D8L9B4
2517	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	NS	1,03(±0,005)	NS	Protein folding	A7XDG5
2598	thioredoxin peroxidase activity/oxidoreductase activity/antioxidant activity	NS	NS	0,67(±0,02)	Stress and defense	Bradi2g46380
2678	Response to stress	NS	0,62(±0,054)	NS	Stress and defense	Bradi2g23560.1
	Translation, cell cycle and DNA repair					
414	Ribonucleotide reductase, barrel domain/ATP binding	NS	NS	-0,75(±0,005)	DNA replication	Bradi1g48170.1
1021	Alpha tubulin-3A	NS	0,59(±0,09)	NS	Cytoskeleton Structure	A4K4Y4
1178	Mitochondrial translation elongation factor Tu	NS	0,97(±0,04)	NS	Translation	I1IB68
1222	ATP-dependent 5'-3' DNA helicase activity	NS	0,51(±0,18)	NS	DNA replication	I1GwP1
1513	Mitotic spindle checkpoint protein BUB3, WD repeat superfamily	-0,75(±0,07)	NS	NS	Cell Cycle	gi|357121328
1634	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta	-0,65(±0,06)	NS	NS	Translation	O24473
1797	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	NS	0,62(±0,03)	NS	Translation	I1IDB7
2464	Eukaryotic translation initiation factor 5A3	NS	0,56(±0,04)	NS	Translation	Q3S4H9
2471	Eukaryotic translation initiation factor 5A3	0,73(±0,05)	NS	NS	Translation	Q3S4H9
2576	Uncharacterized protein	1,07(±0,03)	NS	NS	Translation	I1I0C2
2620	small subunit ribosomal protein S12e	NS	0,52(±0,03)	NS	Translation	I1GMJ6
3052	small subunit ribosomal protein S21e		NS	1,14(±0,04)	Translation	I1GMJ6
	Signaling					
2118	laminin receptor activity	NS	-0,86(±0,006)		Signaling	Bradi1g60310.1
	Transport					
744	Vesicle trafficking protein Sly1 (Sec1 family)	NS	0,79(±0,18)	NS	Transport	Bradi5g24240.1
1083	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism	NS	0,89(±0,01)	NS	Transport	Bradi1g34170
2069	Voltage dependent anion channel (VDAC)	NS	0,61(±0,01)	NS	Transport	Q41591
2139	Clathrin adaptor complex	NS	NS	1,07(±0,05)	Transport	Bradi3g34620.1
	No annotation					
1728	Polypeptide: ORF	NS	-0,89(±0,04)	NS	uncharacterized	Bradi5g12080.1

NS Non-significant
Up regulated protein
Down regulated protein

during the whole infection kinetics and were specifically over-represented at 7 dai (Fig. 1d, Fig. 2).

To assess connections and discrepancies with previously published studies, we compared our results to three 2-DE works which have investigated the *Fg*/wheat interaction but under contrasting conditions (different wheat cultivars and *Fg* strains, other sampling points and different tissues) (Dornez et al. 2010; Ding et al.

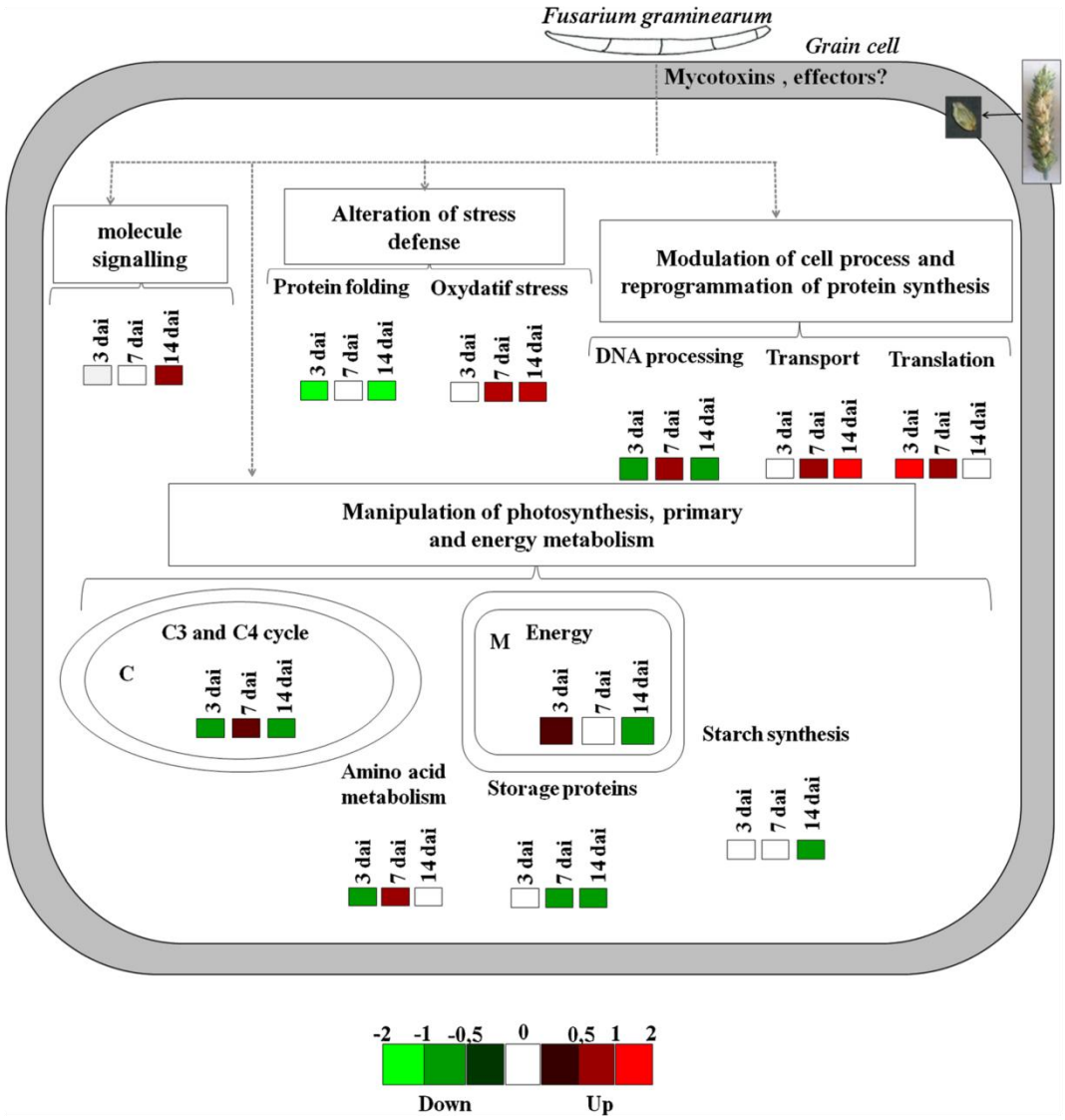

Fig. 2 Schematic representation of the main FHB-related changes in proteome patterns. Magnitudes of changes are depicted for each biological process at the three time points of *Fusarium graminearum* infection in wheat grains (3, 7, 14 days after inoculation; 3, 7, 14 dai). In red: Up regulated pathway, In green: down regulated pathway

2011; Yang et al. 2013) (Fig. 3) (Table 4Sa, 4Sb and 5S). Dornez et al. (2010) identified 39 protein spots differentially expressed during time course of infection (5, 15, and 25 days post anthesis) on susceptible grains of Bobwhite cultivar inoculated with ΔTri5*Fg* strain (no production of mycotoxins). Ding et al. (2011) used two contrasting genotypes (a resistant and a susceptible one) and identified 77 *Fg*-responsive proteins at 12 hpi; 64 were detected in the susceptible genotype and 65 in the resistant one including 52 common proteins. Finally, Zhang et al. (2013) focused on NILs contrasting in *Fhb1* alleles and identified 32 differentially regulated proteins in response to *Fg* inoculation. The comparison of our study with these three studies (Dornez et al. 2010; Ding et al. 2011 and Zhang et al. 2013) revealed only three common proteins (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase and elongation factor Tu). This low consistency can be explained by the fact that the plant genetic backgrounds (resistant and susceptible cultivars) and the harvested tissues (spikes, spikelets and grains) were different, as well as the *Fg* strain and the inoculation procedure (spraying or

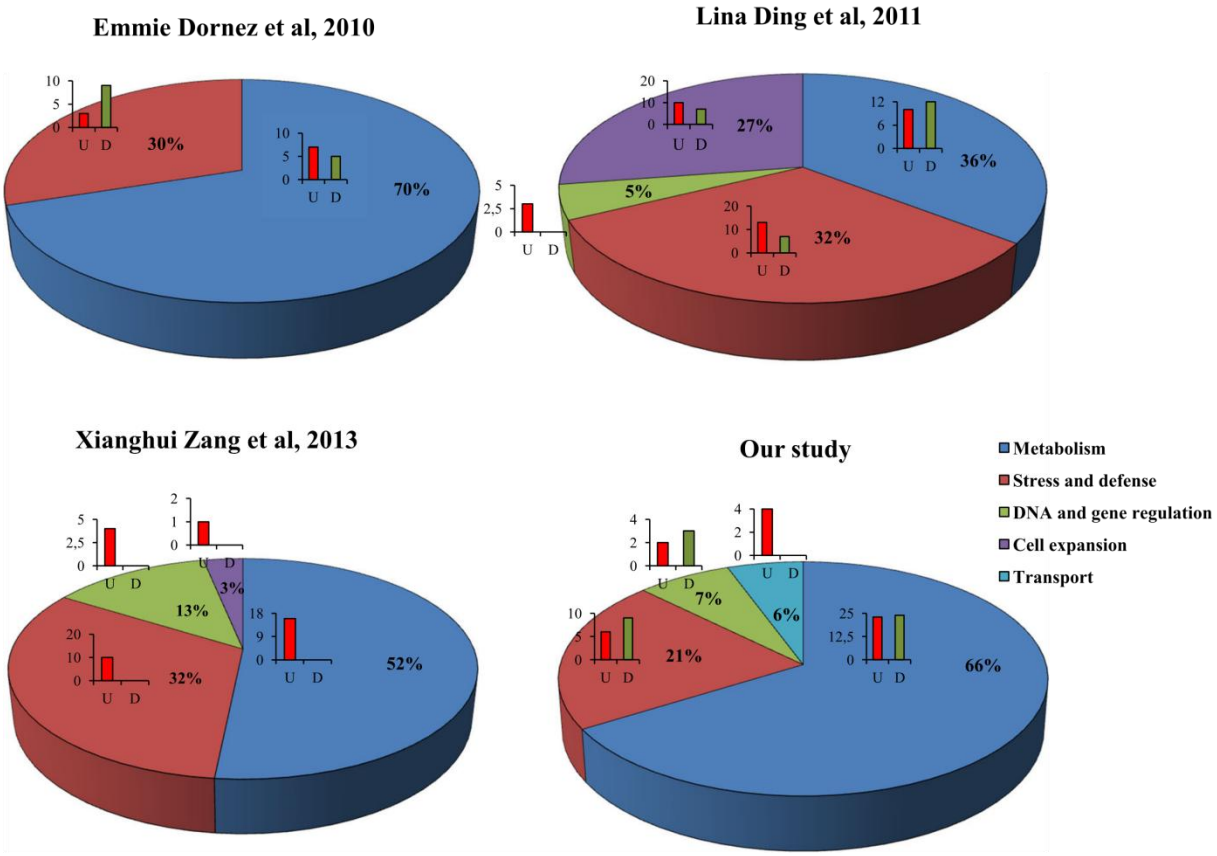

Fig. 3 Comparative analysis of three studies published in 2010, 2011 and 2013 on the Fg / wheat interaction. Identified proteins were grouped into five biological processes. The histograms show the number of proteins which were up (*in red*) or down (*in green*) regulated in each biological process

injection). However, the classification of these proteins into biological processes showed that several identified proteins were involved in the same biochemical pathways, including metabolism, stress and defence, DNA and gene regulation, and cell expansion. This result strengthens the possible involvement of these pathways in FHB responses. Regardless of the study, primary metabolism and stress proteins always gathered the largest number of proteins (Fig. 3). Noteworthy, transport proteins were over-represented only in our study; we observed also an impact on grain filling stage via alteration of storage protein and starch synthesis such as observed in Ding et al. (2011) for only starch synthesis.

Discussion

To gain new knowledge about the FHB susceptibility, we traced plant molecular changes especially in the wheat grain tissue. We examined the dynamics of protein abundance changes induced by *Fg* infection and its outcome during grain development (i.e. grain formation). FHB-responsive proteins were surveyed over three pivotal growth stages of the wheat grain (cell division, cell differentiation and grain filling) as described by Nadaud et al. (2010) (Fig. 1a). The grain growth is controlled by a deep remodelling of protein patterns (Rogers and Bendich 1994; Evers and Millar 2002; Nadaud et al. 2010). Therefore, FHB-induced changes were examined within a specific fluctuating molecular context which includes: (i) increasing amounts of proteins involved in cell wall initiation and energy production at the early cell division stage, (ii) varying abundances of proteins involved in carbohydrate metabolism and stress responses during cell differentiation stage, and (iii) accumulation of starch and storage proteins upon the latter stage consisting in grain filling (Nadaud et al. 2010). As already reported in *Fg*-infected barley grains (Zantinge 2010; Yang et al. 2010a, 2010b), we noticed that grain protein patterns

were slightly impacted by *Fg* inoculation at the three ontogeny stages studied here. This result suggests that the infectious process did not involve dramatic modification in grain development or even preserved grain ontogeny in spite of an established biotic stress. Among significant grain proteome remodelling, *Fg*-induced changes depended mainly on grain ontogeny and all were connected directly or indirectly with grain developmental process. This supports the idea that FHB-related responses summon up some specific biochemical processes according to the molecular context of the grain formation. Interestingly, the stage of cell differentiation (7 dai) appeared as a pivotal step during the FHB plant response. This stage gathered the largest number of protein abundance changes, along with the highest tri5 gene expression relative to *Fg* biomass amount and it marked the detection of visible symptoms. Additionally, the number of proteins which were up-regulated was larger than the number of down-regulated proteins while the two other stages (3 dai and 14 dai) included mainly down-regulated ones. Cell differentiation stage is a hinge step to reach grain filling (Tasleem-Tahir et al. 2012) and obviously a key step in the infectious process. Most of the metabolic changes and cell process-related adjustments (transport, translation DNA processing and oxidative stress) triggered by *Fg* were detected at this stage (Fig. 2) and noticeably, usual processes involved in grain growth such as carbohydrate metabolism and stress responses were maintained. This finding provides evidence that FHB establishment is closely embedded with wheat grain ontogeny. A similar result was obtained by 2-D DIGE which showed that the expression of wheat xylanase inhibitor protein families during *Fg* infection is dependent on the development stage of the grain (Dornez et al. 2010) which were less abundant at the early stages of the grain development.

Despite the detection of *Fg* by qPCR method (Fig. 1b) and the induction of Tri5 gene involved in TCT biosynthesis (Fig. 1c), no differentially regulated Fg protein was detected in our study. At the early stages of infection (day 3 to day 7), this could be due to the very low amount of *Fg* proteins compared to grain proteins that did not reach the requirements of 2-DE methodology. At the late stage of infection (day 14), *Fg* proteins could probably be detected but obviously their changing abundance did not reach a sufficient level of statistical significance to be further identified by MS/MS. In infected grains, primary metabolism was overall deeply altered by *Fg* infection. Our results suggest that during the infection process, *Fg* induced specific changes in the regulatory pathways that control the primary metabolism at each stage of the grain development. By favouring *Fg* development in grain tissues, these responses could involve putative susceptibility factors tightly connected with grain ontogeny. Several studies investigating plant-pathogen interactions have already highlighted reprogramming of primary metabolism of the host plant (Jubault et al. 2013). Together with the concomitant down-regulation of proteins involved in starch biosynthesis and the storage proteins as well as the up-regulation of proteins involved in starch degradation (Fig. 2), these data suggest that the grain filling stage is impacted by the FHB infection and possibly controlled by *Fg* to fulfill its own requirements. While in a healthy grain, this stage is characterized by starch protein accumulation with the involvement of sucrose synthase, ADP glucose pyrophosphorylase, starch branching enzyme and starch synthesis (Kang et al. 2006), *Fg* could take advantage of starch and storage protein remobilization to sustain the establishment of the carbon metabolic sink in infected wheat grains. Similar observations were reported in a proteomic study focusing on the grains of naked barley infected by *Fg* (Yang et al. 2010a, 2010b). Furthermore, *Fg* secretome analysis using growth culture with barley or wheat flour as the sole nutrient source in order to mimic the nutritional situation of the fungus in *planta* revealed 69 unique fungal proteins involved in starch and protein degradation (Yang et al. 2012). Likewise and possibly for the same reason, energy production mechanisms were also changed upon *Fg* inoculation including the up-regulation of cellular respiration and the induction of glycolysis. The increase of energy metabolism was also reported in susceptible barley inoculated by *Fg* 48 h after inoculation (Yang et al. 2010a, 2010b). Together, these data do not negate the hypothesis that the wheat grain primary metabolism alteration could be either the result of pathogen manipulation (Yang et al. 2012), or an intrinsic plant host response (Kugler et al. 2013) or some combination of both (Jubault et al. 2013) that refers to a susceptibility factor.

The chaperones proteins involved in stress response were mainly found as down-regulated while they are usually mobilized to counter stressful physiological states. These proteins (such as Hsp90) play an important role in triggering immunity of plants (Hubert et al. 2003). So their down regulations could delay or prevent

the activation of defence mechanisms (Hubert et al. 2003) and support also their possible involvement as susceptibility factors. Ding et al. (2011) suggest that the wheat susceptibility to *Fg* infection is related to the delay of defence mechanisms activation via the shift in the salicylic acid pathway activation. In this study, we showed that several proteins involved in oxidative stress such as the cell redox homeostasis proteins increased in infected grains. The same work in barley infected by *Fg* fungus revealed the enhancement of the oxidative stress in the susceptible genotypes (Yang et al. 2010a, 2010b) but no changes in proteins associated with oxidative response were observed in resistant genotypes (Geddes et al. 2008). Considering our results, we suggest that the enhancement of the oxidative stress contributes actively to the grain susceptibility to *Fg* infection. Furthermore, the down regulation of phenylalanine ammonia lyases (PAL), which catalyze the transformation of phenylalanine to trans-cinnamate in the first dedicated step in the biosynthesis of phenylpropanoids and lignin suggests that the susceptibility to FHB could be linked to the prevention of cell wall thickening in the infected grains which facilitates the degradation of plant cell wall and fungal penetration. Although found in fewer proportion, *Fg*-induced changes involved also other cell processes including transport, signalling, translation, cell cycle, stress response and DNA replication. Noteworthy, some of these changes did not happen as they could be expected during abiotic stress or during healthy grain growth which presume specific patterns in changes induced by *Fg* infection on the wheat grains.

In conclusion, understanding the molecular and physiological basis of wheat susceptibility to *Fg* infection represents a major challenge in FHB control. In the present study, we provide new data on the susceptible wheat response to FHB during different stages of the grain development. Modifications in primary metabolism (starch metabolism, energy production, storage proteins, amino acids metabolism), in the host cellular processes (transport, translation, DNA processing) and singular molecular patterns involved in stress and defence mechanisms (triggering immunity, thickening of cell wall) provide further informations on the molecular determinism controlling FHB susceptibility in wheat. This first proteome dynamics of the interaction between wheat grain and *Fusarium graminearum* fungus will be combined with a deeper analysis of cellular expression pattern, the characterization of different mutants and biochemical investigations to specifically trace wheat-responsive proteins involved in FHB susceptibility in grains. Finally, our results strengthen the hypothesis that FHB susceptibility factors allow *Fg* to create an appropriate metabolic environment in the grain tissue to favour its own development and further, to support its dissemination.

Acknowledgments We thank members of the Experimental Unit INRA 1375 PHACC (INRA Center of Clermont-Theix, France) for plants production, Christophe Chambon and Didier Viala from PFEM (INRA Center of Clermont-Theix, France) for mass spectrometry analyses. This study is part of CC PhD work, funded by the French National Institute for Agronomic Research (INRA).

References

Bai, G., & Shaner, G. (2004). Management and resistance in wheat and barley to *fusarium* head blight. *Annual Review of Phytopathology, 42*, 135–161.

Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology, 108*(7), 611–624.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248–254.

Buerstmayr, H., Steiner, B., Hartl, L., Griesser, M., Angerer, N., Lengauer, D., Miedaner, T., Schneider, B., & Lemmens, M. (2003). Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. resistance to fungal penetration and spread. *Theoretical and Applied Genetics, 107*, 503–508.

Buerstmayr, H., Ban, T., & Anderson, J. A. (2009). QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: A review. *Plant Breeding, 128*(1), 1–26.

Cuthbert, P. A., Somers, D. J., Thomas, J., Cloutier, S., & Brulé-Babel, A. (2006). Fine mapping Fhb1, a major gene controlling *fusarium* head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics, 112*(8), 1465–1472.

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*(4), e19008.

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* DeltaTri5 infection and grain development. *Proteomics, 10*(12), 2303–2319.

Eckardt, N. A. (2002). Plant disease susceptibility genes? *The Plant Cell, 14*(9), 1983–1986.

Evers, T., & Millar, S. (2002). Cereal grain structure and development: Some implications for quality. *Journal of Cereal Science, 36*(3), 261–284.

Geddes, J., Eudes, F., Laroche, A., & Selinger, L. B. (2008). Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, Hordeum vulgare. *Proteomics, 8*(3), 545–554.

Giménez, M. J., Pistón, F., & Atienza, S. G. (2011). Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. *Planta, 233*(1), 163–173.

González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., & Bouarab, K. (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant Cell, 24*(2), 762–777.

Goswami, R. S., & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology, 5*(6), 515–525.

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.

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.

Hamzehzarghani, H., Kushalappa, A. C., Dion, Y., Rioux, S., Comeau, A., Yaylayan, V., & Mather, D. E. (2005). Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against *fusarium* head blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 66*(4), 119–133.

Hubert, D. A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., & Dangl, J. L. (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *The EMBO Journal, 22*(21), 5679–5689.

Ilgen, P., Hadeler, 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*(8), 899–908. doi:10.1094/MPMI-22-8-0899.

Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., & Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102*(46), 16892–16897. doi:10.1073/pnas.0508467102.

Jubault, M., Lariagon, C., Taconnat, L., Renou, J.-P., Gravot, A., Delourme, R., & Manzanares-Dauleux, M. J. (2013). Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. *Functional & Integrative Genomics, 13*(2), 191–205.

Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B., & González-Jaén, M. T. (2005). PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology, 28*(6), 562–568.

Kang, G.-Z., Wang, Y.-H., Guo, T.-C., Zhu, Y.-J., & Guan, C.-Y. (2006). Key enzymes in starch synthesis in plants. *Zhongguo Yi Chuan Xue Hui Bian Ji, 28*(1), 110–116.

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.

Lawrence Bogorad, E. J. G. (1983). [17] Cloning and physical mapping of maize plastid genes. *Methods in Enzymology, 97*, 524–554. doi:10.1016/0076-6879(83)97160-4.

Li, S., Ji, R., Dudler, R., Yong, M., Deng, Q., Wang, Z., & Hu, D. (2013). Wheat gene TaS3 contributes to powdery mildew susceptibility. *Plant Cell Reports*. doi:10.1007/s00299-013-1501-7.

Ma, H., Bai, G., Gill, G., & Hart, L. (2006). Deletion of a chromosome arm altered wheat resistance to *fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in chinese spring. *Plant Disease, 90*, 1545–1549.

Mesterházy, A. (1995). Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding, 114*(5), 377–386.

Miller, J. D., Young, J. C., & Sampson, D. R. (1985). Deoxynivalenol and Fusarium head blight resistance in spring cereals. *Journal of Phytopathology, 113*(4), 359–367.

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*(16), 2901–2910.

Pathuri, I. P., Reitberger, I. E., Hückelhoven, R., & Proels, R. K. (2011). Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus Blumeria graminis f.sp. hordei. *Journal of Experimental Botany, 62*(10), 3449–3457.

Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., & Bai, Y. (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding: New Strategies In Plant Improvement, 25*(1), 1–12.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research, 29*(9), e45.

Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics, 2*(1), 3–10.

Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1994). Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In S. B. Gelvin & R. A. Schilperoort (Eds.), *Plant molecular biology manual* (pp. 183–190). Netherlands: Springer.

Schroeder, H. W. (1963). Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae* (Schw.) Petch. doi:oclc/17921162

Tasleem-Tahir, A., Nadaud, I., Chambon, C., & Branlard, G. (2012). Expression profiling of starchy endosperm metabolic proteins at 21 stages of wheat grain development. *Journal of Proteome Research, 11*(5), 2754–2773.

Wang, K. K., Posner, A., & Hajimohammadreza, I. (1996). Total protein extraction from cultured cells for use in electrophoresis and western blotting. *BioTechniques, 20*(4), 662–668.

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.

Yang, F., Jensen, J. D., Spliid, N. H., Svensson, B., Jacobsen, S., Jørgensen, L. N., et al. (2010a). Investigation of the effect of

nitrogen on severity of *Fusarium* head blight in barley. *Journal of Proteomics, 73*(4), 743–752.

Yang, F., Jensen, J. D., Svensson, B., Jørgensen, H. J. L., Collinge, D. B., & Finnie, C. (2010b). Analysis of early events in the interaction between *Fusarium graminearum* and the susceptible barley (*Hordeum vulgare*) cultivar Scarlett. *Proteomics, 10*(21), 3748–3755.

Yang, F., Jensen, J. D., Svensson, B., Jørgensen, H. J. L., Collinge, D. B., & Finnie, C. (2012). Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. *Molecular Plant Pathology, 13*(5), 445–453.

Yang, F., Jacobsen, S., Jørgensen, H. J. L., Collinge, D. B., Svensson, B., & Finnie, C. (2013). *Fusarium graminearum* and its interactions with cereal heads: Studies in the proteomics Era. *Frontiers in Plant Science, 4*, 37.

Zantinge, K. K. (2010). Comparison of barley seed proteomic profiles associated with *fusarium* head blight reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology, 32*(4), 496–512.

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.

Zhou, W. C., Kolb, F. L., Bai, G. H., Domier, L. L., & Yao, J. B. (2002). Effect of individual Sumai 3 chromosomes on resistance to scab spread within spikes and deoxynivalenol accumulation within kernels in wheat. *Hereditas, 137*(2), 81–89.

Zhou, W., Kolb, F. L., & Riechers, D. E. (2005). Identification of proteins induced or upregulated by Fusarium head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome, 48*(5), 770–780. doi:10.1139/g05-041.

CHAPITRE III : Analyse de la dynamique du transcriptome du grain de blé en développement infecté par le FHB

Les données récoltées dans l'analyse précédente nous ont permis d'obtenir une vision parcellaire de ce qui se passe dans le grain suite à une infection par le champignon *F. graminearum*. Afin d'obtenir une image plus large et encore plus informative sur les mécanismes et les fonctions impliqués dans la réponse au FHB, sur le lien entre le développement du grain et le processus infectieux de *F. graminearum*, nous avons réalisé une cinétique plus longue tout en gardant les trois premiers points de la cinétique d'infection précédente (infection modérée) analysés en protéomique, d'autres grains infectés ont été récoltés à 350°Cd (ou 21 JPI) et à 450°Cd (ou 26 JPI), c'est-à-dire à des points où les grains sont très attaqués par l'infection. Nous avons décidé de réaliser une analyse du transcriptome de ces échantillons par utilisation d'une puce spécifique blé disponible au sein de l'unité GDEC. Des travaux antérieurs au sein de l'unité ont permis l'utilisation de cette puce, ce qui a contribué à l'accumulation des données d'annotation fonctionnelle d'une grosse partie des gènes présents sur la puce (Capron et al., 2012 ; Vincent et al., 2013).

Les détails des résultats de cette partie sont présentés dans l'article : «***Transcriptome dynamics of a susceptible wheat upon Fusarium head blight reveals that molecular responses to Fusarium graminearum infection fits over the grain development processes***» accepté pour publication dans le journal *Functional Integrative Genomics*.

1-La puce Nimbelgen spécifique blé tendre

La puce à ADN spécifique blé (*T. aestivum* NimbleGen 12x40K arrays) a été conçue à l'INRA au sein de l'UMR GDEC en utilisant l'ensemble des unigènes de blé disponibles sur NCBI (# 55). Elle compte 40 349 unigènes résultant de l'assemblage de 960 174 séquences **(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=4565)**. 1471 séquences de facteurs de transcription ont été ajoutées à la conception de la puce. Toutes les séquences ont été masquées sur la base d'une analyse de fréquence k-mer. Une répétition de 17 mer-base définie mathématiquement selon Tallymer (Kurtz et al., 2008) en utilisant 2 Gb de reads obtenus par Illumina à partir du chromosomique 3B (Numéro d'accession : ERA000182). Ensuite, cette fréquence K-mer a été utilisée pour toutes les séquences UniGene. Dix-sept-mer-base répétées au moins cinq fois ont été masquées afin d'exclure les motifs répétés de la conception des sondes spotés sur la puce. Les séquences masquées ont été soumises à NimbleGen (Roche NimbleGen, Inc.) pour la conception des sondes. Au total, 39 179 unigènes étaient représentés par au moins une sonde de 60-mer : 39019 unigènes avec trois sondes, 78 avec deux sondes et 82 avec une sonde. Pour les facteurs de transcription, 1463 étaient représentés par au moins une sonde de 60-mer: 1460 avec trois sondes et 3 avec une sonde. Toutes ces sondes ont été synthétisées sur une

matrice de 12 × 135K. Récemment, une étude a estimé le nombre de gènes chez le blé à 124201 (International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), 2014). Ces gènes sont distribués d'une manière uniforme le long des chromosomes et des trois génomes A, B et D. Le nombre de gènes que renferme la puce d'ADN utilisée dans notre étude représente au moins un tiers des gènes annotés par IWGSC. Malgré cette différence entre le nombre de gènes totaux annotés sur la séquence génomique du blé et le nombre de gènes présents sur la puce d'ADN, ces gènes sont représentatifs des différentes familles et fonctions annotées sur le génome entier par IWGSC (Capron et al., 2012 ; Vincent et al., 2013).

2-Principaux résultats et conclusions

L'analyse de l'expression génique des grains de blé infectés à différent stade de leur développement a permis identifier 1309 gènes exprimés de manière différentielle. Parmi ceux-ci, 536 sont impliqués uniquement dans la réponse à l'infection et ne présentent aucune variation liée au développement du grain. La grande majorité de ces gènes appartenaient à des fonctions biologiques et moléculaires liées à des gènes de stress biotique et abiotique, indiquant ainsi, que la sensibilité du blé au FHB implique des voies communes aux deux stress. Ces gènes ont été déjà identifiés dans des études précédentes, comme les 414 gènes identifiés chez une plante d'orge sensible au FHB infectée par la souche de *F. graminearum*, largement impliqués dans les mécanismes de défense de base contre les agents phytopathogènes (Boddu et al., 2006) ou chez les blés infectés par *F. graminearum* (Kugler et al., 2013 ; Muhovski et al., 2012). Ce groupe de 536 gènes est également enrichi en gènes impliqués dans la détoxification des mycotoxines comme les UDP-Glycosyltransferase (UGT), les Glutathion S-transférase (GST) et les ABC transporteurs. Des résultats similaires d'études précédentes ont montré l'induction de ces gènes, ainsi Boddu et al, 2006 ont identifié 63 transcrits induits lors de l'accumulation des DON synthétisés par la souche *F. graminearum* mycotoxinogène. D'autres études chez *Brachypodium distachyon* (Pasquet et al., 2014) ou chez le blé (Al-Taweel et al., 2014) ont montré une induction de ces gènes en réponse à l'accumulation des DON dans les tissus infectés.

Cette analyse a révélé également 773 gènes impliqués à la fois dans la réponse au FHB, mais aussi dans le développement du grain. Ces gènes ont été impliqués dans diverses voies moléculaires et processus biologiques, une large partie de ces gènes sont impliqués directement dans le métabolisme primaire. Ces changements dans le métabolisme primaire de la plante sont essentiels au développement et à la croissance de l'agent pathogène dans les tissus végétaux infectés (Jubault et al. 2013). Ces modifications souvent induites par l'infection pourraient

favoriser l'acquisition des nutriments par l'agent pathogène (Bolton, 2009 ; Seifi et al., 2013). Cet emparement des ressources par l'agent *F. graminearum* dans le grain de blé se fait à des étapes clés qui sont directement liées au stade ontogénique du grain, d'où une expression génique différentielle au cours du développement du grain, mais aussi en réponse à l'inoculation. Plusieurs études portant sur l'impact du FHB sur des épis de blé ont montré un remodelage significatif du métabolisme primaire à la fois par des approches transcriptomiques (Kugler et al., 2013) et protéomiques (Ding et al., 2011 ; Chetouhi., 2015). D'autres études ont, quant à elles, évoqué l'interférence des DON synthétisés par *F. graminearum* avec le métabolisme primaire de la plante (Audenaert et al., 2014).

Finalement, cette analyse fournit de nombreux gènes candidats et voies impliqués dans l'installation du FHB sur un grain de blé et donne de nouveaux indices pour la compréhension du déterminisme moléculaire de la sensibilité du blé tendre à la fusariose de l'épi. Par ailleurs, cette étude conduit à l'établissement d'un premier catalogue d'unigènes exprimés spécifiquement dans le grain (en développement) infecté par le FHB qui pourrait à long terme être utilisé dans l'amélioration de la résistance du blé tendre à la fusariose.

Article de recherche 2

Transcriptome dynamics of a susceptible wheat upon *Fusarium* head blight reveals that molecular responses to *Fusarium graminearum* infection fit over the grain development processes

Cherif Chetouhi • Ludovic Bonhomme • Pauline Lasserre-Zuber • Florence Cambon • Sandra Pelletier • Jean-Pierre Renou • Thierry Langin

C. Chetouhi • L. Bonhomme* • P. Lasserre-Zuber • Florence Cambon • T. Langin*
INRA, UMR1095 GDEC Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, INRA, Clermont-Ferrand, France,
Université Blaise Pascal, Aubière, Clermont-Ferrand, France.
S. Pelletier • J. P. Renou
INRA, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, Angers, France

***Corresponding authors**
Dr. Ludovic Bonhomme; Dr. Thierry Langin
UMR1095 INRA-UBP, Génétique, Diversité et Écophysiologie des Céréales (GDEC),
5 Chemin de Beaulieu F-63039 cedex 2, FRANCE
Tel: (33) (0)4.73.62.49.97-e-mail: ludovic.bonhomme@clermont.inra.fr
Tel: (33) (0)4.73.62.44.47-e-mail: thierry.langin@clermont.inra.fr

Abstract

In many plant/pathogen interactions, host-susceptibility factors are key determinants of disease development promoting pathogen growth and spreading in plant tissues. In the *Fusarium* head blight disease (FHB), the molecular basis of wheat susceptibility is still poorly understood while it could provide new insights into the understanding of the wheat/*Fusarium graminearum* (*Fg*) interaction and guide future breeding programs to produce cultivars with sustainable resistance. To identify the wheat grain candidate genes, a genome-wide gene expression profiling was performed in the French susceptible wheat cultivar, Recital. Gene-specific two-ways ANOVA of about 40 K transcripts at five grain developmental stages, identified 1309 differentially expressed genes. Out of these, 536 were impacted by the *Fg* effect alone. Most of these *Fg*-responsive genes belonged to biological and molecular functions related to biotic and abiotic stresses indicating the activation of common stress pathways during susceptibility response of wheat grain to FHB. This analysis revealed also 773 other genes displaying either specific *Fg*-responsive profiles along with grain development stages or synergistic adjustments with the grain development effect. These genes were involved in various molecular pathways including primary metabolism, cell death and gene expression reprogramming. An increasingly complex host response was revealed, as was the impact of both *Fg* infection and grain ontogeny on the transcription of wheat genes. This analysis provides a wealth of candidate genes and pathways involved in susceptibility responses to FHB and depicts new clues to the understanding of the susceptibility determinism in plant/pathogen interactions.

Keywords *Fusarium graminearum • wheat • FHB • Susceptibility response • genome-wide transcriptomics.*

Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L) has become the second largest cereal crop worldwide just after rice. Used as a main source of protein and starch for human consumption, animal feed, industrial raw materials and biofuels, its yield is threatened by several diseases such as *Fusarium* head blight (FHB) primarily caused by the *Fusarium graminearum* (*Fg*) fungus (teleomorph *Gibberella Zeae*, Schwabe). FHB is a devastating disease affecting many cereals with small grains (McMullen et al. 1997) and one of the main causes of starch and storage protein losses in grains, that leads to severe decrease in grain quality (Sutton 1982). Furthermore, FHB constitutes a serious threat to human and animal health because of the production and accumulation of mycotoxins such as deoxynivalenol (DON) (Tuite et al. 1990). The ineffectiveness of the current tools in the prevention and the control of the FHB disease, as well as the absence of major resistance genes despite the hundreds of identified QTLs (Buerstmayr et al. 2003: Li et al. 2011; Zhu et al. 2012), require to deepen our knowledge regarding the biology of this specific interaction and on the molecular cross-talk promoting *Fg* invasion. Unlike resistant cultivars, in the susceptible ones, *Fg* fungus could take advantage of host-susceptibility factors to successfully complete its infectious cycle (Chetouhi et al. 2015). Up to now, the factors contributing to the *Fg* growth in wheat are still poorly understood while several host genes necessary for pathogen growth were already reported in other pathosystems (Jia et al. 2011; González-Lamothe et al. 2012). A loss of functional mutations of such genes has already been successful in providing durable and broad-spectrum plant resistance, making the susceptibility genes (S-genes) a promising source of resistance in breeding strategies. More than 30 potential host susceptibility factors, validated through either transient knock-down or over expression of the corresponding genes, were reported in the literature (Pavan et al. 2010). Among S-genes, *PMR6* and *MLO* genes were coding for susceptibility factors promoting growth of powdery mildews, *ADH1* gene modulates the susceptibility of *Hordei spp* plant to *Bulmeria graminis* fungus (Pathuri et al. 2011) and recently *IAA-Asp* gene was identified as susceptibility gene which promotes the development of *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* (González-Lamothe et al. 2012). Furthermore, studies have shown that some S-genes may be essential for the development of the plant as well as for the pathogen development and its installation. One example is the rice *Xa13* gene which is essential for the growth of the *Xanthomonas oryzae* bacteria and for plant pollen development (Chu et al. 2006). Recently, Brewer et al. (2014) showed that the homoserine kinase DMR1 mediated susceptibility mechanisms that occur during infection of *A. thaliana* by both *F. culmorum* and *F. graminearum*.

Although increasing knowledge is available, identifying S-genes still requires a better understanding of the molecular determinism of the plant-pathogen interacting system, including genome-wide approaches. Among transcriptomic studies performed on the wheat-*Fg* pathosystem, most provide a limited picture of the whole infection dynamics, prioritizing either on different stages of disease establishment or on organ specific responses (Golkari et al. 2007; Bernardo et al. 2007; Erayman et al. 2015). Although grains constitute the main target of FHB disease, no study has been interested in identifying and understanding *F*g-induced transcriptome adjustments along with the fluctuating molecular context of grain development. In healthy plants, grain ripening involves a fine-tuned control of cellular processes (Rogers and Bendich 1994; Evers and Millar 2002; Nadaud et al. 2010) that impacts grain physiology. The formation of the grain is defined by three specific phases: (i) the cell division and differentiation stage (0°Cd-165°Cd after anthesis) includes the formation of the main cell types (transfer cells, aleurone, starchy ndosperm and cells surrounding the embryo), (ii) the grain filling stage (195-450°Cd after

anthesis) starts with the deposition of starch and gluten proteins in endosperm cells, and (iii) the desiccation/maturation phase (Wan et al. 2008). The transition between these contrasted phases is finely regulated by gene expression and comes along with increasing grain size and weight. Abiotic stresses, such as heat or drought, are known to broadly impact wheat grain physiology (Ashraf 2014) but little is known about the molecular events occurring in *Fg*-infected grains. Recent publications refer to a possible link between the development of the grain and the development of FHB (Dornez et al. 2010; Chetouhi et al. 2015 ; Walter et al. 2015), while the whole molecular mechanisms involved in the colonization of the grain are still unknown.

Here, we report a comprehensive view of the mechanisms and main metabolic pathways impacted by FHB disease. Molecular changes were specifically traced in grain tissues of a susceptible wheat cultivar to gain new insights into plant susceptibility and related susceptibility factors. Using the GeneChip® Wheat Genome Nimblegen micro-array, we performed a genome-wide expression profile analysis at different pivotal stages of the wheat grain formation: (i) the cell division stage (50°Cd), the cell differentiation stage (150°Cd), the beginning of the grain filling stage (250°Cd) and the end of the grain filling (350°Cd, 450°Cd). A special attention has been paid for detecting development-dependent gene expression remodeling as a way to provide clues about the identification of susceptibility genes.

Materials and methods

Plant growth and Fusarium graminearum inoculation

During 2009 and 2010, a winter wheat cultivar, so-called "Recital", was grown in a greenhouse at the INRA Research Center of Clermont-Ferrand (France) without treatment and pesticide protection. Inoculation (*i.e.* infection) of wheat ears by the *F. graminearum Fg*1 strain was done at the flowering stage (~14 weeks after sowing), especially at mid-anthesis, when about 50% of the stamens were visible. The inoculum (50 µl at 10^5 spores per milliliter) was deposited by spraying on both sides of the ears. A mock treatment was realized by spraying water and served as negative control. After spraying, the control and the *Fg*-inoculated ears were covered with a bag for two hours to maintain sufficient moisture and to promote attachment of the *Fg*1 spores. The infection process was surveyed during 450°Cd (corresponding to about 26 days) after the *Fg* treatment and especially at five key grain developmental stages including cell division (50°Cd), cell differentiation (150°Cd), and grain filling stages (250°Cd, 350°Cd and 450°Cd) (**Fig. 1a**). As a whole, ten infected and ten control ears were randomly harvested at each stage, pooled and immediately frozen in liquid nitrogen. The grains of negative control and *Fg*-inoculated ears were dissected, ground under liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Total RNA extraction, Double-stranded cDNA Synthesis and Microarray design

Total RNA was extracted from 250 mg of the grain powder sample for each negative control and *Fg*-inoculated samples, using the method described by Bogorad et al with few adjustments (Bogorad et al. 1983). The RNA was treated with Turbo DNase (Ambion, AM1907) and its integrity was assessed using the RNA 6000 Nano assay bioanalyzer (Agilent). cDNA was synthesized from total RNA using the SuperScript Kit (Invitrogen) and labeled with fluorescent Cy3 and Cy5 dyes using a Two-Color DNA Labeling Kit (NimbleGen). Hybridization

was performed using the NimbleGen hybridization Kit, according to the manufacturer's instructions. Two technical replicates were achieved using either the Cy3 or Cy5 dye for each biological replicate. A wheat NimbleGen microarray (ref. A-MEXP-1928) was used for gene expression profile generation. Each microarray included 39,019 UniGene with three different probes per UniGene, 78 with two probes and 82 with one probe.

Microarray data normalization and statistical analysis

Microarray images were obtained with NimbleGen MS200 scanner. Scanning arrays were read with Deva software (v1.2.1). Microarrays were analyzed using the limma bioconductor package in the R environment (Smyth 2004). To control for any technical variation, the raw data were first normalized within arrays using loess package/method and then, normalized between arrays using the Aquantile method (Smyth and Speed 2003). To detect transcripts displaying significant abundance changes during the infection dynamics and to identify their connections with changes involved in grain development, we designed a 2-ways analysis of variance (ANOVA) using a linear model including the infection and the grain developmental stages as grouping factors. The model used was: $Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + T_i \times D_j + \varepsilon_{ijk}$; where Y_{ijk} refers to individual transcript abundance value, μ is the general mean, T_i is the effect of the treatment (i=2; control or infected), D_j is the effect of the development stage (j=5, 50°Cd, 150°Cd, 250°Cd, 350°Cd or 450°Cd), $T_i \times D_j$ is the infection by development stage interaction and ε_{ijk} *is the residual*. For each individual transcript, a q-value was calculated from the resulting p-values of each effect (T_i, D_j and $T_i \times D_j$). A 0.05 threshold was defined to deem transcript abundance changes significant (corresponding to a positive false-discovery rate at a 5% level) (ESM **Table S1a and b**).

Gene Ontology annotation of significant genes

The function of differentially expressed genes was annotated by performing a Blast search with the Blast2GO software, against the non-redundant (nr) protein sequence database using default parameters (Conesa et al. 2005). The Blast2GO software (v1.3.3) was used to obtain Gene ontology (GO) information retrieved from database matches. GOslim 'goslim_plant.obo' was used to achieve specific GO terms by means of a plant-specific version of the Gene Ontology. GO annotated datasets were represented at level 2. UniGenes belonging to each group and to each cluster were used to collect the corresponding probe set in the Wheat Affymetrix GeneChip (http://www.affymetrix.com). The corresponding GOiD for each probe set were then identified from the Blast2Go home page (http://bioinfo.cipf.es/b2gfar/affychips:wheat) and used for GO enrichment analysis. In our analysis, the wheat Affymetrix chip annotated by the Blast2Go team was used as a reference (annotated array) to perform Fisher's exact tests. GO terms with a p-value lower than 0.05 were considered to be significantly different and enriched within the cluster (**ESM Table S2a-d**).

Mapping of significant genes on wheat chromosomes

The localization of 1309 significant genes on the different wheat chromosomes were obtained by aligning the sequence of each significant unigene against wheat chromosome survey sequences generated by the International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) and available on URGI website (https://urgi.versailles.inra.fr/blast). Blastn results were parsed using a cutt-off of 95% identity over a minimum of 200 bp.

PCR analyses on Fusarium graminearum and wheat targets

Relative *F. graminearum* biomass quantification and *Fg*Tri5 gene expression were performed on genomic DNA and total RNA extracts respectively, and analysed using qPCR as described in Chetouhi et al (2015). Wheat targets were analysed using qRT-PCR on RNAs extracts obtained from three independent biological replicates of wheat infected grains. *Ta*RLI (RNase L inhibitor) gene that displays no expression variation between *Fg*-inoculated and control wheat samples was used as a reference gene (Giménez et al. 2011), and was amplified along with the target gene allowing normalization of gene expression. Real-time PCR products were detected using the SYBR Green Supermix (Roche) following the manufacturer's recommendations. One microgram of total RNA was reverse-transcribed into cDNA with oligodT using iScript reverse transcriptase (Biorad) after treatment with amplification grade DNase I (Invitrogen). Four microliters of a 30-fold dilution of this cDNA and 250 nM of each primer (**ESM Table S3**) were used as a template for qRT-PCR. The PCR cycling conditions included an initial denaturation step of 95°C for 10 min followed by 55 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 minute. A melting curve analysis was performed at the end of the PCR run over the range 55-95°C, increasing the temperature stepwise by 0.5°C every cycle. Baseline and threshold cycles (Ct) were determined automatically using Optical System Software (Lightcycler-Roche). Zero template controls were included for each primer pair, and each PCR was performed in triplicate. The PCR efficiencies of target and reference genes were determined by generating standard curves and the relative expression values were calculated using the ΔCt method (Pfaffl 2001).

Results

***Fusarium graminearum* settled in grain of a susceptible wheat genotype along with a burst of mycotoxin synthesis and with two distinct spurts of growth**

FHB disease was tested using the susceptible French wheat cultivar so-called 'Recital' and the mycotoxigenic fungus, *Fusarium graminearum*. In this experiment, the dynamics of *Fg* infection on wheat spikes was surveyed over five pivotal stages of the grain development from 50 °Cd to 450 °Cd. The earliest visible symptoms were noticed at the cell differentiation stage of the grain (150°Cd) while severe damages, including the bleaching of the spikelets and shrunken grains, were detected at the grain filling stage (250°Cd; **Fig. 1a; Fig. S1)**. The quantification of *Fg* fungal mass was traced by qPCR method using *FgIGS*, and revealed that *Fg* did not grow continuously over the infection process. *Fg* experienced two spurts of growth, the first one occurring at the onset of the symptoms, concomitantly with the beginning of the grain filling stage (>4-Log increase between 150°Cd and 250°Cd, **Fig. 1b**) and the second one at the end of the latter stage (5-times increase between 350°Cd and 450°Cd, **Fig. 1b**). Besides these events, no significant change in *Fg* growth happened even over periods lasting up to five days (duration corresponding to about 100°Cd). *Fgtri5* gene expression per fungal mass unit increased up to 17 times during 50°Cd and 150°Cd just before the first spurt of growth while no expression signal has been detected in the range of 250°Cd to 450°Cd **(Fig. 1c**). Our results evidenced that the infection by *Fusarium gramineam* involved at least three main phases on wheat grain: (i) a first phase until reaching 150°Cd, during which *Fg* is likely to enter the grain along with substantial mycotoxin production, (ii) a second phase at the

turning point of 150°Cd to 250°Cd, characterized by a strong and rapid *Fg* growth, (iii) a last phase starting from 250°Cd during which *Fg* develops independently to the Tri5 gene expression.

Large-scale grain transcriptomics revealed different *Fg*-responsive patterns connected with grain development stages

A wheat (*Triticum aestivum*) NimbleGen 40K unigene microarray was used to assess changes in gene expression profiles upon *Fg* infection during grain development. This microarray included 39,179 wheat genes that correspond to nearly 42% of the whole set of genes assigned to the three component genomes (A, B and D) of the hexaploid wheat (Brenchley et al. 2012). To depict a comprehensive picture of the *Fg*-responsive genes and their connections with grain development stages, we designed two-ways ANOVAs to compute the significance of the variance across *Fg*-treatment (T), development stages (D) and their interaction effects (T×D). This model was used to efficiently trace different populations of responsive genes: (i) genes displaying *Fg*-responsive pattern without any impact from the development stage (T genes); (ii) genes displaying *Fg*-responsive pattern that occurs along with the basal adjustments of grain development (T+D genes; unigenes showing both a significant T and D effects) ; (iii) genes displaying *Fg*-responsive patterns that depend on the grain development stage (T×D genes, unigenes showing a significant T×D effect at least).

Statistical analyses were computed on the 39,179 unigenes. Using a pFDR significance threshold of 5%, we identified a total of 13,813 unigenes that display at least one significant effect in the two-ways linear model, with 12,504 unigenes deemed significant for the D effect alone (**Fig. 2**) (**ESM Table S1a and b**). These D genes reached up to 30% of the 39179 unigenes and depict differentially expressed genes involved especially in wheat grain development. This proportion of D genes corroborates previously published results showing that 24 % of the total Nimblegen chip unigenes were involved in wheat grain development (Capron et al. 2012). Focusing on *Fg*-related responses, we identified 1,309 unigenes (~3.5% of the whole set of wheat unigenes) that displayed a significant change upon *Fg* inoculation. These included 536 T genes, 601 T+D genes and 172 T×D genes (**Fig. 2**). For each gene population, the Blast2GO software was used to collect functional GO annotations. As a whole, 646 GO annotations were identified for the T genes, 695 for the T+D genes and 188 for the T×D genes (**ESM Table S2a-c**). A Fisher's exact test (significant threshold for BH adjusted *p-values* set to 0.05) was applied to test whether these GO showed any enrichment for a given biological process. This evidenced a significant enrichment for 35 GO biological processes; 20 were found in T genes, 21 in T+D genes and 6 in T×D genes. Interestingly, part of the enriched GO biological processes was specific to each gene population (**ESM Table S2d**). T genes were mostly enriched for GO terms associated with defense responses to fungus, general stress responses, translational initiation and brassinosteroid metabolic process. T+D genes grouped GO terms mainly related to GTP catabolic process, histone lysine methylation, response to growth hormone stimulus, and embryo development. T×D genes were enriched towards responses to pathogen and drug transmembrane transport.

To check up on the microarray data, a number of genes exhibiting significant changes after *Fg* treatment were selected from different functional categories and their expression were measured in control and in infected tissues using quantitative RT-PCR. The qRT-PCR profiles of these genes exhibited the same trends as those observed in the microarray (**Fig. S2**).

Figure 1
Fig. 1

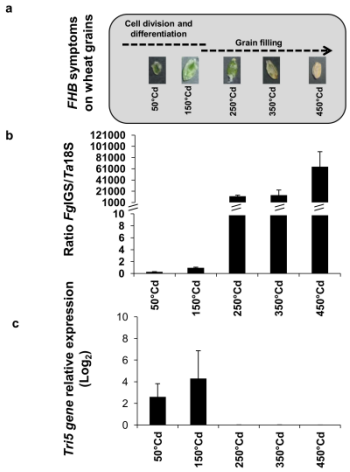

Fig. 1 Dynamics of FHB development on grains of a susceptible wheat genotype. **a)** Typical symptoms during susceptibility response to *Fg* in wheat grains (*cv*-Recital) at different development stages of the grain (50, 150, 250, 350, 450°Cd), the inoculation was performed at mid-anthesis; **b)** *FgIGS* relative quantification using qPCR method during the time course infection; **c)** Relative expression of Tri5 (trichodiene synthase) gene during the time course using the qRT-PCR method. Values are expressed as the ratio of treated vs control plants per fungal mass unit.



Fig. S1 Symptoms observed during susceptibility responses to *Fg* at 250°Cd developmental stage. **(a)** and **(b)** control and *Fg* inoculated ears, **(c)** and **(d)** control and *Fg* infected grains.

T-genes were mainly defined by increasing transcript abundances upon *F. graminearum* infection

Considering the 536 T genes, 492 genes were up-regulated in response to *Fg* infection while no change has been detected between consecutive developmental stages (**ESM Table S4a**). These set of genes belonged to roughly 20 GO terms including defense response to fungus, glutathione metabolic process, ATP catabolic process, response to jasmonic acid stimulus, killing of cells of other organisms and brassinosteroid metabolic process (**ESM Table S4b**). They also gathered 79 genes without functional annotation and 40 hypothetical proteins. Noticeably, 40 other genes were involved in mycotoxin detoxification (e.g., 3 genes encoding udp-glycosyltransferases, 15 glutathione S-transferases, 7 cytochromes p450 and 6 PDRs), 28 genes encoded different ribosomal proteins, 4 corresponded to pathogenesis related protein, 4 encoded disease resistance proteins, 4 referred to peroxidases and 5 to cytokinin-O-glucosyltransferases. Regarding the 44 remaining T-genes displaying a decrease of transcript abundance **(ESM Table S4b**) in response to *Fg* infection, they were mainly involved in translational initiation and response to stimulus (**ESM Table S4c**).

T+D genes revealed 4 contrasting patterns of gene expression in response to *Fg* infection

The 601 T+D genes depicted a significant *Fg* infection effect that occurs along with the basal adjustments of grain development. To deepen into the *Fg*-responsive patterns, genes were classified in different groups regarding gene expression changes. Among T+D genes, 344 depicted significant T effect along with a fluctuating gene expression during grain development while the 253 others showed a significant linear regression between their transcript abundance change upon *Fg* inoculation and the development stage, in control samples at least (*p-value* <0.01). Among these 253 unigenes, 232 displayed a negative linear regression (i.e., continuously down-regulated during grain development in healthy grains) whereas 21 displayed a positive linear regression (i.e., up-regulated during grain development in healthy grains) (**Table S5a-d**). On this basis, we characterized four contrasting groups.

Group I: down-regulated genes during development but up-regulated in response to Fg - This group gathered 68 genes that were mainly involved in cell wall macromolecule catabolic process and cellular response to phosphate starvation (**ESM Table S5a and e**). Among genes belonging to group I, the magnitude of their expression changes tended to increase with the stress duration: slight changes were observed at the early stages of infection while the later time points (i.e. 350 and 450°Cd) were mainly characterized by ≥2-fold increases of transcript abundance.

Group II: down-regulated genes during development and in response to Fg - This group gathered 164 genes and was mainly enriched in GO terms related to regulation of transcription, GTP catabolic process and protein polymerization (**ESM Table S5e)**. Analogously to the group I, the magnitude of decreasing gene expression tended to strengthen with the stress duration. However, the number of down regulated genes displaying a ≥2-fold change was lesser than the number of genes showing a <2-fold change.

Group III: up-regulated genes during development and in response to Fg - Response to stress, negative regulation of translation and cell killing were the GO-enriched terms for this set of 18 genes. Interestingly, the

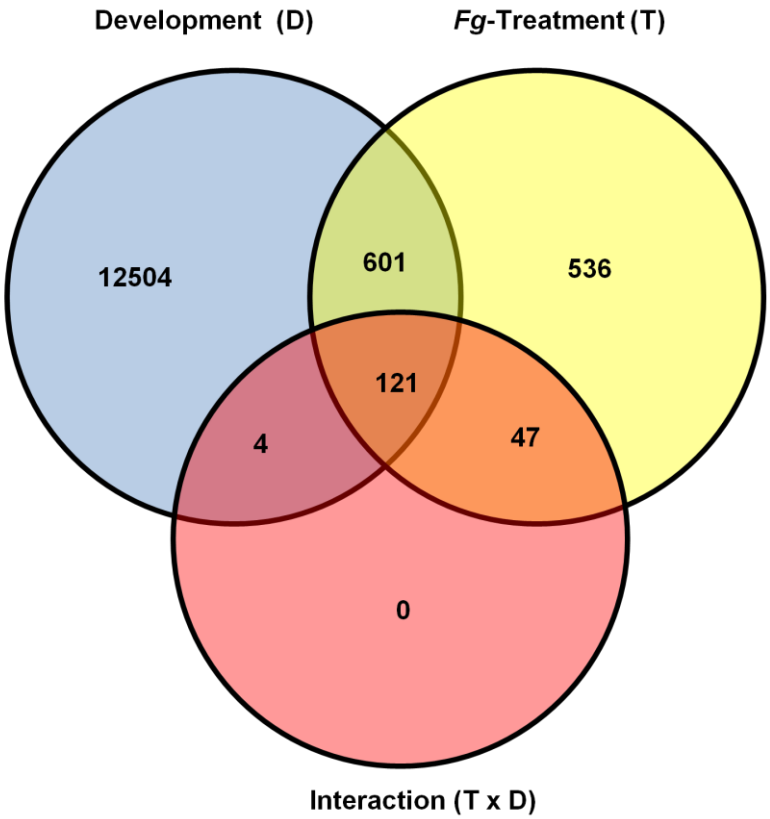

Fig. 2 Venn diagram showing the number of significant responsive genes identified for *Fg*-treatment (T), grain development (D), and interaction (T x D). Changing gene expression was assessed using 2-ways ANOVA.

magnitude of gene expression changes in response to *Fg* infection increased between 250°Cd and 350°Cd and reached all genes at 450°Cd.

Group IV: up-regulated genes during development but down-regulated in response to Fg –This group included only three genes: Ta_S13050011, Ta_S24623180 and Ta_S26027950. These genes were involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process or in amine metabolic process (**ESM Table S5e)**. These down-regulated genes displayed a fold change >2 at 450°Cd.

T×D genes reveal ontogenic-specific patterns and early responsive genes to *F. graminearum* infection

T×D genes are expected to depict changes in mRNA levels in response to *Fg*-treatment but with contrasting trends according to the different developmental stages. They included 172 genes showing at least a 1.5-fold change in relative expression between inoculated and control grains in at least one of the five time points of the time course (**ESM Table S6**). Among these genes, 125 were successfully annotated while the remaining failed to match any known function. Annotated genes included signaling and hormone-related processes (17%), sugar catabolism, transport and glycolysis (9%), gene regulation (13%), drug response (10%), stress response (6%), amino and fatty acids metabolism (5%), secondary metabolism (2%) and cellular component organization (2%). In order to obtain an overview of expression profiles and to identify genes with specific patterns of expression along with grain development, we used a hierarchical complete linkage cluster analysis (**Fig. 3**). Five main clusters were identified (**Fig. 3a**). Cluster I included genes that were sharply down-regulated in the late responses to *Fg*. These genes are involved in signaling, gene regulation and starch synthesis (**Fig. 3b**). Cluster II contained early-responsive genes displaying high transcript abundance at 50°Cd only. Eleven genes belonged to this cluster among which eight were of unknown function and three were involved in signaling and hormone metabolism. Clusters III and V included up-regulated genes belatedly in response to *Fg* infection. These clusters were enriched in genes involved in drug response, sugar catabolism, transport, glycolysis and gene regulation. Finally, the cluster IV contained genes specifically down regulated at 250°Cd but up regulated at 350°Cd and 450°Cd (**Fig. 3b)**. No obvious enrichment for any biological process was observed in this cluster.

Genome distribution and chromosome location of *Fg*-responsive genes

In order to identify chromosome-specific responses to *Fg* in the wheat grain, the sequence of each significant unigene was blasted against each chromosome arm sequence (**Fig. 4**) (**ESM Table S7**). Among the 1309 blasted sequences, 875 matched significantly. This blast showed a 4% over-representation of *Fg*-responsive genes in the D component genome, mainly due to chromosome 7D and 5D. In contrast, the A genome involved a lesser number of genes especially in chromosome 6 and 7 while the B genome was over represented only for chromosome 3. This result may be explained by the length of this chromosome. All genes with significant *Fg* response mapped in chromosomes 5D and 7D are listed in supplementary data (**ESM Table S8**).

Discussion

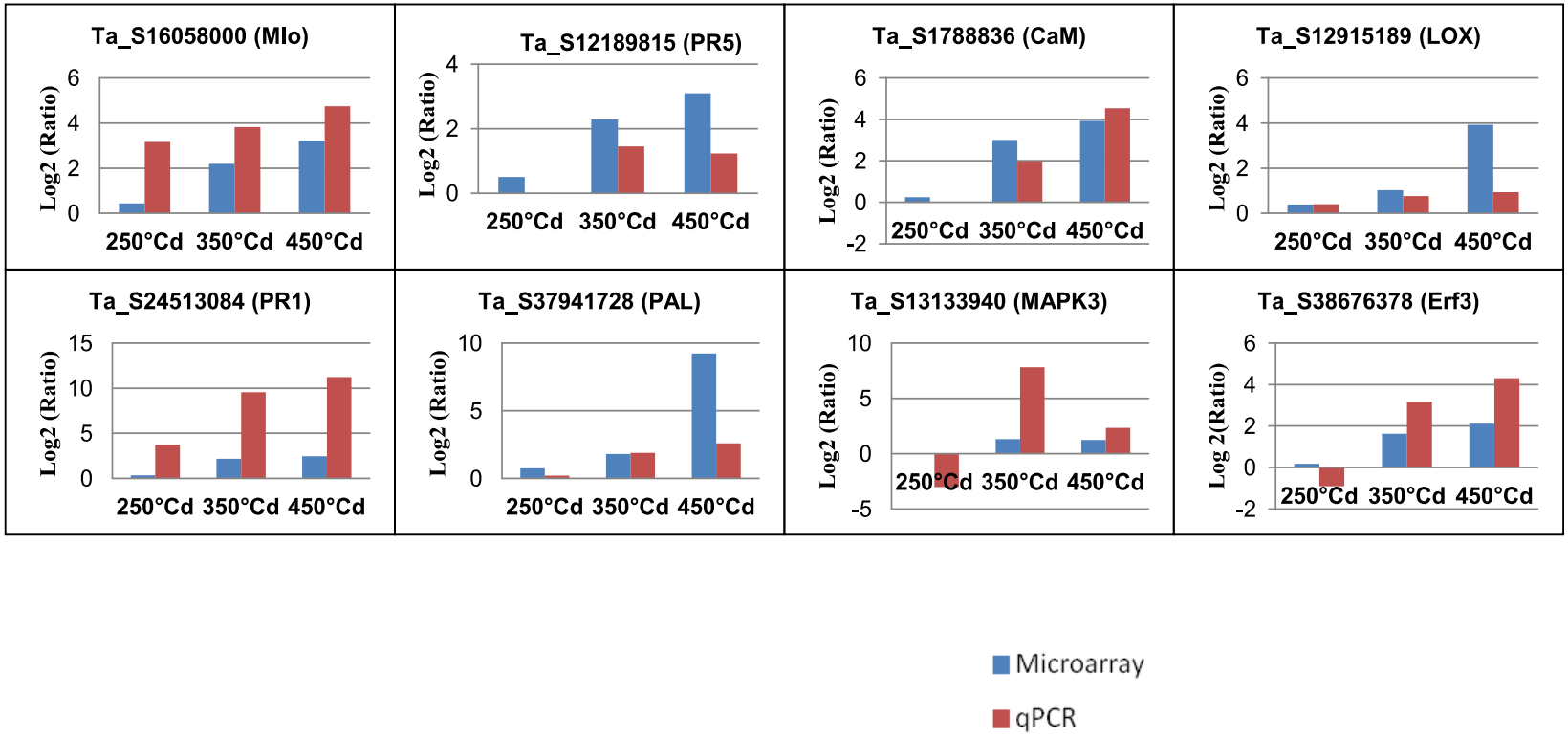

Fig. S2 Check up on the microarray data by qRT-PCR. Micro-array (blue) and quantitative RT-PCR (red) data are expressed in a log2 ratio obtained for comparison between Fg-inoculated and control plants at three time points (250°Cd, 350°Cd and 450°Cd).

The identification of regulated genes in the susceptibility responses to FHB in wheat grain represents a major challenge for understanding the molecular determinism of disease occurrence. While few data are available about plant genes involved in the susceptibility to fungal pathogens (Eichmann et al. 2010), many studies suggest their potential as a new breeding strategy to achieve durable and broad spectrum resistance (Pavan et al. 2010). The study of the host molecular mechanisms contributing to the host susceptibility and to the fungal growth on the host tissues is a prerequisite. Here, we report the first use of wheat microarray in the compatible interaction between the wheat grain and *Fg* pathogen with a particular focus on cellular alterations of a susceptible host as a way to trace putative susceptibility factors. Although several transcriptomic analyses on this hemibiotrophic fungus revealed that the transition from biotrophic phase to necrotrophic phase required the specific expression pattern of several genes (Yang et al. 2013), little is known about the progress of the infection process of *Fg*, especially on wheat grains. In the current study, we combined the survey of *Fg* growth, its mycotoxin synthesis and plant transcriptomic responses to characterize the evolution of FHB (Fusarium Head Blight) in wheat. Our results showed three different phases in the progress of the compatible wheat grain/*Fg* interaction (**Fig. 5**). During the first one, *Fg* involved widely the DON synthesis with slow spreading into plant tissues while wheat grain was slightly impacted, as suggested by the few detected symptoms along with the faint remodeling of grain gene expression. During the second phase, *Fg* favored spreading through a spurt of growth while reducing DON synthesis. At this stage, wheat experienced increasing symptoms and DON accumulation induced the activation of plant DON detoxification mechanisms through changing expression of 14 cytochrome P450s (Ito et al. 2013), 5 UGTs (Poppenberger et al. 2003), 10 ABC transporters and 11 PDR genes (**Fig. 5**) (**Table 1**). Interestingly, the genes belonging to these families showed a similar pattern in their expression that suggests the co-regulation of all these genes under DON synthesis. The last phase was characterized by a second spurt of *Fg* growth without any connection to DON synthesis while wheat underwent deep changes in carbohydrate metabolism as suggested by the altered expression of starch synthase, sucrose synthase, alcohol dehydrogenase genes and other genes involved in TCA cycle (**Fig. 5**) (**Table 1**). This result suggests this fungus growth could be due to plant metabolism inputs and/or signals such as susceptibility factors.

Digging into transcriptome responses yields putative susceptibility factors to *Fusarium* Head Blight

The susceptibility of plants to pathogens (bacteria, fungi, virus and nematode) involves several susceptibility factors (Lapin and Van den Ackerveken 1985). During the last decade, increasing identification of so-called host susceptibility genes suggests their involvement in many plant-pathogen interactions including the wheat/*Fg* pathosystem (Ma et al. 2006). In the current study, we investigated susceptibility factors using a transcriptomic approach. Our analysis allowed the identification of three groups of genes that were controlled upon *Fg* infection. The first group called "T genes" includes genes specifically involved in the generic response to *Fg* infection without any connection with the grain development stages. This mainly gathered genes that respond either to biotic and abiotic stresses such as PR proteins or to toxins such as GST, CytP450 and UGT. These genes may respond to any stress emphasizing that this group includes a number of genes that display low adaptive value to FHB-specific events. Therefore, this group of genes could have limited interest to identify susceptibility factors, especially since the majority of these genes are also activated in resistant genetic backgrounds (Buerstmayr et al. 2003; Kong et al. 2005; Bernardo et al. 2007). The second group of genes showed both development and *Fg* infection effects so called “T+D genes”. This group includes patterns depicting an impact of the infection along

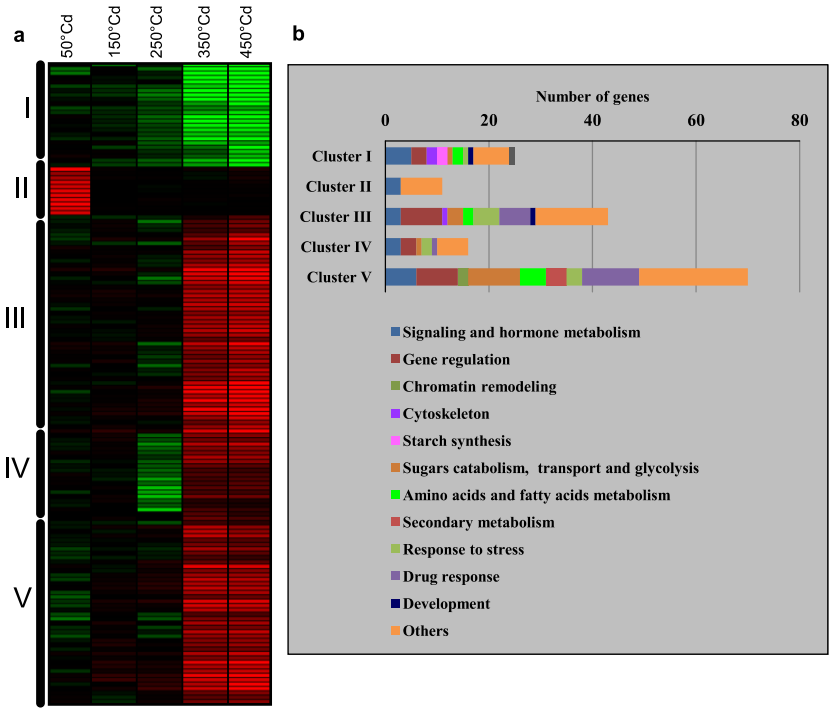

Fig. 3 Hierarchical classification of the genes displaying *Fg*-inoculation by development interaction (T x D) into five groups **a)** according to their expression pattern and **b)** overview of biological processes in each cluster.

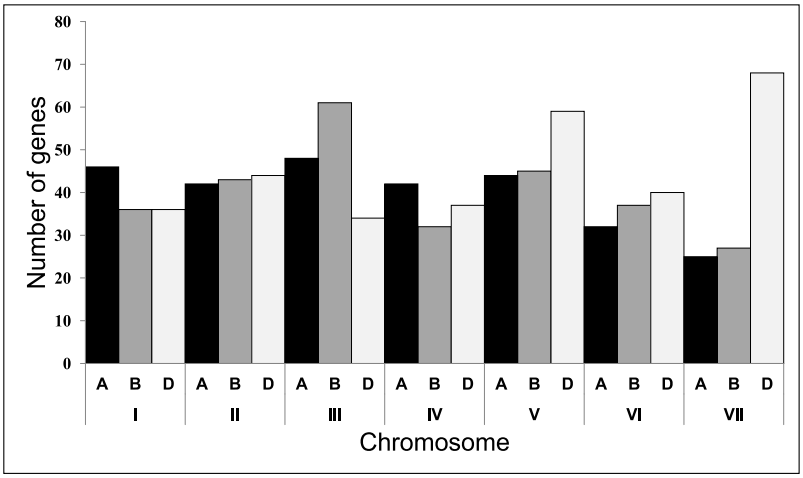

Fig. 4 Chromosome distribution of all genes displaying significant expression changes for any Fg-related effect (*T* genes, T+D genes and T x D genes).

with basal adjustment of grain developmental processes. Interestingly, it gathers genes that exhibit synergistic changes which could sustain grain formation even upon *Fg* infection. Finally, the third group represents the genes which have development-dependent response, i.e. *Fg*-responsive genes whose reaction norm is partly influenced by the molecular context of the grain development stage. These genes called "T x D" may represent the best source for identifying susceptibility genes, because it provides an access to genes actively involved in *Fg* infection and closely connected to changing grain metabolic environment. Among the 172 genes displaying T x D interaction, at least 10 unigenes may encode putative susceptibility family genes previously described in the litterature. For instance, two of these genes belong to the WRKY transcription factor family such as the WRKY gene identified in the barley which promotes plant susceptibility to the fungus *Blumeria graminis* by the repression of the PAMP-triggered basal defense (Shen et al. 2007). One unigene encoding the mlo-protein, a susceptibility gene of wheat to *Blumeria graminis* fungus (Várallyay et al. 2012), was part of the TxD genes (**Table 2**). Moreover, two unigenes displaying the same function as the Medicago zinc finger transcription factor were identified in our study. This transcription factor was previously described as a susceptibility gene to *Phakopsora pachyrhizi* (Ishiga et al. 2013), to *Puccinia emaculata* and to *Colletotrichum trifolii.* This gene plays a role in *P. pachyrhizi* pre-penetration structure. Two other unigenes orthologous of the *Arabidopsis thaliana* Patatin (Lipid acyl hydrolase) gene were also identified in our analysis. Patatin gene is required to fungus *Botrytis cinerea* and bacteria *Pseudomonas syringae* to infect *Arabidopsis thaliana* (La Camera et al. 2009). This gene could provide fatty acid precursors for the biosynthesis of specific oxylipins and differentially affecting resistance to pathogens with distinct lifestyle. A transcription factor from MYB family was found in our study. This gene may have the same function as MYB3R4 from *Arabidopsis thaliana*, identified to be a susceptibility gene to *Golovinomyces orontii* (Chandran et al. 2013). This gene could promote the enhancement of metabolic demands imposed by the fungus, that acquires all its nutrients from the plant host. Finally, the polygalacturonase gene which confers the susceptibility to *Botrytis cinerea* fungus in tomato was found in our data (Cantu et al. 2008). Polygalacturonase is one of the cell wall proteins that cooperatively participate in ripening-associated cell wall disassembly. Its suppression reduced the susceptibility of ripening fruit to *B. cinerea*. Although this list of known susceptibility genes sustains the value of the "T x D" gene population, complementary approaches will be required to target specific susceptible genes, such as the characterization of different wheat genotypes or tilling mutants (Ma et al. 2006) as well as biochemical investigations to determine the function of each susceptible gene and its contribution to FHB installation and promotion.

FHB fits over grain development processes

Our analysis revealed 172 genes displaying changes in mRNA level in response to *Fg*-treatment but with contrasting response patterns according to the different development stages. This result indicates the high connection of *Fg*-responsive gene expression with processes related to grain development, suggesting that *Fg*-specific molecular adjustments depended on grain development or that *Fg* set up different strategies to fit with different molecular environments of grain formation. One study has previously demonstrated a high relationship between grain development stage and *Fg* response for the wheat xylanase inhibitors at proteome level (Dornez et

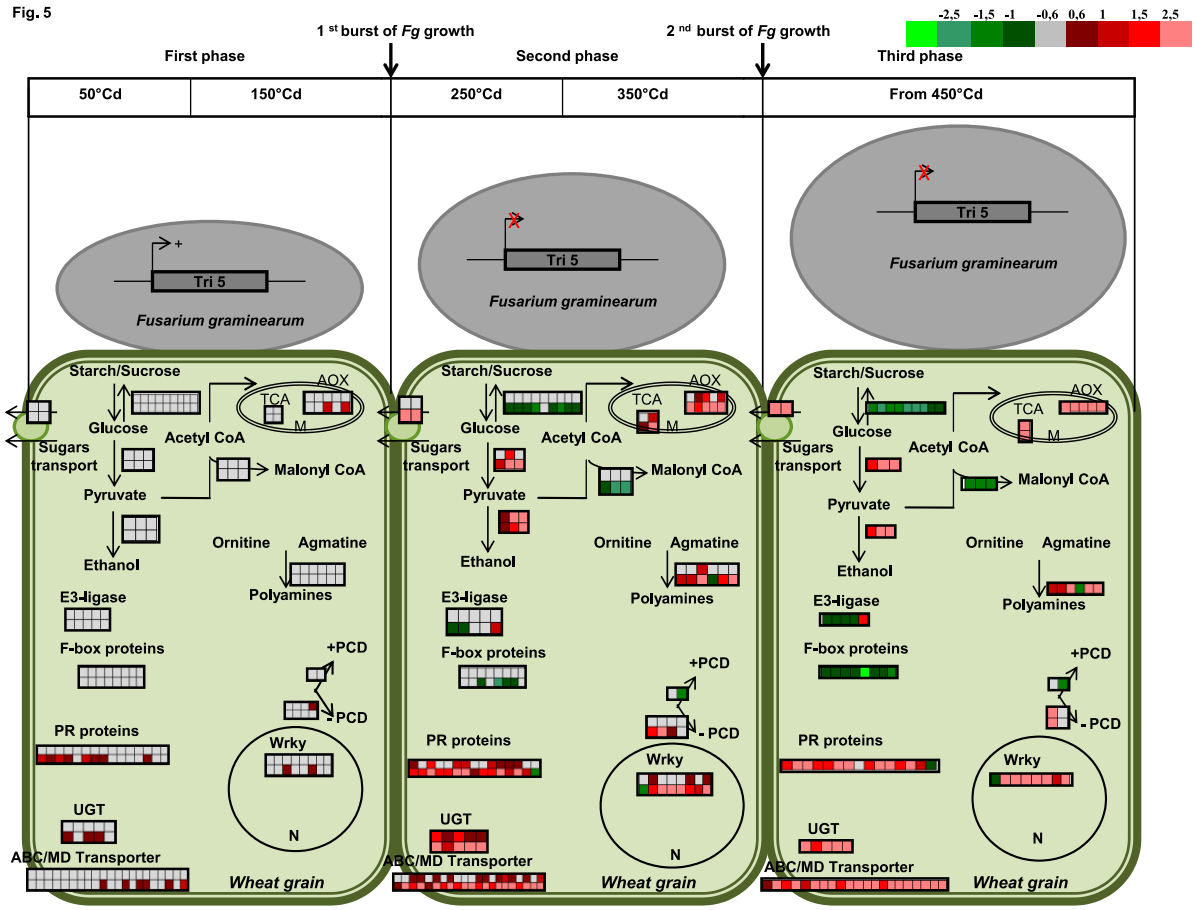

Fig. 5 Schematic representation of the gene expression profiles of metabolic, defense pathways, detoxification mechanisms, transcription factors and PCD at the three phases of *Fg* development on wheat grain.

al. 2010). They clearly showed that the xylanase inhibitors were more expressed during the soft dough stage (15-25 days post anthesis (DPA)) than at 5 DPA. *Ta*ABCC3, an ABC transporter engaged in the DON response, was also shown to be involved in grain development (Walter et al. 2015), further reinforcing the link between the *Fg* response and grain development. Among the 172 genes displaying T x D interaction, we identified 2 unigenes that encoded 2 ABC transporters (Ta_S32696743 (Ta.9295) and Ta_S16058073 (Ta.27443)) corresponding to the *Ta*ABCC3 protein (**ESM Table S6**). In our current analysis, deeper information is emphasized at the transcriptome level and focused on genes displaying a significant *Fg* by development stage interaction effect. The hierarchical clustering of these genes showed that they displayed different expression profiles between the different time points of the time course **(Fig. 3) (ESM Table S6)**. At the early stages of FHB (50°Cd), few changes were observed but the sharpest ones were detected only for hormone-related genes (Cluster II, **Fig. 3**) suggesting that adjustments in cell signaling occur at this time while other early-expected changes such as stress-related processes are altered secondarily from 250°Cd to 450°Cd (Cluster I, III, IV and V, **Fig. 3**). This corroborates the already suggested hypothesis that wheat susceptibility to *Fg* is related to the delay of defense mechanisms activation (Ding et al. 2011; Chetouhi et al. 2015). In addition, the phenotypic observations made during the time course experimentation revealed that the grain development was not interrupted (**Fig. 1a**), which may suggest the role of the grain integrity preservation for appropriate fungal development. Our results suggest that the successful establishment of the FHB on the grain is closely associated with different phases characterized by specific host plant signals and further by the nutrient availability, as already reported for obligate biotrophic and hemibiotrophic fungi (Bouarab et al. 2002).

Genome distribution of significant genes

The chromosome distribution of significant genes revealed that the D genome and especially chromosomes 5 and 7 contributed significantly to the *Fg* responses **(Fig. 4).** The highest plasticity detected in the D genome may suggest (i) gene losses in the genome B and A, (ii) epigenetic modifications which could have led to genome structure reorganization promoting the D genome expression or/and (iii) the recent apparition of the disease involving a recent adaptation of wheat to this disease. This hypothesis is supported by previous studies evidencing that tetraploid wheat lacking the D genome displayed higher susceptibility to FHB disease and to DON accumulation as compared to the hexaploid wheat cultivars (Limin and Fowker 1985; Ma et al. 2006b). Interestingly, differentially expressed genes belonging to the D genome included genes involved in carbohydrate metabolism that were down-regulated while genes involved in DON detoxification and in plant defense were up-regulated (**ESM Table S7 and Table S8**). At this stage, deepening these results will require the use of ditelosomic lines to identify genetic effect of different chromosome arms on FHB such as already done for other characters and stresses (Wanous et al. 2003).

***Fusarium graminearum* infection induces reprogramming of the host's primary metabolism, modulation of cell death and activation of detoxification mechanisms**

Transcripts involved in starch and sucrose synthesis were down-regulated specifically from 250°Cd, suggesting a reduction of *de novo* carbohydrate synthesis in the wheat grain. This decrease in the synthesis of starch and sucrose in *Fusarium* damaged grains could have a drastic impact on the grain filling stage, while healthy grains are gradually filled in starch and storage proteins (**Fig. 5**) (**Table 1**) (Chetouhi et al. 2015). This defect in grain

Table 1. Unigenes corresponded to defense pathways, detoxification mechanisms, transcription factors and PCD at the three phases of *Fg* development on wheat grain.

Ids	Seq. Description	50°Cd	150°Cd	250°Cd	350°Cd	450°Cd	Description
Ta_S17890009	Aconitase/3-isopropylmalate dehydratase protein	-0,1793	0,20202	0,35156	2,34778	2,74817	TCA
Ta_S15881623	isocitrate dehydrogenase	0,10784	0,11622	0,90071	2,73255	4,56147	TCA
Ta_S37766027	hexokinase 1	0,44676	0,02436	0,112	1,47137	1,93915	Glycolysis
Ta_S13250922	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0,01536	-0,0077	1,56761	3,68442	4,9242	Glycolysis
Ta_S15824281	phosphoglycerate mutase family protein	-0,0133	-0,0448	0,18921	2,86779	3,41113	Glycolysis
Ta_S12923222	alternative oxidase	0,11252	0,28664	0,5281	2,56802	2,87932	AOX
Ta_S13144312	alternative oxidase	-0,2245	0,48535	0,8282	2,09674	2,78962	AOX
Ta_S13144716	alternative oxidase mitochondrial	0,31751	1,40496	1,69687	4,37103	5,26265	AOX
Ta_S17986425	alternative oxidase mitochondrial	0,02632	0,02997	0,18807	2,59689	2,96061	AOX
Ta_S37756739	alternative oxidase mitochondrial	0,25946	1,07735	1,16679	4,03038	4,98435	AOX
Ta_S38479081	glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit chloroplastic	-0,0679	-0,2397	-0,3403	-0,7624	-1,4425	Starch synthesis
Ta_S22119324	adp-glucose pyrophosphorylase small subunit	-0,2038	-0,1015	-0,2126	-0,6772	-1,2405	Starch synthesis
Ta_S12922948	adp-glucose pyrophosphorylase	0,1872	-0,1585	-0,4236	-0,6232	-1,5612	Starch synthesis
Ta_S38479081	glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit chloroplastic	-0,0679	-0,2397	-0,3403	-0,7624	-1,4425	Starch synthesis
Ta_S16226197	starch binding domain containing protein	-0,413	0,06477	-0,4022	-1,2454	-1,2371	Starch synthesis
Ta_S12923224	soluble starch synthase i	-0,121	-0,1947	-0,3272	-0,5739	-1,5538	Starch synthesis
Ta_S31925591	starch branching enzyme 3	-0,2914	-0,269	-0,4559	-0,6107	-1,8244	Starch synthesis
Ta_S22370320	sucrose-phosphate synthase	-0,0702	-0,3114	-0,3956	-1,0854	-1,5559	Sucrose synthesis
Ta_S12923095	sucrose synthase	-0,027	0,13931	-0,351	-0,6518	-0,8504	Sucrose synthesis
Ta_S13128434	sucrose synthase	-0,1526	0,03733	-0,3962	-0,8555	-0,8287	Sucrose synthesis
Ta_S12891907	alcohol dehydrogenase	0,12843	0,15144	2,59142	4,84992	5,85839	Fermentation
Ta_S13143200	alcohol dehydrogenase 1	0,13019	0,06764	0,69023	3,59993	4,71776	Fermentation
Ta_S17976245	alcohol dehydrogenase superfamily protein	-0,1169	0,34709	0,85148	2,29914	1,83543	Fermentation
Ta_S13241595	carbohydrate transporter sugar porter transporter	-0,0624	0,19006	0,29407	3,13579	2,71153	carbohydrates transport
Ta_S26022895	carbohydrate transporter sugar porter transporter	0,17031	-0,0583	0,38492	3,74247	3,51833	carbohydrates transport
Ta_S16057927	abc transporter b family member 4	0,07062	0,22398	0,07674	0,89084	0,81622	Mycotoxin detoxification
Ta_S16250466	pdr-like abc transporter	0,07642	0,45454	0,59192	3,30821	4,76718	Mycotoxin detoxification
Ta_S17865479	ABC transporter family protein, putative, expressed	-0,0266	0,0936	0,66793	2,22748	1,71541	Mycotoxin detoxification
Ta_S17974709	abc transporter b family member 4	-0,0523	0,29045	0,71011	3,29799	3,43271	Mycotoxin detoxification
Ta_S22372983	abc transporter cholesterol phospholipid flippase	0,12358	-0,0042	0,10091	0,86072	1,25277	Mycotoxin detoxification
Ta_S32423520	abc transporter b family member 4	-0,0721	0,20602	0,73475	2,84682	3,31081	Mycotoxin detoxification
Ta_S32500477	abc transporter g family member 28-like	0,12764	0,38582	0,15299	2,31373	3,16129	Mycotoxin detoxification
Ta_S16058073	abc transporter c family member 3	0,049	0,32994	0,65786	3,10734	2,86509	Mycotoxin detoxification
Ta_S17980099	abc transporter b family member 4	0,07242	0,11013	0,06132	1,99019	2,38537	Mycotoxin detoxification
Ta_S32696743	abc transporter b family member 4	0,02428	0,63257	0,34166	3,6743	4,33247	Mycotoxin detoxification
Ta_S12962562	pleiotropic drug resistance protein 3-like	-0,0542	0,17569	0,05789	3,11811	3,3568	Mycotoxin detoxification
Ta_S12990400	pleiotropic drug resistance protein 5	0,22993	0,42306	0,60607	2,36761	2,61086	Mycotoxin detoxification
Ta_S13015346	pleiotropic drug resistance protein 5	0,16232	0,79691	0,70953	3,8234	4,4442	Mycotoxin detoxification
Ta_S13043691	pleiotropic drug resistance protein 5	0,01245	0,43854	0,17265	1,82723	2,44615	Mycotoxin detoxification
Ta_S16057942	pleiotropic drug resistance protein 4	-0,1756	0,77159	0,83974	3,27669	3,44556	Mycotoxin detoxification
Ta_S22382486	pleiotropic drug resistance protein 4	-0,4423	0,8542	1,02233	2,73063	3,07051	Mycotoxin detoxification
Ta_S22390928	pleiotropic drug resistance protein 4	0,03414	-0,0798	0,90168	3,11953	2,52613	Mycotoxin detoxification
Ta_S26027565	pleiotropic drug resistance protein 5	-0,0479	0,45067	0,36429	2,24632	2,9474	Mycotoxin detoxification
Ta_S37771080	pleiotropic drug resistance protein 5	0,22241	0,91012	0,68963	3,2683	3,43778	Mycotoxin detoxification
Ta_S50371846	pleiotropic drug resistance prote	0,1326	0,47319	0,58128	3,30953	4,34146	Mycotoxin detoxification
Ta_S37942249	pleiotropic drug resistance protein 5	0,06195	1,24284	1,49759	3,94559	4,59076	Mycotoxin detoxification
Ta_S13048892	udp-glycosyltransferase 76c2-like	0,00898	0,67224	1,55002	4,05321	4,8051	Mycotoxin detoxification
Ta_S16211208	udp-glycosyltransferase 83a1-like	0,10754	0,07013	0,80214	1,36261	2,06091	Mycotoxin detoxification
Ta_S32583637	udp-glycosyltransferase 74e1	-0,0287	0,60057	1,86828	4,66258	5,64189	Mycotoxin detoxification
Ta_S37864952	udp-glycosyltransferase 74e1	0,0051	0,62635	0,90559	4,38533	4,79153	Mycotoxin detoxification

filling stage may explain the decreased size of infected grains. On the other hand, the activation of glycolysis in infected grains suggests that infection by *Fusarium* promotes high production of glucose which could be used by the fungus for its growth and dissemination in the ear. Transcript abundance changes in starch and sucrose metabolism have already been reported in susceptible wheat genotypes submitted to a 12h-long *Fg* infection (Erayman et al. 2015), such early adjustments could in part support the changes we detected at later stages of the infection. Moreover, the induction of glucose production was also previously described in the proteome and transcriptome analyses of several plant/pathogen interactions (Kugler et al. 2013). The repression of genes involved in starch synthesis and the induction of genes involved in glycolysis may suggest the reallocation of carbon assimilates into infected grains from all tissues of the ear (rachis, lemma and palea). *Fg* infection seems to induce a metabolic switch at 250°Cd from aerobic to anaerobic fermentation by a high expression of *ADH1* gene (**Fig. 5**) (**Table 1**). The expression of this gene cooccurs with the apparition of aleurone layer in the wheat grain. In mature barley grain, it was shown that the aleurone layer contains only ADH1 homodimers and its gene expression is regulated by an abscisic acid–gibberellic acid interaction (MacNicol and Jacobsen 2001). The crucial role of fermentative metabolism in plant-pathogen interactions was evidenced several times. In *Arabidopsis thaliana*, glycolysis, respiration, and fermentation are up-regulated at the site of powdery mildew attack (Pathuri et al. 2011), in *Plasmodiophora brassicae* infection (Jubault et al. 2013), and in *Agrobacterium tumefasciens* infection (Deeken et al. 2006). It is speculated that the fermentation is favoured under cellular conditions associated with parasitic nutrient acquisition (Chandran et al. 2010; Bergmann and Fleming 2010). A second hypothesis for a positive regulatory of enzyme involved in ethanol fermentation is the accumulation of sugars in the infected grains, which may induce a hypoxia-like response and consequently may force plant cells to switch to fermentative energy metabolism (Koch et al. 2000). Furthermore, wheat genes involved in TCA cycle were up-regulated during the infection (**Fig. 5**) (**Table 1**), which suggests the use of this pathway by *Fg* in the effective virulence strategy, as observed in some necrotrophic and/or toxin-producing plant pathogens (Brauc et al. 2012; Tsuge et al. 2013). The genes of polyamines synthesis (agmatine and ornithine genes) were also up-regulated from the second phase of *Fg* growth. Recently, it was observed that the primary GOGAT cycle was redirected toward the production of ornithine and arginine, resulting in the formation of polyamines (Gardiner et al. 2010). A metabolo-proteomics approach revealed the induction of agmatine-to-polyamine conversion (Gunnaiah et al. 2012) which could hypothetically contribute to *Fg* dissemination and pathogenecity (Gardiner et al. 2009).

Several genes involved in cell death and in apoptosis regulation were also evidenced in our study. Most genes involved in the inhibition of cell death were up regulated (e.g; Bax inhibitor-1 protein and *mlo* gene; Ihara-Ohori et al. 2007) whereas the gene involved in its induction (apoptosis-inducing factor) were down-regulated, which would consequently lead to sustain cell functioning. It suggests that apoptosis like in wheat (PCD) may play a crucial role in the plant colonization process promoted by *Fg* fungus. Similar observations were reported in *Arabidopsis thaliana* cells treated with DON mycotoxins produced by *Fg* during its infectious cycle (Diamond et al. 2013). The results suggested that mycotoxins synthesized by *Fg* fungus during the infectious cycle contribute to the inhibition of plant apoptosis-like programmed cell death, thus allowing the accomplishment of the fungal biological cycle. In addition, the high expression of the mitochondrial alternative oxidase (AOX) could maintain the cell viability and provides protection against DON-induced PCD (Desmond et al. 2008). In soybean, the AOX protects cells against hydrogen peroxide-induced cell death (Amora et al. 2000). The over expression of

Table 1 (be continued)

be continued							
Ta_S37883494	udp-glycosyltransferase 74f2-like	0,007	0,314	0,677	3,609	3,264	Mycotoxin detoxification
Ta_S13189815	pathogenesis-related protein 5	-0,148	1,021	0,885	2,139	2,492	Biotic response
Ta_S13203259	pathogenesis-related maize seed protein	0,226	0,739	0,501	2,29	3,093	Biotic response
Ta_S13203548	pathogenesis-related protein 5	0,122	1,486	1,532	2,76	2,996	Biotic response
Ta_S13204191	pathogenesis-related protein 5	0,195	0,796	0,357	1,723	2,183	Biotic response
Ta_S24513084	pathogenesis-related protein 1	-0,018	0,498	0,348	2,181	2,45	Biotic response
Ta_S26028075	pathogenesis-related protein 5	0,116	1,298	1,226	3,131	3,063	Biotic response
Ta_S32551126	pathogenesis related protein 5	0,132	0,783	1,409	2,585	3,649	Biotic response
Ta_S26028227	chitinase 8	0,216	0,685	0,359	0,836	0,589	Biotic response
Ta_S17973134	chitin elicitor-binding protein	0,176	0,208	0,146	1,89	1,927	Biotic response
Ta_S26027267	endochitinase a-like	-0,013	0,367	1,052	1,908	2,603	Biotic response
Ta_S12923205	chitinase 5	0,174	0,249	0,634	2,669	3,233	Biotic response
Ta_S17893251	chitinase 1	0,263	0,54	0,823	1,387	1,846	Biotic response
Ta_S18006636	chitinase 5	0,057	0,783	0,664	2,749	3,144	Biotic response
Ta_S50383673	chitin-inducible gibberellin-responsive protein 1-like	-0,151	0,017	-0,094	1,77	1,442	Biotic response
Ta_S32573627	endoglucanase 11	-0,39	-0,588	0,357	-1,15	-0,909	Biotic response
Ta_S13158756	acetylornithine mitochondrial-like	0,076	0,21	0,382	1,142	1,173	Polyamines metabolism
Ta_S16058014	acetylornithine mitochondrial-like	-0,074	0,236	0,384	1,302	1,337	Polyamines metabolism
Ta_S17989562	ornithine decarboxylase-like	-0,022	0,889	1,101	3,642	4,592	Polyamines metabolism
Ta_S32497550	agmatine deiminase-like	-0,253	-0,235	-0,265	-0,802	-1,075	Polyamines metabolism
Ta_S15183773	agmatine coumaroyltransferase	0,216	0,954	0,144	2,02	3,673	Polyamines metabolism
Ta_S37942220	agmatine coumaroyltransferase-2-like	-0,102	0,55	0,515	2,757	3,09	Polyamines metabolism
Ta_S12923153	acetyl-CoA carboxylase 2	-0,065	-0,163	-0,09	-0,923	-1,019	Malonyl CoA sythesis
Ta_S17878365	acetyl-coa carboxylase	-0,017	-0,061	-0,167	-1,568	-1,494	Malonyl CoA sythesis
Ta_S17880865	acetyl-coa carboxylase	-0,182	0,021	-0,16	-1,559	-1,399	Malonyl CoA sythesis
Ta_S16058012	wrky transcription factor 20	-0,114	-0,189	-0,173	-1,043	-0,977	Wrky TF
Ta_S37443273	wrky45-like transcription factor	0,049	0,334	0,67	2,154	2,526	Wrky TF
Ta_S17889107	wrky transcription factor 6-like	0,355	0,749	0,378	3,453	4,556	Wrky TF
Ta_S17976942	wrky transcription factor	0,055	0,536	0,423	2,727	3,072	Wrky TF
Ta_S26028942	wrky53 - superfamily of tfs having wrky and zinc finger domains	0,096	0,319	0,483	2,583	2,749	Wrky TF
Ta_S32591725	wrky transcription factor	-0,088	0,671	0,819	1,671	2,509	Wrky TF
Ta_S37223562	wrky transcription factor	-0,034	0,227	-0,155	1,13	1,95	Wrky TF
Ta_S44692925	wrky transcription factor 33	0,461	0,52	0,707	2,568	3,116	Wrky TF
Ta_S16058000	mlo-like protein 1-like	0,144	0,82	0,433	2,198	3,225	Cell death
Ta_S50379897	mlo-like protein 1	0,062	0,298	0,205	2,793	3,521	Cell death
Ta_S13102854	transmembrane bax inhibitor motif-containing protein 4	0,022	0,106	0,119	0,492	0,453	Cell death
Ta_S18007669	transmembrane bax inhibitor motif-containing protein 4	0,185	0,22	0,193	0,686	0,495	Cell death
Ta_S26029058	cyclin-dependent kinase f-2	0,37	0,173	0,964	2,635	3,944	Cell death
Ta_S16058421	apoptosis-inducing factor homolog a-like	0,147	-0,32	-0,449	-1,148	-1,357	Cell death
Ta_S22371236	cyclin-dependent kinase f-4	0,018	-0,255	-0,063	-1,141	-1,148	Cell death
Ta_S12952412	f-box-like protein	-0,373	-0,024	-0,377	-0,573	-0,649	f-box
Ta_S16236490	f-box kelch-repeat protein at1g51550-like	-0,155	-0,283	-0,23	-0,231	-0,832	f-box
Ta_S17988019	f-box protein at4g22280-like	-0,004	-0,081	-0,122	-0,865	-0,808	f-box
Ta_S32672994	f-box fbd lrr-repeat protein at1g66290-like	-0,384	-0,519	-0,377	-0,192	-0,926	f-box
Ta_S13019382	f-box and wd40 domain	-0,138	-0,317	-0,178	-1,662	-2,001	f-box
Ta_S17976363	f-box only protein 6-like	-0,275	-0,158	-0,135	-0,837	-0,743	f-box
Ta_S22391661	f-box lrr-repeat protein at3g48880-like	-0,105	-0,151	-0,156	-0,671	-0,776	f-box
Ta_S32611840	f-box kelch-repeat protein at1g55270-like	-0,128	-0,15	-0,174	-0,526	-1,238	f-box
Ta_S16247094	e3 ubiquitin-protein ligase march6	-0,232	-0,225	-0,271	-0,845	-0,777	e3 ubiquitin
Ta_S22369280	e3 ubiquitin-protein ligase mgrn1-like	-0,006	-0,211	-0,08	-0,629	-0,802	e3 ubiquitin
Ta_S26021451	e3 ubiquitin-protein ligase herc1	-0,208	-0,202	-0,111	-0,56	-0,838	e3 ubiquitin
Ta_S32554164	e3 ubiquitin-protein ligase mgrn1-like	-0,076	-0,207	-0,234	-0,341	-0,688	e3 ubiquitin
Ta_S26028963	e3 ubiquitin-protein ligase el5	-0,117	0,057	0,133	1,489	1,598	e3 ubiquitin
Ta_S22371236	cyclin-dependent kinase f-4	0,018	-0,255	-0,063	-1,141	-1,148	e3 ubiquitin

wheat AOX (*Waox 1a*) in *Arabidopsis* results in a decrease of reactive oxygen species production following an abiotic stress (Sugie et al. 2006). The ubiquitin-proteasome system (E3-ligase, F-box proteins) genes involved in immune response, programmed cell death (Hershko and Ciechanover 1998) and in grain development (Capron et al. 2012) were substantially down-regulated after *Fg* infection (**Fig. 5**) (**Table 1**). This supports the hypothesis that *Fg* response, grain development and cell death are possibly connected.

Detoxification of xenobiotic in plants involves chemical modifications of the mycotoxins (DON) by enzymes such as UGTs, GSTs or CYPs and further, additionnal steps for removing compounds (Coleman et al. 1997). DON detoxification has frequently been proposed as one of the resistance mechanisms of small grain cereals to FHB (Boutigny et al. 2008). In our study, we found that the detoxification mechanisms in wheat grain were activated. Among the detoxification processes, glucosylation of DON into DON-3Glc is the most unknown mechanisms (Lemmens et al. 2005; Schweiger et al. 2010). As revealed in our data, a number of genes potentially involved in detoxification processes were identified among the genes differentially regulated during the time course. They include genes encoding putative UGTs, GSTs, cytochrome P450 and ABC transporters suggesting that DON detoxification mechanisms in wheat grains could be very similar to those observed in *Brachypodium spp*, barley and in wheat rachis. These data suggest that despite the susceptibility of the cultivar used in this study (Recital) to FHB, genes involved in detoxification mechanisms are still induced agreeing with the detection of the QTLs involved in detoxification of mycotoxins in this genotype (Gervais et al. 2003).

The analysis of the dynamics of wheat gene expression in grain proves to be helpful to identify genes that are associated with the FHB disease. Our analysis provides a wealth of candidate genes and pathways involved in the FHB response but their exact role in the disease is still to be defined. These probably include several potential plant targets of *F. graminearum* effectors which are believed to enable colonization of the grain tissue. Genes and pathways have now to be characterized further regarding their genetic mechanisms and toward their potential interest in breeding.

Acknowledgements

This work is part of CC PhD work, funded by the French National Institute for Agronomic Research (INRA). We thank members of the PHACC unit and Florence Cambon for plants preparation, Philippe Lecomte and Cyrille Saintenac for fruitful discussions.

References

Amora Y, Chevionb M, Levinea A (2000) Anoxia pretreatment protects soybean cells against H(2)O(2)-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. FEBS Lett 477:175–180.

Ashraf M (2014) Stress-induced changes in wheat grain composition and quality. Crit Rev Food Sci Nutr 54:1576–1583. doi: 10.1080/10408398.2011.644354

Bai G-H, Plattner R, Desjardins A, et al (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

Bergmann DC, Fleming AJ (2010) From molecule to model, from environment to evolution: an integrated view of growth and development. Curr Opin Plant Biol 13:1–4. doi: 10.1016/j.pbi.2009.12.001

Table 2. Unigenes displaying T x D interaction and previously described as susceptibility genes in plants to fungal pathogens.

Ids	Seq. Description	Susceptibility genes in literature	Gene product	Plant	Pathogen	References
Ta_S17889107	wrky transcription factor	HvWRKY	Transcription factor WRKY	Barley	*Blumeria graminis (virulent)*	Shen et al. 2007
Ta_S17976942	wrky transcription factor					
Ta_S37223562	wrky transcription factor					
Ta_S44692925	wrky transcription factor					
Ta_S43896571	myb-like DNA-binding domain	MYB3R4	MYB transcription factor	Arabidopsis	*Golovinomyces orontii*	Chandran et al 2013
Ta_S17883980	mapk activating	OsMAPK5	MAP kinase	Rice	*Burkholderia glumae , Magnaporthe oryzae/grisea*	Xiong et al. 2003
Ta_S12950024	polygalacturonase	LePG andLeEXP1	Polygalacturonase and Expansin (double mutant tested)	Tomato	*Botrytis cinerea* (only fruit)	Cantu et al. 2008
Ta_S50379897	mlo-like protein 1	TaMLO	Membrane anchored protein	Wheat	*Blumeria graminis*	Varallyay et al. 2012
Ta_S12959527	zinc finger protein 1	IRG1/ PALM1	Transcription facor (Zn-finger) controlling wax biosynthesis	Medigaco	*Puccinia emaculata, Phakopsora pachyrhizi, Colletotrichum trifolii*	Ishiga et al. 2013
Ta_S26028647	zinc finger protein 1					
Ta_S17984200	patatin group a-3	PLP2	Patatin (Lipid acyl hydrolase)	Arabidopsis	*Botrytis cinerea, Pseudomonas syringae (avirulent)*	La Camera S et al. 2009
Ta_S15824043	patatin group a-3					

Bernardo A, Bai G, Guo P, et al (2007) *Fusarium graminearum*-induced changes in gene expression between Fusarium head blight-resistant and susceptible wheat cultivars. Funct Integr Genomics 7:69–77. doi:10.1007/s10142-006-0028-1

Bogorad L, Gubbins EJ, Krebbers E, et al (1983) Cloning and physical mapping of maize plastid genes. Methods Enzymol 97C:524–554. doi: 10.1016/0076-6879(83)97160-4

Bouarab K, Melton R, Peart J, et al (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. Nature 418:889–892. doi: 10.1038/nature00950

Boutigny A-L, Richard-Forget F, 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

Brauc S, De Vooght E, Claeys M, et al (2012) Overexpression of arginase in *Arabidopsis thaliana* influences defence responses against *Botrytis cinerea*. Plant Biol 1:39–45. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00520.x

Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, et al (2012) Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. Nature 491:705–710. doi: 10.1038/nature11650

Brewer HC, Hawkins ND, Hammond-Kosack KE (2014) Mutations in the Arabidopsis homoserine kinase gene DMR1 confer enhanced resistance to *F. culmorum* and *F. graminearum*. BMC Plant Biol 14:317. doi: 10.1186/s12870-014-0317-0

Buerstmayr H, Steiner B, Hartl L, 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

Cantu D, Vicente AR, Greve LC, et al (2008) The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. Proc Natl Acad Sci U S A 105:859–864. doi: 10.1073/pnas.0709813105

Capron D, Mouzeyar S, Boulaflous A, et al (2012) Transcriptional profile analysis of E3 ligase and hormone-related genes expressed during wheat grain development. BMC Plant Biol 12:35. doi: 10.1186/1471-2229-12-35

Chandran D, Inada N, Hather G, et al (2010) Laser microdissection of Arabidopsis cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. Proc Natl Acad Sci 107:460–465. doi: 10.1073/pnas.0912492107

Chandran D, Rickert J, Cherk C, et al (2013) Host cell ploidy underlying the fungal feeding site is a determinant of powdery mildew growth and reproduction. Mol Plant-Microbe Interact 26:537–545. doi: 10.1094/MPMI-10-12-0254-R

Chetouhi C, Bonhomme L, Lecomte P, 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/s10658-014-0552-0

Chu Z, Yuan M, Yao J, 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

Coleman J, Blake-Kalff M, Davies E (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends Plant Sci 2:144–151. doi: 10.1016/S1360-1385(97)01019-4

Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, et al (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinforma Oxf Engl 21:3674–3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610

Czaban J, Wróblewska B, Sułek A, et al (2015) Colonisation of winter wheat grain by Fusarium spp. and mycotoxin content as dependent on a wheat variety, crop rotation, a crop management system and weather conditions. Food Addit Contam Part Chem Anal Control Expo Risk Assess. doi: 10.1080/19440049.2015.1019939

Deeken R, Engelmann JC, Efetova M, et al (2006) An integrated view of gene expression and solute profiles of Arabidopsis tumors: a genome-wide approach. Plant Cell 18:3617–3634. doi: 10.1105/tpc.106.044743

Desmond OJ, Manners JM, Stephens AE, et al (2008) The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. Mol Plant Pathol 9:435–445. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00475.x

Diamond M, Reape TJ, Rocha O, 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

Dornez E, Croes E, Gebruers K, et al (2010) 2-D DIGE reveals changes in wheat xylanase inhibitor protein families due to *Fusarium graminearum* DeltaTri5 infection and grain development. Proteomics 10:2303–2319. doi: 10.1002/pmic.200900493

Eckardt NA (2002) Plant Disease Susceptibility Genes? Plant Cell 14:1983–1986. doi: 10.1105/tpc.140910

Eichmann R, Bischof M, Weis C, et al (2010) BAX *INHIBITOR-1* Is Required for Full Susceptibility of Barley to Powdery Mildew. Mol Plant Microbe Interact 23:1217–1227. doi: 10.1094/MPMI-23-9-1217

Erayman M, Turktas M, Akdogan G, et al (2015) Transcriptome analysis of wheat inoculated with *Fusarium graminearum*. Front Plant Sci 20:867. doi: 10.3389/fpls.2015.00867

Evers T, Millar S (2002) Cereal Grain Structure and Development: Some Implications for Quality. J Cereal Sci 36:261–284. doi: 10.1006/jcrs.2002.0435

Gardiner DM, Kazan K, Manners JM (2009) Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. Fungal Genet Biol 46:604–613. doi: 10.1016/j.fgb.2009.04.004

Gardiner DM, Kazan K, Praud S, et al (2010) Early activation of wheat polyamine biosynthesis during Fusarium head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. BMC Plant Biol 10:289. doi: 10.1186/1471-2229-10-289

Gervais L, Dedryver F, Morlais J-Y, 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

Giménez MJ, Pistón F, Atienza SG (2011) Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the *Triticeae*. Planta 233:163–173. doi: 10.1007/s00425-010-1290-y

Golkari S, Gilbert J, Prashar S, Procunier JD (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

González-Lamothe R, El Oirdi M, Brisson N, Bouarab K (2012) The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. Plant Cell 24:762–777. doi: 10.1105/tpc.111.095190

Gunnaiah R, Kushalappa AC, Duggavathi R, et al (2012) Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. PloS One 7:e40695. doi: 10.1371/journal.pone.0040695

Hauck P, Thilmony R, He SY (2003) A Pseudomonas syringae type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. Proc Natl Acad Sci U S A 100:8577–8582. doi: 10.1073/pnas.1431173100

Hershko A, Ciechanover A (1998) The Ubiquitin System. Annu Rev Biochem 67:425–479. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425

Ihara-Ohori Y, Nagano M, Muto S, et al (2007) Cell death suppressor Arabidopsis bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis. Plant Physiol 143:650–660. doi: 10.1104/pp.106.090878

Ilgen P, Hadeler B, Maier FJ, Schäfer W (2009) Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. Mol Plant-Microbe Interact 22:899–908. doi: 10.1094/MPMI-22-8-0899

Ishiga Y, Upplapapti S, Mysore KS (2013) Expression analysis reveals a role for hydrophobic or epicuticular wax signals in pre-penetration structure formation of *Phakopsora pachyrhizi*. Plant Signal Behav 8:e26959. doi: 10.4161/psb.26959

Ito M, Sato I, Ishizaka M, et al (2013) Bacterial Cytochrome P450 System Catabolizing the Fusarium Toxin Deoxynivalenol. Appl Environ Microbiol 79:1619–1628. doi: 10.1128/AEM.03227-12

Jia H, Millett BP, Cho S, et al (2011) Quantitative trait loci conferring resistance to Fusarium head blight in barleyrespond differentially to *Fusarium graminearum* infection. Funct Integr Genomics 11:95–102. doi: 10.1007/s10142-010-0192-1

Jørgensen IH (1992) Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. Euphytica 63:141–152. doi: 10.1007/BF00023919

Jubault M, Lariagon C, Taconnat L, et al (2013) Partial resistance to clubroot in Arabidopsis is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. Funct Integr Genomics 13:191-205. doi: 10.1007/s10142-013-0312-9

Koch KE, Ying Z, Wu Y, Avigne WT (2000) Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. J Exp Bot 51 Spec No:417–427.

Kong L, Anderson JM, Ohm HW (2005) Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. Genome 48:29–40. doi: 10.1139/g04-097

Kugler KG, Siegwart G, Nussbaumer T, 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

La Camera S, Balagué C, Göbel C, et al (2009) The Arabidopsis patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. Mol Plant-Microbe Interact 22:469–481. doi: 10.1094/MPMI-22-4-0469

Lapin D, Van den Ackerveken G (2013) Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. Trends Plant Sci 18:546-554. doi: 10.1016/j.tplants.2013.05.005

Lemmens M, Scholz U, Berthiller F, et al (2005) The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for Fusarium head blight resistance in wheat. Mol Plant-Microbe Interact 18:1318–1324. doi: 10.1094/MPMI-18-1318

Li Z, Zhou M, Zhang Z, Ren L, et al (2011) Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. Funct Integr Genomics 111:63–70. doi: 10.1007/s10142-011-0211-x

Limin AE, Fowler DB (1985) Cold hardness in *Triticum* and *Aegilops* species. Can J Plant Sci 65:71–77. doi: 10.4141/cjps85-010

MacNicol PK, Jacobsen JV (2001) Regulation of alcohol dehydrogenase gene expression in barley aleurone by gibberellin and abscisic acid. Physiol Plant 111:533–539.

Ma H-X, Bai G-H, Gill BS, Hart LP (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

McMullen M, Jones R, Gallenberg D (1997) Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. Plant Dis 81:1340–1348.

Milla R, Gustafson JP (2001) Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. Genome 44:883–892.

Nadaud I, Girousse C, Debiton C, et al (2010) Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. PROTEOMICS 10:2901–2910. doi: 10.1002/pmic.200900792

Pasquet J-C, Chaouch S, Macadré C, et al (2014) Differential gene expression and metabolomic analyses of Brachypodium distachyon infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of *Fusarium graminearum*. BMC Genomics 15:629. doi: 10.1186/1471-2164-15-629

Pathuri IP, Reitberger IE, Hückelhoven R, Proels RK (2011) Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis f.sp*. hordei. J Exp Bot 62:3449–3457. doi: 10.1093/jxb/err017

Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, 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/s11032-009-9323-6

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:e45.

Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, et al (2003) Detoxification of the Fusarium Mycotoxin Deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 278:47905–47914. doi: 10.1074/jbc.M307552200

Rawat N, Sehgal SK, Joshi A, et al (2012) A diploid wheat TILLING resource for wheat functional genomics. BMC Plant Biol 12:205. doi: 10.1186/1471-2229-12-205

Rogers SO, Bendich AJ (1994) Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) Plant Molecular Biology Manual. Springer Netherlands, pp 183–190

Schweiger W, Boddu J, Shin S, et al (2010) Validation of a candidate deoxynivalenol-inactivating UDP-glucosyltransferase from barley by heterologous expression in yeast. Mol Plant-Microbe Interact 23:977–986. doi: 10.1094/MPMI-23-7-0977

Schweiger W, Pasquet J-C, Nussbaumer T, et al (2013) Functional characterization of two clusters of Brachypodium distachyon UDP-glycosyltransferases encoding putative deoxynivalenol detoxification genes. Mol Plant-Microbe Interact 26:781–792. doi: 10.1094/MPMI-08-12-0205-R

Shen Q-H, Saijo Y, Mauch S, et al (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. Science 315:1098–1103. doi: 10.1126/science.1136372

Siemens J, Keller I, Sarx J, et al (2006) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. Mol Plant-Microbe Interact 19:480–494. doi: 10.1094/MPMI-19-0480

Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol 3:1-25. doi: 10.2202/1544-6115.1027

Smyth GK, Speed T (2003) Normalization of cDNA microarray data. Methods San Diego Calif 31:265–273.

Sugie A, Naydenov N, Mizuno N, et al (2006) Overexpression of wheat alternative oxidase gene Waox1a alters respiration capacity and response to reactive oxygen species under low temperature in transgenic *Arabidopsis*. Genes Genet Syst 81:349–354.

Sutton JC (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Can J Plant Pathol 4:195–209. doi: 10.1080/07060668209501326

Tsuge T, Harimoto Y, Akimitsu K, et al (2013) Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. FEMS Microbiol Rev 37:44–66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00350.x

Tuite J, Shaner G, Everson RJ (1990) Wheat scab in soft red winter wheat in Indiana in 1986 and its relation to some quality measurements. Plant Dis 74:959–962. doi: 10.1094/PD-74-0959

Várallyay É, Giczey G, Burgyán J (2012) Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. Arch Virol 157:1345–1350. doi: 10.1007/s00705-012-1286-y

Walter S, Kahla A, Arunachalam C, et al (2015) A wheat ABC transporter contributes to both grain formation and mycotoxin tolerance. J Exp Bot. 66:2583-2593. doi: 10.1093/jxb/erv048

Wanous MK, Munkvold JD, Kruse JD, et al (2003) Identification of chromosome arms influencing expression of the HMW glutenins in wheat. Theor Appl Genet 106:213–220. doi: 10.1007/s00122-002-1098-7

Wan Y, Poole RL, Huttly AK, et al (2008) Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat. BMC Genomics 9:121. doi: 10.1186/1471-2164-9-121

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

Zhu X, Li Z, Xu H, et al (2012) Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistances to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. Funct Integr Genomics 12:481-488. doi: 10.1007/s10142-012-0286-z

Legend of supplementary tables

Table S1a. Normalized data from wheat grain development microarray expression analysis and statistical analysis. Data are presented as median values.

Table S1b. Complete list of all genes displaying at least one significant effect in the 2-ways ANOVA model. Ratios computed from in log2 of Fg-inoculated vs control plants are depicted for each gene.

Table S2a. Gene ontology retrieved for genes showing *Fg*-treatment effect (T genes).

Table S2b. Gene ontology retrieved for genes showing both *Fg*-treatment and development effects (T + D genes).

Table S2c. Gene ontology retrieved for genes showing a *Fg*-treatment by development interaction effect (T x D genes).

Table S2d. Gene ontology enrichment results given for T, T + D and T x D genes.

Table S3. Primer sequences used for qRT-PCR analysis.

Table S4a. List of T genes displaying an up-regulation in response to *Fg* treatment.

Table S4b. List of T genes displaying a down-regulation in response to *Fg* treatment.

Table S4c. Gene ontology and biological processes classification of T genes.

Table S5a. List of genes showing an up-regulation upon *Fg* treatment along with a continuous down-regulation during grain development.

Table S5b. List of genes showing a down-regulation upon *Fg* treatment along with a continuous down-regulation during grain development.

Table S5c. List of genes showing an up-regulation upon *Fg* treatment along with a continuous up-regulation during grain development.

Table S5d. List of genes showing a down-regulation upon *Fg* treatment along with a continuous up-regulation during grain development.

Table S5e. Gene ontology and biological process classification of genes showing up or down regulation during grain development and up or down regulation in response to *Fg* treatment.

Table S6. List of genes showing significant development by *Fg* treatment interaction.

Table S7. The distribution of *Fg*-responsive genes on wheat chromosomes.

Table S8. The distribution of *Fg*-responsive genes for 5D and 7D chromosomes.

Discussion et Perspectives de la thèse

1- Discussion

Mon projet de Thèse avait comme objectifs principaux (1) d'établir pour la première fois le catalogue des gènes, mécanismes et processus biologiques impactés par le développement du champignon mycotoxinogène *Fusarium graminearum* au cours du développement du blé tendre, et (2) au travers de cette caractérisation, d'apporter des éléments de compréhension du déterminisme de la sensibilité du blé tendre à la fusariose de l'épi. La première originalité du travail réside dans le choix du matériel biologique analysé. Cette étude a reposé sur l'analyse comparée du protéome et du transcriptome de grains de blés d'une variété sensible de blé tendre Récital, sains ou infectés par une souche de *Fusarium graminearum* agressive et mycotoxinogène.

La seconde originalité concerne l'exploration d'une cinétique d'infection de 26 jours couvrant les principales phases clés du développement du grain : division cellulaire, différentiation cellulaire et remplissage du grain (Nadaud et al., 2010). En prenant en compte, l'ontogénie du grain et ses réarrangements moléculaires spécifiques, l'analyse statistique des données –omiques a permis de discriminer différentes populations de gènes en fonction de leur implication dans le développement de la maladie et de leurs connexions avec les ajustements intrinsèques au développement du grain. Les résultats ont permis de définir trois groupes de gènes se distinguant par leurs normes de réaction, soit par un effet de l'infection par *F. graminearum* seul, par un effet combiné de l'infection et du développement du grain, ou enfin par un effet de leur interaction. Ces trois groupes rassemblent un total de 1309 gènes, parmi lesquels 536 gènes ne montrent pas de variation significative au cours du développement du grain, mais répondent d'une manière significative au FHB. L'annotation fonctionnelle de ces gènes montre que ce groupe est enrichi en gènes impliqués dans la réponse aux stresses biotiques et abiotiques comme un certain nombre de protéines PR (Pathogenesis-Related protein), des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif comme les GST ou encore dans la détoxification des mycotoxines comme les UGT, les CYTP450 et les transporteurs ABC. La majorité de ces gènes sont induits en réponse à la synthèse et à l'accumulation des DON dans les grains infectés. La grande majorité de ces gènes sont également induits dans des contextes résistants (Buerstmayr et al., 2003 ; Kong et al., 2005). Ensuite, une identification de 601 gènes présentant à la fois un effet du développement et un effet de l'infection par le champignon *Fg* sont sortis de cette analyse. Les gènes appartenant à ce groupe peuvent moduler la réponse à l'infection, soit en augmentant ou en diminuant la sensibilité de la plante au FHB, tout en régulant le développement du grain. Enfin, notre analyse a permis d'identifier 172 gènes ayant

une interaction entre le développement du grain et la réponse au FHB, *i.e.*, présentant des profils d'expression en réponse au FHB spécifiques du stade de développement des grains.

L'analyse fine des gènes de ces deux derniers groupes a permis de mettre en évidence l'activation de cascades de signalisation connues pour être impliquées dans la réponse aux agents pathogènes, l'induction de plusieurs familles de gènes impliqués dans la détoxification des mycotoxines, une possible inhibition du processus de mort cellulaire, et d'importants changements dans le métabolisme primaire de l'hôte. Ces changements s'opèrent spécifiquement au cours du développement du champignon dans les tissus du grain (quantification de la masse fongique *in planta* par qPCR) et pour certains en réponse à la production massive de DON, évaluée *via* le niveau d'expression du gène *FgTRI5*, gène régulé codant une trichodiène synthase, premier gène de la voie de biosynthèse du DON.

1-1- Signalisation cellulaire

La reconnaissance de l'agent pathogène par les cellules végétales conduit à l'activation des composantes de la signalisation. Parmi ces signaux, on distingue les modifications de la perméabilité de la membrane plasmique par des flux Ca^{2+} des flux de K^{+} et d'anion en particulier de Cl^{-} ou NO^{3-}. Ces flux déclenchent une dépolarisation de la membrane plasmique (MacRobbie, 1998). Notre étude a permis d'identifier plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la transduction du signal résultant de la perception de l'agent pathogène par la plante, avec en particulier, l'induction de gènes codant des calmodulines, protéines liant le calcium, suggérant l'implication des ions de calcium et des calmodulines dans l'interaction *Fusarium*/blé. Le rôle clef des flux de calcium dans la production des ROS et le déclenchement de la mort cellulaire programmée (PCD) pour limiter la croissance de *F. graminearum* a déjà été évoqué (Ding et al., 2011 ; Gunnaiah et al., 2012). Plus récemment, les travaux de Thèse de Raghavendra Gunnaiah (thèse soutenue en avril 2013 à l'Université de McGill) ont mis en évidence l'implication d'une calmoduline dans la sensibilité du blé à la fusariose de l'épi. Dans leur modèle expliquant la sensibilité (*vs* résistance) à la fusariose de l'épi, ces auteurs émettent l'hypothèse d'une délétion dans la région contenant le QTL fhb1, ou la présence d'un site de liaison à la calmoduline non-fonctionnel, chez les lignées résistantes par rapport aux lignées sensibles. Chez les lignées sensibles, la fixation de la calmoduline à un domaine fonctionnel (ou non délété) de la protéine codée par le gène TaCaMBP_fhb1 active la voie de signalisation calcique aboutissant à la mort cellulaire programmée (PCD) et donc à la sensibilité de la plante à l'agent pathogène. Chez les lignées résistantes, la non-fonctionnalité de ce domaine (ou sa délétion) empêche la fixation de la calmoduline et l'activation de la voie qui permet le

déclenchement de la mort cellulaire. Les flux de calcium peuvent également agir en amont d'autres évènements cellulaires, en particulier la production d'azote (NO) et la phosphorylation de MAP kinases (Mitogen Activated Protein Kinase) (Pedley and Martin, 2005). Parmi les protéines kinases identifiées dans notre analyse, on distingue des MAP Kinases, des serine/thréonine protéine kinases et des leucine-rich repeat receptor-like protein kinases. Certains de ces gènes sont sous-exprimés et d'autres sur-exprimés (*cf*-données transcriptomiques) mettant en évidence la complexité des voies de signalisation cellulaire mises en jeu lors de l'interaction entre le blé et le champignon *F. graminearum*.

1-2- Régulation hormonale

Les phytohormones sont également impliquées dans la transduction des signaux perçus par la plante lors de son interaction avec des agents pathogènes. De nombreuses études ont permis d'identifier le rôle indispensable que jouent l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène, l'auxine, l'acide gibbérellique et l'acide abscissique dans les réponses de défense aux stress biotiques (Asselbergh et al., 2008 ; Bari and Jones., 2009). Ces molécules impliquées également dans le développement et la croissance des plantes, constituent généralement le relai entre les évènements précoces de la signalisation et l'activation ou l'inactivation des mécanismes de défense de la plante. De plus, elles sont impliquées dans la transmission de l'information entre les cellules induisant ainsi une réponse systémique comme la SAR (résistance systémique acquise) dans le cas d'une résistance (Durrant and Dong, 2004). Nos résultats montrent que la réponse d'un grain de blé au *Fusarium* fait intervenir des phytohormones. Parmi les gènes identifiés, plusieurs correspondent à des facteurs de transcription régulant des gènes dont l'expression est dépendante de l'éthylène (ET) (Yoo et al., 2009) suggérant l'implication de l'éthylène dans l'interaction grain de blé/*F. graminearum*. Des résultats récents ont montré le rôle de l'ET dans la résistance du blé au FHB (Gillespie et al., 2012). En effet, le silencing de la S-adenosyl-methionine synthetase (SAM) ou d'un facteur de transcription ET dépendant (*TaERF7*) par la technique du VIGS induit une sensibilité au FHB des plantes traitées.

Par ailleurs, notre étude montre une induction de l'unigène codant l'indole-3-acetic acide (IAA) - amino synthétase. L'IAA est une auxine essentielle dans la régulation de croissance des plantes et leur développement, et est impliquée dans la sensibilité des plantes aux agents pathogènes. Chez la plante *A. thaliana*, les gènes GH3 codent pour des IAA-amino synthetases qui sont impliquées dans l'homéostasie de l'auxine en régulant la conjugaison de l'IAA à des acides aminés (Staswick et al., 2005). Des études ont montré l'implication de tels gènes lors de

l'interaction biotrophe. Par exemple la surexpression du gène GH3.5 chez *A. thaliana* conduit à une accumulation importante de SA et une augmentation de l'expression du gène PR1 en réponse à l'agent pathogène *Pseudomonas syringae*. Un mutant de gh3.5 montre des niveaux élevés de l'IAA libre après infection par *P. Syringae* et une augmentation de la sensibilité des plantes aux bactéries. Il a ainsi été démontré que la protéine GH3.5 agit comme un modulateur bi-fonctionnel dans la signalisation SA et auxine (Zhang et al., 2007b).

1-3- Facteurs de transcription

Cette analyse a permis de mettre en évidence plusieurs facteurs de transcription appartenant à plusieurs familles (Nac, Wrky, Myb, EREBP, Zinc finger…). Plusieurs de ces facteurs ont été également identifiés dans les précédentes études portant sur les interactions *Fg*/blé (Kugler et al., 2013 ; Ding et al., 2014) et dans d'autres interactions hôte/agent pathogène (Jubault et al., 2013). Ils présentent des profils d'expression différents, certains sont surexprimés et d'autres sous exprimés après inoculation. L'appartenance de ces facteurs à plusieurs familles et les profils d'expression variés peuvent suggérer que ces gènes sont impliqués dans le contrôle de plusieurs processus biologiques et les différentes phases de développement du grain et de l'agent pathogène. Kugler et al. 2013 ont mis en évidence une induction précoce de la famille des Wrky chez les épis inoculés par le champignon *F. graminearum* dans les lignées résistantes par rapport aux lignées sensibles. Cependant, ils n'observent pas de différence significative entre le nombre de facteurs de transcription Wrky induits entre les deux lignées en comparaison avec d'autres gènes comme les NBS-LRR et les glucanases (gènes de défense) qui sont plus nombreux dans les lignées résistantes par rapport aux lignées sensibles. Cette induction non-spécifique des facteurs de transcription WRKY suppose que les différences moléculaires entre les lignées sensibles et les lignées résistantes résident dans la nature des cibles (gènes et voies métaboliques) régulées par ces facteurs de transcription. Récemment, l'expression d'un facteur de transcription de la même famille (*TaWRKY68*) a été analysée en PCR quantitative (Ding et al., 2014) en réponse à deux agents pathogènes (*Agrobacterium tumefaciens* et *Blumeria graminis*) et à un traitement au Déoxynivalenol (DON) produite par le champignon *F. graminearum*. Le résultat montre une forte induction de ce facteur suite à l'inoculation avec les deux agents pathogènes et au traitement par les DON. Cette même analyse a permis de mettre en évidence une expression différentielle de ce facteur entre les différents stades développementaux de la plante, suggérant également un lien entre la réponse de la plante aux différents stresses (biotiques et abiotiques) et le stade ontogénique de la plante. L'autre famille de facteurs de transcription connue pour être impliquée dans la réponse aux agents pathogènes

chez le blé est la famille Nac. Ces facteurs jouent un rôle important dans le développement de la plante et dans la réponse aux stress abiotiques. Plus récemment, une analyse fonctionnelle d'un facteur de transcription Nac de la famille *TaNac1* et son implication dans la réponse aux agents pathogènes a été réalisée. Ce gène a été d'abord cloné et caractériser à partir du blé tendre. Il est localisé dans le noyau et il contient un site d'activation dans le domaine C-terminal de la protéine. Il est fortement exprimé dans les racines et il est impliqué dans la réponse aux agents pathogènes obligatoires comme *Puccinia striiformis f. sp.* Du VIGS a été appliqué sur ce gène pour diminuer son expression *in planta.* Les plantes qui ont subi le VIGS ont été ensuite testées pour leur résistance (ou sensibilité) à la rouille jaune. Les plantes qui présentent une sous-expression du facteur *TaNAC1* (traitées au VIGS) sont plus résistantes que les plantes sauvages (non-traitées au VIGS) à la rouille jaune (Wang et al., 2015). L'expression de ce même facteur chez la plante *A. thaliana*, augmente la sensibilité et réduit la résistance systémique acquise vis-à-vis de la bactérie *Pseudomonas syringae.* Cette expression hétérologue induit également un développement plus important des racines latérales chez *A. thaliana* (Wang et al., 2015). La surexpression de ce facteur réprime les gènes de défense PR1 et PR2 et le facteur transcription *AtWRKY70*, qui agit comme un connecteur entre les voies JA et SA. Ainsi, le gène *TaNAC1* est considéré comme un régulateur négatif de la résistance aux maladies chez les plantes (Blé et *A. thaliana*) et également impliqué dans la modulation des cascades de signalisation JA et SA dépendante.

1-4- Mécanismes impliqués dans la détoxification des DON

Une des caractéristiques de la Fusariose de l'épi (FHB) est la production de mycotoxines *in planta* par les différentes espèces de *Fusarium spp* au cours de leur processus infectieux, dont les principales, au champ, sont les TCT de type B (DON et NIV). Ces mycotoxines sont supposées agir comme des facteurs de virulence (Bai et al., 2002). Pour lutter contre ces toxines, les plantes hôtes disposent de mécanismes de détoxification efficaces, impliquant dans un premier temps la modification chimique de la mycotoxine par conjugaison (UGT et GST), ou par dégradation (CYTP450), des étapes de transport et/ou de compartimentation (Coleman et al., 1997). La détoxication des DON a été souvent proposée comme l'un des mécanismes de résistance à la fusariose de l'épi chez les céréales (Boutigny et al., 2008). Parmi les processus les plus connus de la détoxication, la conjugaison par glycosylation des DON en DON-3-Glc (Moretti et al., 2014) et leur glutathionylation (transformation des DON en DON-S-glutathione), qui a été proposé comme un processus alternatif à la glycosylation. Nos données permettent d'identifier plusieurs gènes potentiellement impliqués dans le processus de

détoxification des mycotoxines. Il s'agit notamment des unigènes codant des UGT, GST et les CYTP450. La grande majorité de ces gènes sont induits à partir de 150°Cd ou 250°Cd, c'est-à-dire après la forte expression du gène *TRI5* (gène clé de la biosynthèse des DON) reflétant probablement une production massive de DON au moment de l'augmentation de la masse fongique. Ceci soutient l'idée que ces gènes répondent d'une manière spécifique au DON. De plus, il a été observé que l'inoculation de *Brachypodium distachyon (Bd)* avec une souche de *F. graminearum (Fg)*, portant une délétion du gène *TRI5* et donc incapable de produire de la DON (DON^-), n'induit pas la plupart de ces gènes, notamment les UGT (Pasquet et al., 2014). Les gènes les plus intéressants, identifiés dans notre analyse, concernent deux orthologues du gène *Bradi5g0300* qui code pour une UDP-glycosyltransférase et précédemment identifié chez *Bd* comme impliqué dans la glycosylation et la détoxification du DON (Schweiger et al., 2013). Ce résultat renforce l'idée que la détoxification des DON chez les céréales implique les UGT et la glycosylation. L'autre étape de la détoxification des DON est le transport et la compartimentation des formes modifiées des DON. Parmi les gènes décrits comme impliqués dans le transport de ces formes glycosylées, les ABC transporteurs et les Multi Drug Transporters (MDR). Notre analyse a permis d'identifier certains unigènes codant des ABC transporteurs et des MDR. Le plus intéressant est l'ABC transporteur *TaABCC3*. Deux orthologues de ce gène sont identifiés dans le groupe des gènes ayant un effet de l'interaction entre le développement du grain et l'inoculation avec le champignon *Fg.* Une étude fonctionnelle et structurale de ce gène a permis de le localiser sur le bras court du chromosome 3B du blé (ne co-localise pas avec le QTL fhb1) et de confirmer sa contribution dans la tolérance aux DON (Walter et al., 2015). La dérégulation (sous expression) de ce gène par l'utilisation du VIGS conduit à 2,2 ($p<0,05$) fois plus d'épillets décolorés (symptôme de la fusariose) chez les épis traités aux DON par rapport aux épis non traités (traités uniquement au Tween 20), montrant ainsi le rôle de ce gène dans la tolérance aux DON. Par ailleurs, l'inactivation de ce gène par VIGS conduit à une réduction de 28 % du nombre de grains à la fois chez les épis traités et non traités avec le DON. Ce gène joue donc un rôle dans la résistance à l'accumulation des DON dans les grains et dans le développement du grain. Cette validation fonctionnelle du rôle de ce gène identifié dans notre analyse dans le groupe des gènes montrant une interaction entre le développement du grain et l'inoculation de *Fg* (I x D) est un des exemples qui confirme la robustesse de notre étude transcriptomique. Ce gène peut présenter un grand intérêt pour les sélectionneurs, sa surexpression pouvant conduire à l'augmentation non seulement du niveau de résistance au DON (qualité sanitaire), et à l'augmentation du nombre de grain (rendement).

En dépit de l'induction d'un arsenal complexe et diversifié de gènes potentiellement impliqués dans la détoxication de la DON (GST, UGT, CYTP450, transporteurs ABC) chez la variété Récital, celle-ci reste néanmoins sensible au FHB. Ceci est confirmé par le dosage des [DON] dans les grains infectés du cultivar sensible « Récital » et du cultivar tolérant « Renan », réalisé par dosage HPLC MS/MS, qui montre un niveau de contamination très supérieur chez Récital (56 mg/Kg)/Renan (14 mg/Kg) (thèse de Laurent Gervais, soutenue en 2003). Ces résultats reflètent un possible problème de détoxification de la DON produite au cours de l'infection, et *de facto*, une difficulté à contrôler efficacement l'infection ou lier à l'utilisation, par l'agent pathogène, de deux stratégies parasitaires différentes propres à chaque génotype. Ces résultats, ainsi que d'autres, suggèrent fortement que plus que la composition de l'arsenal de détoxification en lui-même, c'est la cinétique de sa mise en œuvre qui peut conditionner le niveau de résistance. Ainsi, l'expression constitutive du gène d'UGT identifié comme capable de glycosyler spécifiquement le DON conduit à une augmentation du niveau de résistance d'un génotype sensible de *Brachypodium dystachyon* (Pasquet et al, 2014). La très forte production de DON au front de colonisation des tissus, nécessaire au développement de l'infection, est couteuse d'un point de vue métabolique et énergétique. Elle peut s'expliquer par la nécessité pour le champignon d'en produire suffisamment pour qu'une partie ne soit pas détoxifiée par l'ensemble des processus de détoxification exprimés massivement par la plante, et reste active.

1-5-Rôle de la mort cellulaire programmée (PCD) dans l'interaction entre le blé tendre et *Fg*

Des travaux récents ont suggéré l'implication de la mort cellulaire dans le processus infectieux de *F. gramin*earum dans des épillets infectés (glumes, glumelles, rachis et embryon) (Desmond et al., 2008). Récemment, une analyse histologique de l'interaction entre *Brachypodium distachyon* (*Bd21*) et deux souches de *Fg*, une productrice de DON (DON+) et l'autre pas (DON-) a montré que les glumelles infectées par une souche DON+ présente une forte colonisation par les hyphes fongiques accompagnée d'une extension de la mort cellulaire dans les tissus infectés tandis que les glumelles inoculées par une souche (DON-) présentent une faible extension des hyphes et de la mort cellulaire (Pasquet et al., 2014) renforçant l'idée de l'implication des DON dans le déclenchement de la mort cellulaire. Cependant, il a été montré également que de très faibles concentrations de DON peuvent inhiber la mort cellulaire programmée (PCD) chez les plantes (Diamond et al., 2013). L'hétérogénéité des tissus formant un épi de blé (glumes, glumelles, rachis, anthères et grains) suggère l'intervention d'événements moléculaires différents lors de la colonisation de chaque tissu (Golkari et al., 2007). Une étude récente s'intéressant au contenu des DON dans chaque organe (tissu) formant

un épillet de blé montre que les niveaux de DON dans les glumelles et le rachis sont nettement supérieurs à ceux observés sur les grains (Cowger and Arellano, 2013). Par conséquent, nos résultats montrant clairement une forte induction des gènes impliqués dans la régulation négative de la mort cellulaire (ex. gène MLO et gène codant un inhibiteur de la protéine Bax) et une répression des gènes impliqués dans l'induction de la mort cellulaire (ex. gène codant apoptosis-inducing factor homolog a-like (aifA)) pendant la phase de remplissage du grain suggèrent que les symptômes observés sur les grains (grains ridés et de petite taille) ne relèvent pas de la mort cellulaire mais juste une conséquence de détournement des voies métaboliques de la plante au profit de l'agent pathogène. Afin de valider cette hypothèse, nous proposons de mener une analyse cytologique plus fine et plus détaillée sur des grains et ses différentes parties (couches aleurones et albumen) durant leur infection par le champignon *F. graminearum* de façon à préciser la nature des symptômes observés sur les grains infectés. En effet, des études microscopiques sur des échantillons infectés avec des colorations spécifiques telles que le bleu de trypan pourraient être envisagées pour montrer s'il y a ou pas mort cellulaire. Ensuite, des marqueurs caractérisant spécifiquement la mort cellulaire pourraient être suivis au cours du processus infectieux.

1-6-Impact du développement de l'infection sur le métabolisme primaire de la plante hôte

Une interaction étroite entre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du grain et la réponse à la fusariose de l'épi a été déjà esquissée dans différentes études protéomiques (Dornez et al., 2010 ; Gunnaiah et al., 2012). Nos résultats montrent clairement une association très forte entre la croissance du champignon *Fg* et développement du grain. Jusqu'à un stade avancé de l'infection, la présence et le développement, même massif, du champignon *in planta* ne perturbe pas significativement le développement du grain. L'analyse par qPCR de l'évolution de la masse fongique a clairement montré que la prolifération du champignon dans les tissus du grain ne semble pouvoir se faire qu'après le début de la phase du remplissage du grain, entre 250°Cd et 450°Cd, avec des grains présentant des symptômes plus importants (plus petits et plus ridés). Cette phase de développement fongique est associée à une diminution de la synthèse des protéines de réserve (à 250°Cd) et de la synthèse de l'amidon (entre 250°Cd et 450°Cd), deux des constituants majeurs d'un grain de blé tendre mature, avec une augmentation très importante des voies catabolisant ces réserves. Ces activités enzymatiques végétales, associées à l'expression par le champignon d'un arsenal enzymatique complexe (protéases, glucosidases), vont participer à la dégradation de ces deux composants complexes en composants plus simples (glucose et acides aminés), facilement assimilables par

l'agent pathogène. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'action du champignon *in planta* favoriserait la production de sucres simples, comme le glucose et le saccharose, par rapport à celle, normalement privilégiée lors de la phase de remplissage du grain de sucres plus complexes, comme l'amidon. Ces monosaccharides peuvent être utilisés non seulement pour la synthèse des DON par le champignon *Fg* par induction des gènes TRI4 et TRI5 impliqués dans les premières étapes de la biosynthèse des trichothécènes (Jiao et al., 2008), mais aussi pour assurer sa propre croissance (Guenther et al., 2009). Les mécanismes de production de l'énergie ont été également modifiés lors de l'inoculation du blé avec le champignon *F. graminearum*, avec induction de la glycolyse et de la fermentation de l'éthanol. L'infection semble avoir induit un changement métabolique à 250°Cd de l'aérobie à la fermentation anaérobique. Ce changement métabolique a également été observé chez la plante *A.thaliana* infectée par la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Deeken et al., 2006). En raison de limitations en glucose détourné par le champignon *F. graminearum*, les cellules des tissus infectés du grain peuvent facilement devenir hypoxiques et passer au métabolisme énergétique de fermentation. Une seconde hypothèse a été suggérée par Koch et al., (2000) qui ont montré que l'alcooldéshydrogénase ADH1, une principale enzyme régulatrice de la fermentation de l'éthanol, répond aux sucres oxygénés (stress oxydatif) à certaines concentrations physiologiques. L'accumulation des sucres oxygénés au niveau des sites d'infection pourrait ainsi induire une réponse à l'hypoxie et par conséquent forcer les cellules végétales à basculer dans le métabolisme énergétique de fermentation. Ce changement métabolique coïncide parfaitement avec la première augmentation de la masse fongique (250°Cd), ensuite accentué à partir de 450°Cd (deuxième augmentation de la masse fongique), ce résultat suggère que les cellules du champignon rentrent en compétition avec les cellules végétales non infectées pour l'acquisition du glucose. Le glucose assimilé par les cellules fongiques permet la croissance du champignon et la synthèse de ses métabolites, en revanche celui assimilé par les cellules végétales sera utilisé comme source d'énergie pour se défendre contre l'agent pathogène. Par ailleurs, il a été démontré que le métabolisme azoté joue un rôle important chez les plantes lors d'une infection par un agent pathogène. Les plantes infectées augmentent leur demande en énergie. Outre le glucose, les acides aminés libres (métabolisme azoté) présents chez la plante constituent une autre source d'énergie. Nous pouvons imaginer qu'une partie de ces acides aminés destinés chez les grains sains à la synthèse des protéines de réserve est contournée dans les grains infectés pour produire de l'énergie sous forme d'ATP en empruntant la voie du cycle de Krebs (Bolton, 2009 ; Seifi et al., 2013). Cette hypothèse pourrait expliquer la dérégulation d'un certain nombre de gènes impliqués dans le cycle de Krebs dans les grains infectés par le

champignon *Fg* qui sont identifiés dans l'analyse du protéome et du transcriptome du grain infecté.

De plus, la dérégulation des gènes liés au métabolisme de l'agmatine (agmatine deiminase et agmatine coumaroyltransferase) et de l'ornithine (ornithine decarboxylase et acetylornithine) confirme leur rôle potentiel précédemment évoqué dans une étude métabolo-protéomique (Gunnaiah et al., 2012). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'infection par le champignon *Fg* induit une conversion de l'agmatine en polyamine. Or, l'accumulation des polyamines peut induire la production des DON, en augmentant d'avantage la pathogénicité du champignon (Gardiner et al., 2009). L'autre gène dérégulé (surexpression suite à l'infection par *Fg*) qui pourrait participer à l'installation du champignon est l'unigène codant la protéine polygalacturonase (PGs). Cette hydrolase a été décrite comme une des premières classes impliquées dans l'invasion des plantes par les champignons (Bézier et al., 2002). Les polygalacturonases sont généralement d'origine fongique, pour se défendre, la plante synthétise des inhibiteurs de ces hydrolases pour se protéger contre les infections fongiques (PGIs) (Hou et al., 2014). Une induction des PG du blé lors de l'infection par le *Fg* pourrait donc participer à l'installation du champignon.

Les résultats obtenus au cours de cette Thèse apportent donc un éclairage nouveau et original sur les processus cellulaires végétaux sous-tendant le développement de l'infection dans le grain, en les replaçant dans une dimension cinétique. Une seconde originalité concerne : (*i*) La confirmation du lien étroit existant entre le développement du grain et le développement de l'infection. Nos résultats, associés à d'autres, montrent clairement la relation qui s'est établi au cours du processus développemental des deux partenaires (grain et champignon), avec un champignon infectant le grain dès la floraison, pénétrant les tissus sans multiplication significative, et *in fine*, ne décidant de se multiplier massivement qu'après le démarrage de la phase de remplissage du grain. La phase asymptomatique, relativement longue, ne signifiant bien sûr pas l'absence d'activité des deux partenaires, la réponse de la plante mettant clairement en évidence l'action du champignon pathogène. (*ii*) La nature et le timing des processus mis en jeu suggèrent fortement l'existence d'un véritable processus de **manipulation parasitaire** des cellules végétales par *F. graminearum,* avec comme objectif, la création dans les tissus infectés d'un environnement physiologique plus favorable au développement de l'agent pathogène. Les résultats obtenus permettent de requestionner la nature de l'interaction entre le grain de blé tendre et *Fusarium graminearum* : biotrophe, hémibiotrophe ou nécrotrophe, qui fait encore l'objet de discussions. Si certaines études récentes ont suggéré que

l'interaction entre *Fg* et le blé tendre était de type hémibiotrophe, caractérisée par une phase biotrophe courte, avec un développement du champignon dans des espaces intercellulaire sans production de DON, et une phase de nécrotrophie plus longue sur les glumes, glumelles, rachis, durant laquelle le champignon a besoin de fortes quantités de DON pour se développer (Cowger and Arellano, 2013). Toutefois, la distinction de ces deux phases reste délicate et dépendante de nombreux paramètres. La difficulté à trancher résulte peut-être du fait que l'épi est un organe complexe avec des tissus de nature et d'organisation différentes. Il a déjà été montré que *F. graminearum* était capable d'adapter son processus infectieux à l'organe ou au tissus infecté : nécrotrophe sur grains matures, tissus du collet et des feuilles, biotrophe ou hémibiotrophe sur grain en développement ?

En effet, contrairement aux feuilles adultes formées de tissus homogènes, l'épi de blé est constitué de six tissus différents (glumes, glumelles, rachis, anthères, embryon, et enfin grain), dont les développements ontogéniques sont asynchrones (Nadaud et al., 2010 ; Capron et al., 2012). Les symptômes de la fusariose de l'épi sont observés sur tous les tissus. L'apparition des premiers symptômes sur grain a lieu entre trois et sept jours après inoculation. Des différences peuvent être observées selon le cultivar, la virulence de la souche de *F. graminearum* utilisée, et surtout du mode d'inoculation utilisé. Une inoculation par injection dans la cavité florale permet d'avoir des symptômes beaucoup plus précoces qu'une inoculation par spray. Les premiers symptômes sur grains induits chez le cultivar « Récital » sensible suite à une inoculation par spray, apparaissent au bout de 6 à 7 jours après inoculation, c'est-à-dire à partir de 150°Cd. À 15 jours après inoculation (à 250°Cd), une grosse partie des grains prélevés sur un épi inoculés présentent des symptômes de FHB et enfin à 350°Cd et 450°Cd presque la totalité des grains récoltés sont fusariés. Du côté champignon, nous observons que la synthèse des DON se fait tout au début de la colonisation des grains entre 3 et 7 jours après inoculation (entre 50 et 150°Cd). Cette production des DON est suivie d'une forte augmentation de la masse fongique de *F. graminearum* qui s'établit à 15 jours après inoculation (250°Cd). La production des DON semble ensuite moins importante par rapport à la masse fongique totale à partir 250°Cd, en revanche, la masse fongique reste constante jusqu'à 21 jours après inoculation (350°Cd). Ensuite, une seconde augmentation de la masse fongique a lieu entre 350°Cd et 450°Cd, cette augmentation n'est pas accompagnée d'une synthèse de DON. La dynamique d'apparition des symptômes, la croissance du champignon, et la production de DON dans les tissus du grain de blé tendre sont contrôlées par des événements moléculaires dont la majorité est précitée dans les parties précédentes. La compilation de nos résultats et des

données récentes amène plusieurs questions sur les différentes étapes de la colonisation d'un épi de blé tendre et sur la nature de l'interaction entre le champignon *Fg* et les grains d'un blé tendre sensible. Des résultats précédents ont montré que le stade de floraison (sortie des anthères) des épis est le moment propice pour le champignon pour infecter les épis de blé. En effet, pour réussir nos expérimentations au laboratoire, nous procédons toujours à l'inoculation des épis quand 50 % des anthères sont sorties (mi- anthèse). Au printemps quand les épis fleurissent, l'inoculum primaire présent dans les débris végétaux infecte les épis. Une des hypothèses expliquant la sensibilité du stade de floraison au FHB est la production par les anthères de molécules attractives telles que la bétaïne et la choline (stimulants) permettant aux spores de *F. graminearum* d'adhérer aux anthères (Nkongolo et al., 1993). La spore de *Fg* germe, produit des hyphes qui vont coloniser les différents organes (tissus) constituant l'épi de blé.

Brown et al., 2010 montrent que la colonisation d'un épi de blé tendre sensible se fait d'épillet en épillet et que pendant les étapes précoces de la colonisation de l'épi, le champignon *F. graminearum* présente une croissance d'abord verticale au sein du rachis et ensuite latérale dans les étapes tardives. La croissance latérale permet la colonisation des tissus formant les épillets dont les grains et les glumelles. Nos travaux permettent de proposer un modèle d'interaction entre le champignon *Fg* et un grain de blé tendre. Ainsi, nos résultats laissent penser qu'à l'arrivée sur le grain qui s'effectue entre 0 et 3 jours après l'inoculation à la mi-anthèse, le champignon produit de grosses quantités de mycotoxines (DON), cette forte synthèse des DON peut durer quelques jours (jusqu'à environ 7 JPI ou 150°Cd), ces DON permettent au champignon de s'installer sur le grain et d'initier sa colonisation. En effet, au début de la colonisation du grain par le champignon *Fg* (entre 50 et 150°Cd), les spores de *Fg* germent et le champignon développe les structures d'interactions et les premiers hyphes invasifs. Même si le grain de blé, pendant cette phase est en formation, et que la phase de remplissage n'est pas encore commencée (grains pauvres en éléments nutritifs comme les sucres et les acides aminés), les changements métaboliques induits chez la plante comme l'augmentation du métabolisme énergétique (source d'ATP) permettent au champignon de se développer. Une forte synthèse des DON pendant cette phase participe à l'installation du champignon et à l'initiation de la colonisation du grain. La deuxième phase de croissance qui débute après la synthèse des DON (entre 250°Cd et 450°Cd) correspond à la phase de remplissage du grain est très riche en réserves (amidon et en protéines de réserve). Pendant cette phase, le mycélium se développe au dépend de l'amidon et des acides aminés stockés au

fur et à mesure dans le grain sans pour autant arrêter son développement ou induire la mort de ses tissus. De plus, durant cette phase, nous avons observé une induction de certains régulateurs négatifs de la mort cellulaire et une répression d'un gène pro-apoptotique. Bien que toutes les observations nécessaires pour remettre en cause le mode de vie du champignon ne sont pas présentes, les quelques éléments identifiés dans notre étude pourraient suggérer que le dépérissement observé sur les grains fusariés est essentiellement dû au prélèvement de métabolites (sucres et acides aminés) par le champignon *Fg* qui se comporte plus comme un biotrophe qu'un nécrotrophe d'autant plus que la comparaison des profils protéiques entre les grains sains et fusariés a montré que l'infection par le champignon *Fg* n'induit pas des changements drastiques au niveau des profils protéiques comme ceux observés lors de la destruction des cellules de la plante hôte par les enzymes excrétées par un champignon nécroptrophe ou hémibiotrophe.

2- PERSPECTIVES

Les deux limites de notre étude concernent deux points majeurs, le premier réside dans le fait d'utiliser un seul fond génétique sensible (Récital) et une seule souche de *Fusarium graminearum* (*Fg1*) pour répondre aux différentes questions posées dans le cadre de ce travail. La deuxième limite est liée au manque d'informations sur les étapes précoces impliquées dans la colonisation du grain par le champignon *Fg* (24-48h après-inoculation). Des études préliminaires obtenues dans notre laboratoire ont montré que les spores de *Fg* germent pendant les premières 48 heures après inoculation. Les limites de ce travail nous permettent d'avoir ces différentes perspectives :

a) **Généralisation des principaux résultats obtenus en testant la réponse d'autres variétés de blé présentant des niveaux de sensibilité variés, en utilisant des souches de *Fusarium* présentant des virulences différentes et/ou de chémotypes différents**. Cette analyse nous permettra de confirmer le lien de la réponse de la plante au FHB avec le développement du grain, les processus impactés pas le FHB et l'expression des facteurs de sensibilité impliqués dans le développement de la maladie.

b) **Analyse des étapes précoces de l'interaction, caractérisation des réponses précoces de la plante, et identification des effecteurs fongiques mis en jeu**. Les différents processus du grain de blé impactés par le FHB pourraient être le résultat direct d'une régulation épigénétique ou post traductionnelle (MPT). En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'implication des modifications épigénétiques (modification des histones (Zhou et al., 2005), de l'ADN (Matzke et al., 2009)) et MPT (Phosphorylation

et déphosphorylation (Chung et al., 2014), ubiquitination) dans la régulation de la réponse de la plante aux agents pathogènes. Pour comprendre quels sont les mécanismes moléculaires de signalisation conduisant aux différents changements métaboliques observés dans notre étude (impact sur la synthèse de l'amidon et les protéines de réserve, les changements au niveau de la glycolyse et du cycle de Krebs, manipulation de la mort cellulaire). Nous pourrons explorer les évènements de signalisation impliqués dans le FHB chez le blé tendre. L'étude de phosphoprotéome pourrait nous aider à retracer les différents évènements de signalisation à partir des premières interactions entre la plante et le champignon jusqu'aux changements métaboliques observés chez la plante.

Pour mieux comprendre le processus infectieux de *F. graminearum*, il serait nécessaire de compléter cette étude sur les facteurs de sensibilité du blé au *Fusarium* par une étude des effecteurs sécrétés spécifiquement lors de l'infection. Plusieurs études ont été réalisées pour caractériser le sécrétome infectieux de l'agent pathogène (Yang et al., 2012 ; Rampitsch et al., 2013). Une étude plus fonctionnelle de ces effecteurs pourrait permettre d'identifier des effecteurs qui vont cibler un ou plusieurs facteurs de sensibilité caractérisés dans notre étude. Des travaux sur l'analyse fonctionnelle d'effecteurs putatifs de *F. graminearum* ont été initiés dans notre laboratoire (Projet FSOV Weab).

2-1- Quels gènes candidats pour une validation fonctionnelle ?

Une des stratégies permettant l'identification des gènes de sensibilité (criblage de collection de mutants), repose sur l'étude fine des mécanismes et processus biologiques impactés par l'infection chez une variété/génotype sensible. Outre une certaine difficulté à les identifier, plusieurs facteurs ont limité, à ce jour, l'utilisation des gènes de sensibilité en tant que source potentielle de gènes de résistance. Un des principaux étant qu'un « bon » gène de sensibilité, c'est-à-dire un gène dont la mutation affecte significativement le développement de l'agent pathogène, est le plus souvent un gène dont la fonction est essentielle à un processus biologique majeur. Ainsi, toute manipulation de ce type de gènes, tout en contribuant à stopper ou à limiter le développement de l'agent pathogène, pourrait également affecter significativement la fitness de la plante. Ceci est particulièrement vrai dans l'exemple de la fusariose de l'épi, maladie intimement associée au développement du grain. La manipulation de l'hôte implique souvent un ou plusieurs facteurs de sensibilité (molécules de l'hôte détournées par l'agent pathogène à son profit). Ces facteurs de sensibilité peuvent correspondre à un gène ou à un ensemble de

gènes exprimés par la plante et qui participent positivement au développement de l'agent pathogène. Ces facteurs peuvent être exprimés dans les étapes précoces de l'interaction entre l'agent pathogène et la plante hôte, alors que d'autres peuvent être exprimés pendant la phase de croissance de l'agent pathogène ou à la fin du cycle infectieux. Il serait donc intéressant quand on cherche à identifier des facteurs de sensibilité de réaliser une cinétique d'infection qui permettra de couvrir les principales étapes du cycle infectieux de l'agent pathogène, mais également de la plante hôte (van Schie and Takken, 2014). En comparant nos résultats avec ceux publiés précédemment, nous constatons que plusieurs gènes identifiés dans notre étude sont déjà décrits comme des gènes de sensibilité dans d'autres interactions hôte-agent pathogène. Ainsi, le gène codant la protéine Alcool déshydrogénase 1 (*Adh1*) chez l'orge a été décrite comme un gène contribuant positivement à l'installation du champignon *Blumeria graminis* (Pathuri et al., 2011). La surexpression de ce gène chez l'orge augmente la vitesse de pénétration de l'agent pathogène alors que sa sous expression la diminue. L'inactivation de l'activité enzymatique de cette enzyme par la molécule pyrazole induit également un retard dans l'apparition des symptômes confirmant donc le rôle de ce gène dans le développement de la maladie. Un unigène codant la protéine Adh1 a été identifié dans notre étude. Ce gène appartient au groupe des gènes présentant un effet de l'interaction entre le développement du grain et l'infection par le *F. graminearum*. Il est induit à partir de 250°Cd (15 JPI). À partir de ce résultat, nous pouvons émettre la même hypothèse que Pathuri et al. 2011 qui consiste à dire que l'agent pathogène essaie de maintenir l'état biotrophe de l'interaction entre la plante hôte et le champignon *Fg* en maintenant l'activation de la glycolyse au cours de l'infection. Le deuxième gène qui a été décrit comme gène de sensibilité aux maladies concerne le gène codant la protéine Mlo (Várallyay et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs ont montré la possibilité d'induire une résistance à large spectre contre le mildiou en sous exprimant l'orthologue du gène *Mlo* de l'orge chez le blé par la technique du VIGS. Ils ont pu mettre en évidence une forte corrélation entre la résistance du blé à la maladie et l'accumulation des siRNA. Dans notre analyse, deux unigènes correspondant au gène *mlo* ont été identifiés. Un unigène est impliqué dans la réponse à l'inoculation et l'autre est impliqué à la fois dans le développement du grain et dans la réponse à l'infection par l'agent pathogène. L'obtention, chez le blé tendre, d'une lignée mutante délétée des trois homéologues du gène *mlo*, lignée mutante construite à l'aide de la technique CRISPR, a permis de confirmer des résultats antérieurs obtenus par VIGS (Várallyay et al., 2012) : la mutation de ces trois homéologues confère une résistance des plantes à l'oïdium (Wang et al., 2014). L'autre gène clef essentiel à l'installation d'un agent pathogène concerne l'Indole-3-acetic acid (IAA)-Asp. En effet,

l'expression de ce gène, qui conduit à une accumulation des formes conjuguées IAA-Asp chez *A. thaliana,* favorise l'installation de *Botrytis cinerea* sur feuilles (González-Lamothe et al., 2012). L'unigène de blé correspondant et identifier dans notre étude est impliqué dans le développement du grain et dans la réponse à l'infection. Ce résultat suggère que l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme hormonal (Capron et al., 2012) peuvent favoriser l'installation de *F. graminearum* sur le grain.

L'analyse fonctionnelle de gènes candidats chez le blé tendre devrait être facilitée par l'existence d'outils performants : criblage de collection de mutants (forward et reverse) (Ma et al., 2006), transgénèse par biolistique (Plateforme de validation fonctionnelle de l'UMR GDEC), inactivation par VIGS (Padmanabhan and Dinesh-Kumar, 2009), techniques efficaces de Gene Editing permettant d'inactiver « facilement » les six copies d'un gène candidat portées par les trois sous-génomes A, B et D (Wang et al., 2014). L'ensemble de nos résultats permet une meilleure compréhension de la réponse d'un grain de blé tendre sensible à la fusariose de l'épi à travers les différents changements de l'expression des gènes induits ou réprimés par une infection par le champignon *F. gramineraum*. Ils permettent également de mieux caractériser la sensibilité du blé tendre au FHB. De plus, ces travaux apportent des éléments de discussion nouveaux et impliquent de nouvelles questions de recherche concernant le lien entre la réponse du FHB avec le développement du grain, l'expression des facteurs de sensibilité au FHB, les processus biologiques du grain impactés par le FHB. Ce travail pourrait contribuer à l'amélioration de la résistance du blé tendre au FHB à travers l'exploitation des différents gènes et facteurs de sensibilité identifiés dans cette étude. On peut donc penser à explorer dans la diversité génétique des blés disponibles dans les différentes collections pour sélectionner les différentes formes alléliques de certains gènes candidats pouvant améliorer la résistance du blé au FHB.

Nous avons également montré au travers de ce travail que malgré la complexité du pathosystème blé/*F. graminearum,* cette interaction peut aujourd'hui être considérée comme un modèle original permettant d'aborder non seulement des aspects appliqués de la recherche chez le blé tendre (recherche des gènes de résistance), mais aussi des aspects fondamentaux liés à la compréhension de la biologie et de la physiologie de l'interaction entre une plante sensible ou résistante et un agent pathogène fongique producteur de mycotoxines.

Liste des références bibliographiques

Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., and Martin, G.B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103:**2851–2856.

Alexander, N.J., McCormick, S.P., Waalwijk, C., van der Lee, T., and Proctor, R.H. (2011). The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in Fusarium. Fungal Genet. Biol. **48:** 485–495.

de Almeida Engler, J., and Gheysen, G. (2013). Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? Mol. Plant-Microbe Interact. **26:** 17–24.

Al-Taweel, K., Fernando, W.G.D., and Brûlé-Babel, A.L. (2014). Transcriptome profiling of wheat differentially expressed genes exposed to different chemotypes of *Fusarium graminearum*. Theor. Appl. Genet. **127:** 1703–1718.

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.

Arseniuk, E., Foremska, E., Goral, T ., 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.

Asselbergh, B., Achuo, A.E., Höfte, M., and Van Gijsegem, F. (2008). Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. Mol. Plant Pathol. **9:** 11–24.

Audenaert, K., Broeck, R.V., Bekaert, B., Witte, F.D., Heremans, B., Messens, K., Höfte, M., and Haesaert, G. (2009). Fusarium head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. Eur. J. Plant Pathol. **125:** 445–458.

Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte, M., and Haesaert, G. (2014). Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of Fusarium to its environment. Toxins **6:** 1–19.

Bai, G., and Shaner, G. (1994). Scab of wheat: prospects for control. Plant Dis. **78:** 760-766

Bai, G., and Shaner, G. (2004). Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. Annu. Rev. Phytopathol. **42:** 135–161.

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.

Bari, R., and Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Mol. Biol. **69:** 473–488.

Bézier, A., Lambert, B., and Baillieul, F. (2002). Cloning of a grapevine Botrytis-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related hsr203J. J. Exp. Bot. **53:** 2279–2280.

Birch, P.R.J., Boevink, P.C., Gilroy, E.M., Hein, I., Pritchard, L., and Whisson, S.C. (2008). Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. Curr. Opin. Plant Biol. **11:** 373–379.

Block, A., Guo, M., Li, G., Elowsky, C., Clemente, T.E., and Alfano, J.R. (2010). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. Cell. Microbiol **12:** 318–330.

Boddu, J., Cho, S., Kruger, W.M., and Muehlbauer, G.J. (2006). Transcriptome analysis of the barley-*Fusarium graminearum* interaction. Mol. Plant-Microbe Interact. **19:** 407–417.

Bolton, M.D. (2009). Primary metabolism and plant defense fuel for the fire. Mol. Plant-Microbe Interact. **22:** 487–497.

Bolton, M.D., van Esse, H.P., Vossen, J.H., de Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J.E., van den Berg, G.C.M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., de Koster, C.G., et al. (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Mol. Microbiol. **69:** 119–136.

Bos, J.I.B., Kanneganti, T.-D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R.J., and Kamoun, S. (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. Plant J. Cell Mol. Biol. **48:** 165–176.

Bos, J.I.B., Armstrong, M.R., Gilroy, E.M., Boevink, P.C., Hein, I., Taylor, R.M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R.R., Harrower, B., et al. (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **107:** 9909–9914.

Bottalico, A., and Perrone, G. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Eur. J. Plant Pathol. **108:** 611–624.

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.

Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M.E., Huitema, E., van der Hoorn, R.A.L., et al. (2011). *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108:** 20832–20837.

Brown, N.A., Urban, M., van de Meene, A.M.L., and Hammond-Kosack, K.E. (2010). The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. Fungal Biol. **114:** 555–571.

Buerstmayr, H., Steiner, B., Hartl, L., Griesser, M., Angerer, N., Lengauer, D., Miedaner, T., Schneider, B., and Lemmens, M. (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.

Caillaud, M.-C., Piquerez, S.J.M., and Jones, J.D.G. (2012). Characterization of the membrane-associated HaRxL17 Hpa effector candidate. Plant Signal. Behav. **7:** 145–149.

Capron, D., Mouzeyar, S., Boulaflous, A., Girousse, C., Rustenholz, C., Laugier, C., Paux, E., and Bouzidi, M.F. (2012). Transcriptional profile analysis of E3 ligase and hormone-related genes expressed during wheat grain development. BMC Plant Biol. **12:** 35

Chandran, D., Inada, N., Hather, G., Kleindt, C.K., and Wildermuth, M.C. (2010). Laser microdissection of Arabidopsis cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators. Proc. Natl. Acad. Sci. **107:** 460–465.

Champeil, A., Doré, T., and Fourbet, J.F. (2004). Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. Plant Sci. **166:** 1389–1415.

Chen, L., Shiotani, K., Togashi, T., Miki, D., Aoyama, M., Wong, H.L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2010a). Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: expression, subcellular localization and role in disease resistance. Plant Cell Physiol. **51:** 585–595.

Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., et al. (2010b). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature **468:** 527–532.

Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., and Frommer, W.B. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. Science **335:** 207–211.

Chetouhi, C., Bonhomme, L., Lecomte, P., Cambon, F., Merlino, M., Biron, D.G.,and Langin, T. (2015). A proteomics survey on wheat susceptibility to Fusarium head blight during grain development. Eur J Plant Pathol. **141:** 407-418

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.

Chung, E.-H., El-Kasmi, F., He, Y., Loehr, A., and Dangl, J.L. (2014). A plant phosphoswitch platform repeatedly targeted by type III effector proteins regulates the output of both tiers of plant immune receptors. Cell Host Microbe. **16:** 484–494.

Ciuffetti, L.M., Manning, V.A., Pandelova, I., Betts, M.F., and Martinez, J.P. (2010). Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*–wheat interaction. New Phytol. **187:** 911–919.

Coleman, J., Blake-Kalff, M., and Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends Plant Sci. **2:** 144–151.

Cowger, C., and Arellano, C. (2013). *Fusarium graminearum* infection and deoxynivalenol concentrations during development of wheat spikes. Phytopathology **103:** 460–471.

van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cakir, C., Schornack, S., Sklenar, J., Jones, A.M.E., and Kamoun, S. (2012). The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* translocates the CRN8 kinase into host plant cells. PLoS Pathog. **8:** e1002875.

Deeken, R., Engelmann, J.C., Efetova, M., Czirjak, T., Müller, T., Kaiser, W.M., Tietz, O., Krischke, M., Mueller, M.J., Palme, K., et al. (2006). An integrated view of gene expression and solute profiles of Arabidopsis tumors: a genome-wide approach. Plant Cell. **18:** 3617–3634.

Deslandes, L., and Rivas, S. (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. Trends Plant Sci. **17:** 644–655.

Desmond, O.J., Manners, J.M., Stephens, A.E., Maclean, D.J., Schenk, P.M., Gardiner, D.M., Munn, A.L., and Kazan, K. (2008). The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. Mol. Plant Pathol. **9:** 435–445.

Diamond, M., Reape, T.J., Rocha, O., Doyle, S.M., Kacprzyk, J., Doohan, F.M., and McCabe, P.F. (2013). The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol can inhibit plant Apoptosis like programmed cell death. PLoS ONE. **8:** e69542.

Ding, B., Wang, J., Song, N., Li, M., Cheng, Q., Huang, G., Guo, Y., Fu, Y., Xie, C., Sun, Q., et al. (2014). TaWRKY68 responses to biotic stresses are revealed by the orthologous genes from major cereals. Genet. Mol. Biol. **37**: 73–80.

Ding, L., Xu, H., Yi, H., Yang, L., Kong, Z., Zhang, L., Xue, S., Jia, H., and 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:** e19008.

Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., et al. (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. Nature **478:** 395–398.

Dong, S., Yin, W., Kong, G., Yang, X., Qutob, D., Chen, Q., Kale, S.D., Sui, Y., Zhang, Z., Dou, D., et al. (2011). Phytophthora sojae avirulence effector Avr3b is a secreted NADH and ADP-ribose pyrophosphorylase that modulates plant immunity. PLoS Pathog **7:** e1002353.

Doohan, F.M., Brennan, J., and Cooke, B.M. (2003). Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals. Eur. J. Plant Pathol. **109:** 755–768.

Dornez, E., Croes, E., Gebruers, K., Carpentier, S., Swennen, R., Laukens, K., Witters, E., Urban, M., Delcour, J.A., and Courtin, C.M. (2010). 2-D DIGE reveals changes in wheat xylanase inhibitor protein families due to *Fusarium graminearum* DeltaTri5 infection and grain development. Proteomics **10:** 2303–2319.

Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. **42:** 185–209.

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.

Engström, P., Zambryski, P., Van Montagu, M., and Stachel, S. (1987). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone. J. Mol. Biol. **197:** 635–645.

Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. **9:** 275–296.

Fu, S., Lv, Z., Qi, B., Guo, X., Li, J., Liu, B., and Han, F. (2012). Molecular cytogenetic characterization of wheat-*Thinopyrum elongatum* addition, substitution and translocation lines with a novel source of resistance to wheat Fusarium Head Blight. J. Genet. Genomics. **39:** 103–110.

Gang, G., Miedaner, T., Schuhmacher, U., Schollenberger, M., and Geiger, H.H. (1998). Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. Phytopathology **88:** 879–884.

Gardiner, D.M., Kazan, K., and Manners, J.M. (2009). Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. Fungal Genet. Biol. **46:** 604–613.

Gervais, L., Dedryver, F., Morlais, J.-Y., Bodusseau, V., Negre, S., Bilous, M., Groos, C., and Trottet, M. (2003). Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat. Theor. Appl. Genet. Theort. **106:** 961–970.

Gillespie, M.E., Brandt, A.S., and Scofield, S.R. (2012). Ethylene-signaling is essential for basal resistance to Fusarium head blight in wheat. In 2012 National Fusarium Head Blight Forum, p. 135.

Glynn, N.C., Hare, M.C., Parry, D.W., and Edwards, S.G. (2005). Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties majus and nivale to species status. Mycol. Res. **109:** 872–880.

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.

González-Lamothe, R., Oirdi, M. El, Brisson, N., and Bouarab, K. (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. Plant Cell **24:** 762–777.

Gopalan, S., Bauer, D.W., Alfano, J.R., Loniello, A.O., He, S.Y., and Collmer, A. (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. Plant Cell **8:** 1095–1105.

Gratz, S.W., Richardson, A.J., Duncan, G., and Holtrop, G. (2014). Annual variation of dietary deoxynivalenol exposure during years of different Fusarium prevalence: a pilot biomonitoring study. Food Addit. Contam. Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. **31:** 1579–1585.

Guenther, J.C., and Trail, F. (2005). The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. Mycologia **97:** 229–237.

Guenther, J.C., Hallen-Adams, H.E., Bücking, H., Shachar-Hill, Y., and Trail, F. (2009). Triacylglyceride metabolism by *Fusarium graminearum* during colonization and sexual development on wheat. Mol. Plant-Microbe Interact. **22:** 1492–1503.

Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., Duggavathi, R., Fox, S., and Somers, D.J. (2012). Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. PloS One **7:** e40695.

Hayes, M.A., Feechan, A., and Dry, I.B. (2010). Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. Plant Physiol. **153:** 211–221.

Hoefle, C., and Hückelhoven, R. (2008). Enemy at the gates: traffic at the plant cell pathogen interface. Cell. Microbiol. **10:** 2400–2407.

Hohn, T.M., and Beremand, P.D. (1989). Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. Gene **79:** 131–138.

Holzapfel, J., Voss, H.-H., Miedaner, T., Korzun, V., Häberle, J., Schweizer, G., Mohler, V., Zimmermann, G., and Hartl, L. (2008). Inheritance of resistance to Fusarium head blight in three European winter wheat populations. Theor. Appl. Genet. **117:** 1119–1128.

Van der Hoorn, R.A.L., De Wit, P.J.G.M., and Joosten, M.H.A.J. (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. Trends Plant Sci. **7:** 67–71.

Hou, W., Mu, J., Li, A., Wang, H., and Kong, L. (2014). Identification of a wheat polygalacturonase-inhibiting protein involved in Fusarium head blight resistance. Eur. J. Plant Pathol. **141:** 731–745.

Humphry, M., Reinstädler, A., Ivanov, S., Bisseling, T., and Panstruga, R. (2011). Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea er1 plants is conferred by natural loss-of-function mutations in PsMLO1. Mol. Plant Pathol. **12:** 866–878.

Ilgen, P., Hadeler, B., Maier, F.J., and Schäfer, W. (2009). Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. Mol. Plant-Microbe Interact. **22:** 899–908.

International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. Science **345:** 1251788.

Ioos, R., Belhadj, A., Menez, M., and Faure, A. (2005). The effects of fungicides on *Fusarium spp*. and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. Crop Prot. **24:** 894–902.

Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., and Maier, F.J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102:** 16892–16897.

Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L., and Greenberg, J.T. (2007). A J domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. Curr. Biol. **17**: 499–508.

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.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. Nature **444:** 323–329.

Jubault, M., Lariagon, C., Taconnat, L., Renou, J.-P., Gravot, A., Delourme, R., and Manzanares-Dauleux, M.J. (2013). Partial resistance to clubroot in Arabidopsis is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. Funct. Integr. Genomics **13:**191-205

van Kan, J.A., van den Ackerveken, G.F., and de Wit, P.J. (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. Mol. Plant-Microbe Interact. **4:** 52–59.

Kim, K.-C., Lai, Z., Fan, B., and Chen, Z. (2008). Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. Plant Cell **20:** 2357–2371.

Koch, K.E., Ying, Z., Wu, Y., and Avigne, W.T. (2000). Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. J. Exp. Bot. **51 Spec No**: 417–427.

Kong, L., Anderson, J.M., and Ohm, H.W. (2005). Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. **48:** 29–40.

Krŭstev, E., and Khristov, B. (1981). Distribution, species composition and toxicological characteristics of Fusarium fungi isolated from corn. Vet.-Meditsinski Nauki. **18:** 32–35.

Kugler, K.G., Siegwart, G., Nussbaumer, T., Ametz, C., Spannagl, M., Steiner, B., Lemmens, M., Mayer, K.F., Buerstmayr, H., and Schweiger, W. (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.

Kurtz, S., Narechania, A., Stein, J.C., and Ware, D. (2008). A new method to compute K-mer frequencies and its application to annotate large repetitive plant genomes. BMC Genomics **9:** 517.

Lapin, D., and Van den Ackerveken, G. (2013). Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. Trends Plant Sci. **18:** 546-54

Lee, A.H.-Y., Hurley, B., Felsensteiner, C., Yea, C., Ckurshumova, W., Bartetzko, V., Wang, P.W., Quach, V., Lewis, J.D., Liu, Y.C., et al. (2012). A bacterial acetyltransferase destroys plant microtubule networks and blocks secretion. PLoS Pathog **8:** e1002523.

Lee, T., Han, Y.-K., Kim, K.-H., Yun, S.-H., and Lee, Y.-W. (2002). Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. Appl. Environ. Microbiol. **68:** 2148–2154.

Lefèvre, T., Lebarbenchon, C., Gauthier-Clerc, M., Missé, D., Poulin, R., and Thomas, F. (2009). The ecological significance of manipulative parasites. Trends Ecol. Evol. **24:** 41–48.

Li, C.-Y., Li, W.-H., Lee, B., Laroche, A., Cao, L.-P., and Lu, Z.-X. (2011). Morphological characterization of triticale starch granules during endosperm development and seed germination. Can. J. Plant Sci. **91:** 57–67.

Liu, Z., Faris, J.D., Oliver, R.P., Tan, K.-C., Solomon, P.S., McDonald, M.C., McDonald, B.A., Nunez, A., Lu, S., Rasmussen, J.B., et al. (2009). SnTox3 acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the Snn3 Gene. PLoS Pathog. **5:** e1000581.

Liu, Z., Zhang, Z., Faris, J.D., Oliver, R.P., Syme, R., McDonald, M.C., McDonald, B.A., Solomon, P.S., Lu, S., Shelver, W.L., et al. (2012). The cysteine rich necrotrophic effector

SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring Snn1. PLoS Pathog **8:** e1002467.

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.

MacRobbie, E.A. (1998). Signal transduction and ion channels in guard cells. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **353:** 1475–1488.

Maier, F.J., Miedaner, T., Hadeler, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H., and Schäfer, W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. Mol. Plant Pathol. **7:** 449–461.

Maillet, F., Poinsot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., et al. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. Nature **469:** 58–63

Mardi, M., Pazouki, L., Delavar, H., Kazemi, M.B., Ghareyazie, B., Steiner, B., Nolz, R., Lemmens, M., and Buerstmayr, H. (2006). QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a "Frontana"-derived population. Plant Breed **125:** 313–317

Masci, S., Laino, P., Janni, M., Botticella, E., Di Carli, M., Benvenuto, E., Danieli, P.P., Lilley, K.S., Lafiandra, D., and D'Ovidio, R. (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.

Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., and Matzke, A.J. (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. Curr. Opin. Cell Biol. **21:** 367–376.

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.

Mesterházy, A. (1995). Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. Plant Breed. **114:** 377–386.

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.

Moretti, A., Panzarini, G., Somma, S., Campagna, C., Ravaglia, S., Logrieco, A.F., and Solfrizzo, M. (2014). Systemic growth of *F. graminearum* in wheat plants and related accumulation of deoxynivalenol. Toxins **6:** 1308–1324.

Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? J. Exp. Bot. **59:** 501–520.

Muhovski, Y., Batoko, H., and Jacquemin, J.-M. (2012). Identification, characterization and mapping of differentially expressed genes in a winter wheat cultivar (Centenaire) resistant to *Fusarium graminearum* infection. Mol. Biol. Rep. **39:** 9583–9600.

Nadaud, I., Girousse, C., Debiton, C., Chambon, C., Bouzidi, M.F., Martre, P., and Branlard, G. (2010). Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. Proteomics **10:** 2901–2910.

Navarre, D.A., and Wolpert, T.J. (1995). Inhibition of the glycine decarboxylase multienzyme complex by the host-selective toxin victorin. Plant Cell Online **7:** 463–471.

Nelson, P.E., Dignani, M.C., and Anaissie, E.J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. Clin. Microbiol. Rev. **7:** 479–504.

Nkongolo, K.K., Dostaler, D., and Couture, L. (1993). Effet de la bétaïne, de la choline et d'extraits d'anthères du blé sur la croissance du *Fusarium graminearum*. Can. J. Plant Pathol. **15:** 81–84.

Nomura, K., Melotto, M., and He, S.-Y. (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. Curr. Opin. Plant Biol. **8:** 361–368.

Oldroyd, G.E., Mitra, R.M., Wais, R.J., and Long, S.R. (2001). Evidence for structurally specific negative feedback in the Nod factor signal transduction pathway. Plant J. Cell Mol. Biol. **28:** 191–199.

Oliver, R. (2012). Genomic tillage and the harvest of fungal phytopathogens. New Phytol. **196:** 1015–1023.

Olsen, O.-A. (2001). Endosperm development: cellularization and cell fate specification. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **52:** 233–267.

Padmanabhan, M., and Dinesh-Kumar, S.P. (2009). Virus-induced gene silencing as a tool for delivery of dsRNA into plants cold spring harb. Protoc.**4:** 1-4

Park, C.-H., Chen, S., Shirsekar, G., Zhou, B., Khang, C.H., Songkumarn, P., Afzal, A.J., Ning, Y., Wang, R., Bellizzi, M., et al. (2012). The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. Plant Cell **24:** 4748–4762.

Parniske, M. (2008). *Arbuscular mycorrhiza*: the mother of plant root endosymbioses. Nat. Rev. Microbiol. **6:** 763–775.

Parry, D.W., Jenkinson, P., and McLEOD, L. (1995). Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. Plant Pathol. **44:** 207–238.

Pasquali, M., and Migheli, Q. (2014). Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing Fusaria. Int. J. Food Microbiol. **189:** 164–182.

Pasquet, J.-C., Chaouch, S., Macadré, C., Balzergue, S., Huguet, S., Martin-Magniette, M.-L., Bellvert, F., Deguercy, X., Thareau, V., Heintz, D., et al. (2014). Differential gene expression and metabolomic analyses of *Brachypodium distachyon* infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of *Fusarium graminearum*. BMC Genomics.**15:** 629

Pathuri, I.P., Reitberger, I.E., Hückelhoven, R., and Proels, R.K. (2011). Alcohol dehydrogenase 1 of barley modulates susceptibility to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f.sp. hordei. J. Exp. Bot. **62:** 3449–3457.

Patriarca, E.J., Tatè, R., Ferraioli, S., and Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. Int. Rev. Cytol. **234:** 201–262.

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. New Strateg. Plant Improv. **25:** 1–12.

Pedley, K.F., and Martin, G.B. (2005). Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. Curr. Opin. Plant Biol. **8:** 541–547.

Petre, B., and Kamoun, S. (2014). How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? PLoS Biol **12:** e1001801.

Pinton, P., and Oswald, I.P. (2014). Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. Toxins **6:** 1615–1643.

Pinton, P., Graziani, F., Pujol, A., Nicoletti, C., Paris, O., Ernouf, P., Di Pasquale, E., Perrier, J., Oswald, I.P., and Maresca, M. (2015). Deoxynivalenol inhibits the expression by goblet cells of intestinal mucins through a PKR and MAP kinase dependent repression of the resistin-like molecule β. Mol. Nutr. Food Res **59:** 1076–1087.

Poulin, R. (2011). The many roads to parasitism: a tale of convergence. Adv. Parasitol. **74:** 1–40.

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.

Rafiqi, M., Gan, P.H.P., Ravensdale, M., Lawrence, G.J., Ellis, J.G., Jones, D.A., Hardham, A.R., and Dodds, P.N. (2010). Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. Plant Cell **22:** 2017–2032.

Rampitsch, C., and Bykova, N.V. (2012). Proteomics and plant disease: advances in combating a major threat to the global food supply. Proteomics **12:** 673–690.

Rampitsch, C., Day, J., Subramaniam, R., and Walkowiak, S. (2013). Comparative secretome analysis of *Fusarium graminearum* and two of its non-pathogenic mutants upon deoxynivalenol induction in vitro. Proteomics **13:** 1913–1921.

Räsänen, L.A., and Lindström, K. (2003). Effects of biotic and abiotic constraints on the symbiosis between rhizobia and the tropical leguminous trees Acacia and Prosopis. Indian J. Exp. Biol. **41:** 1142–1159.

Rossi, V., Ravanetti, A., Pattori, E., and Giosuè, S. (2001). Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spike by some fungi causing Fusarium head blight. J. Plant Pathol. **83:** 189–198.

Saito, A., Nakazawa, N., and Suzuki, M. (2001). Selection of mutants resistant to *Alternaria blotch* from in vitro -cultured apple shoots irradiated with X- and γ-rays. J. Plant Physiol. **158:** 391–400.

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.

Schmolke, M., Zimmermann, G., Buerstmayr, H., Schweizer, G., Miedaner, T., Korzun, V., Ebmeyer, E., and Hartl, L. (2005). Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. Appl. Genet. Theor. **111:** 747–756.

Schürch, S., Linde, C.C., Knogge, W., Jackson, L.F., and McDonald, B.A. (2004). Molecular population genetic analysis differentiates two virulence mechanisms of the fungal avirulence gene NIP1. Mol. Plant-Microbe Interact. **17:** 1114–1125.

Schwarz, P.B., Jones, B.L., and Steffenson, B.J. (2002). Enzymes associated with Fusarium infection of barley. J. Am. Soc. Brew. Chem. **60:** 130–134.

Schweiger, W., Pasquet, J.-C., Nussbaumer, T., Paris, M.P.K., Wiesenberger, G., Macadré, C., Ametz, C., Berthiller, F., Lemmens, M., Saindrenan, P., et al. (2013). Functional characterization of two clusters of *Brachypodium distachyon* UDP-glycosyltransferases encoding putative deoxynivalenol detoxification genes. Mol. Plant-Microbe Interact. **26:** 781–792.

Seifi, H.S., Van Bockhaven, J., Angenon, G., and Höfte, M. (2013). Glutamate metabolism in plant disease and defense: friend or foe? Mol. Plant-Microbe Interact. **26:** 475–485.

Seong, K.-Y., Pasquali, M., Zhou, X., Song, J., Hilburn, K., McCormick, S., Dong, Y., Xu, J.-R., and Kistler, H.C. (2009). Global gene regulation by Fusarium transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis. Mol. Microbiol. **72:** 354–367.

Singh, R.P., Hodson, D.P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Bhavani, S., Njau, P., Herrera-Foessel, S., Singh, P.K., Singh, S., and Govindan, V. (2011). The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. Annu. Rev. Phytopathol. **49:** 465–481.

Soumpourou, E., Iakovidis, M., Chartrain, L., Lyall, V., and Thomas, C.M. (2007). The *Solanum pimpinellifolium* Cf-ECP1 and Cf-ECP4 genes for resistance to *Cladosporium fulvum*

are located at the Milky Way locus on the short arm of chromosome 1 Theor. Appl. Genet. **115:** 1127–1136.

Staats, M., van Baarlen, P., Schouten, A., van Kan, J.A.L., and Bakker, F.T. (2007). Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of Botrytis species. Fungal Genet. Biol. **44:** 52–63.

Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D., and Keen, N.T. (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. glycinea determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. **81:** 6024–6028.

Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., and Suza, W. (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to Indole-3-Acetic Acid. Plant Cell **17:** 616–627.

Strange, R.N., and Smith, H. (1971). A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. Physiol. Plant Pathol. **1:** 141–150.

Summerell, B.A., Salleh, B., and Leslie, J.F. (2003). A utilitarian approach to Fusarium identification. Plant Dis. **87:** 117–128.

Sutton, J.C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Can. J. Plant Pathol. **4:** 195–209.

Tan, M.-K., and Niessen, L.M. (2003). Analysis of rDNA ITS sequences to determine genetic relationships among, and provide a basis for simplified diagnosis of, Fusarium species causing crown rot and head blight of cereals. Mycol. Res. **107:** 811–821.

Tanaka, A., and Tsuge, T. (2000). Structural and functional complexity of the genomic region controlling AK-toxin biosynthesis and pathogenicity in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. Mol. Plant-Microbe Interact. **13:** 975–986.

Trail, F. (2009). For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. Plant Physiol. **149:** 103–110.

Trail, F., Xu, H., Loranger, R., and Gadoury, D. (2002). Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). Mycologia **94:** 181–189.

Várallyay, É., Giczey, G., and Burgyán, J. (2012). Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. Arch. Virol. **157:** 1345–1350.

Vincent, J., Dai, Z., Ravel, C., Choulet, F., Mouzeyar, S., Bouzidi, M.F., Agier, M., and Martre, P. (2013). dbWFA: a web-based database for functional annotation of *Triticum aestivum* transcripts. Database J. Biol.

Vleeshouwers, V.G.A.A., and Oliver, R.P. (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. Mol. Plant-Microbe Interact. **27:** 196–206.

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.

Walter, S., Kahla, A., Arunachalam, C., Perochon, A., Khan, M.R., Scofield, S.R., and Doohan, F.M. (2015). A wheat ABC transporter contributes to both grain formation and mycotoxin tolerance. J. Exp. Bot. **66:** 2583:2593

Walton, J.D. (2006). HC-toxin. Phytochemistry **67:** 1406–1413.

Wang, E., Schornack, S., Marsh, J.F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S., and Oldroyd, G.E.D. (2012). A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. Curr. Biol. **22:** 2242–2246.

Wang, F., Lin, R., Feng, J., Chen, W., Qiu, D., and Xu, S. (2015). TaNAC1 acts as a negative regulator of stripe rust resistance in wheat, enhances susceptibility to *Pseudomonas syringae*, and promotes lateral root development in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Front. Plant Sci. **6:** 108.

Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., and Qiu, J.-L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nat. Biotechnol. **32:** 947–951.

Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., and Humphery-Smith, I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis **16:** 1090–1094.

Wegulo, S.N. (2012). Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. Toxins **4:** 1157–1180.

Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., et al. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. Nature **450:** 115–118.

Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., Saunders, D.G.O., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S.A., et al. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **77:** 235–247.

Wolpert, T.J., Dunkle, L.D., and Ciuffetti, L.M. (2002). Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a Name?. Annu. Rev. Phytopathol. **40:** 251–285.

Xu, X.-M., Parry, D.W., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Edwards, S.G., Cooke, B.M., Doohan, F.M., Brennan, J.M., Moretti, A., et al. (2005). Predominance and association of pathogenic fungi causing Fusarium ear blightin wheat in four European countries. Eur. J. Plant Pathol. **112:** 143–154.

Xu, X., and Nicholson, P. (2009). Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. Annu. Rev. Phytopathol. **47:** 83–103.

Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., and Shirasu, K. (2011). Phosphatidylinositol monophosphate binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108:** 14682–14687.

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.

Yang, F., Jacobsen, S., Jørgensen, H.J.L., Collinge, D.B., Svensson, B., and Finnie, C. (2013). *Fusarium graminearum* and its interactions with cereal heads: Studies in the proteomics era. Front. Plant Sci. **4:** 37.

Yoo, S.-D., Cho, Y., and Sheen, J. (2009). Emerging connections in the ethylene signaling network. Trends Plant Sci. **14:** 270–279.

Yu, J.-B., Bai, G.-H., Cai, S.-B., Dong, Y.-H., and Ban, T. New Fusarium Head Blight-resistant sources from Asian wheat germplasm. Crop Sci. **48:** 1090–1097.

Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., et al. (2007a). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. Cell Host Microbe. **1:** 175–185.

Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P.E., Wang, M., Zhu, Y., and He, Z. (2007b). Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during Arabidopsis-*Pseudomonas syringae* interaction. Plant Physiol. **145:** 450–464.

Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B., and Wu, K. (2005). Histone deacetylase 19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis. Plant Cell Online **17:** 1196–1204.

Autres références

Ouvrages, thèses et communications orales

Marc-andré Selosse, La Symbiose : Structures et fonctions, rôle écologique et évolutif, Vuibert, Vuibert Sup Biologie Écologie, 2000, 160p

Thèse Gunnaiah Raghavendra, Functional characterization of wheat, fusarium head blight resistance (QTL) «Fhb1» based on non-target metabolomics and proteomics, Univesrité de McGill, soutenue en 2013

Renato D'Ovidio (2012). Proteomic analysis of mature wheat kernels of transgenic bread wheat expressing PGIP infected *Fusarium graminearum*, 11th International Gluten Workshop, Beijing, China

Sites internet :

http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E

http://www.unctad.info/fr/Infocomm/Produits-Agricoles/Ble/Culture/Stades-de-developpement/

http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/_plugins/WMS_BO_Gallery/page/getElementStream.jspz?id=23171&prop=file.

http://www.gard.chambagri.fr/fileadmin/Pub/CA30/Internet_CA30/Documents_Internet_CA30/Grandes_Cultures/choisir1_provence_languedoc_2013_integral.pdf

http://www.bayer-agri.fr/protection-cultures/septoriose-du-ble-tendre/
http://www.bayer-agri.fr/protection-cultures/fonte-des-semis-a-fusariose-sur-cereales/
http://www.bayer-agri.fr/articles/1496/maladies-du-ble-les-periodes-a-risques/
http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/_plugins/WMS_BO_Gallery/page/getElementStream.jspz?id=23224&prop=file

Communications orales

&

Communications par affiches

Communications orales

● **Chetouhi C,** Bonhomme L, Lecomte P, Biron GD and Langin T (2013) Identification of susceptibility factors to FHB? ***10th International Congress of plant pathology***, Beijing, China

● **Chetouhi C,** Bonhomme L, Lecomte P, Biron GD and Langin T (2013) Deciphering of crosstalk involved in the parasite manipulation of wheat by pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. ***12 th European Fusarium Seminar***, Bordeaux, France

● **Chetouhi C,** Bonhomme L, Lecomte P Cambon F, Biron GD and Langin T. Caractérisation du dialogue moléculaire entre le blé tendre et le champignon phytopathogène *Fusarium graminearum*, ***Les Journées Jeunes Chercheurs du département BAP de l'INRA***, 11-12 April 2013, Clermont Ferrand, France

● **Chetouhi C,** Bonhomme L, Lecomte P Cambon F, Biron GD and Langin T. Analyse du dialogue moléculaire entre le blé tendre et le champignon pathogène *Fusarium graminearum*, **Les *Journées Jeunes Chercheurs du département SPE de l'INRA***, 20-23 Jun 2012, Toulouse, France

● **Chetouhi C,** Badaoui S, Lecomte P, Biron GD and Langin T. *Fusarium graminearum*, un champignon manipulateur ? 12-16 May 2011, ***Ecole doctorale de l'Université Blaise Pascal***, Clermont-Ferrand, France

● **Chetouhi C,** Cambon F, Biron GD and Langin T (2011) *Fusarium graminearum*, un agent pathogène manipulateur ? ***Les Journées Jean-Chevaugeon (JJC). Société Française de la Phytopathologie (SFP)***, Aussois, France

Communications par affiches

● **Chetouhi C**, Bonhomme L, Lasserre-Zuber P, Lecomte P, Cambon F, Soudière O, Biron GD and Langin T (2015). Dynamics of wheat gene and protein expression during the susceptible response to Fusarium Head Blight, ***28th Fungal Genetics Conference***, Asilomar, USA

● **Chetouhi C**, Bonhomme L, **,** Lecomte P, Cambon F, Soudière O, Biron GD and Langin T (July 2014). Deciphering wheat susceptibility factors to *Fusarium* Head Blight, ***XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions***, Rhodes, Greece

● **Chetouhi C,** Bonhomme L, Lecomte P, Saintenac C, Biron GD and Langin T (2013) The pathogen *Fusarium graminearum* manipulates wheat biochemical pathways to favor its development. ***Plant Diseases and Resistance Mechanisms***, 20-22 Februray 2013, Vienna, Austria

● Lecomte P, Hajj Assaf C, Da Rocha M, **Chetouhi C,** Soudière O, Danchin E, Bonhomme L and Langin T (2013), Isolation of candidates effectors secreted by the fungal pathogen *Fusarium graminearum* in the early stages of FHB disease on wheat, ***effectome meeting 7***, Lauret, France

● Lecomte P, Hajj Assaf C, Da Rocha M, **Chetouhi C,** Danchin E, Bonhomme L and

Langin T (2011) Identification of effectors secreted by the fungal pathogen *Fusarium graminearum*, main causal agent on FHB wheat, ***effectome meeting 5***, Lauret, France

Annexes

Annexe1:

Supporting information of research article 1: "A proteomics survey on wheat susceptibility to *Fusarium* head blight during grain development"



Fig. 1S Observed symptoms during susceptibility responses to *Fusarium graminearum* at 14 days after inoculation.
Pictures depict control **(a)** and *Fg* inoculated **(b)** ears, as well as control **(c)** and *Fg* infected **(d)** grains.

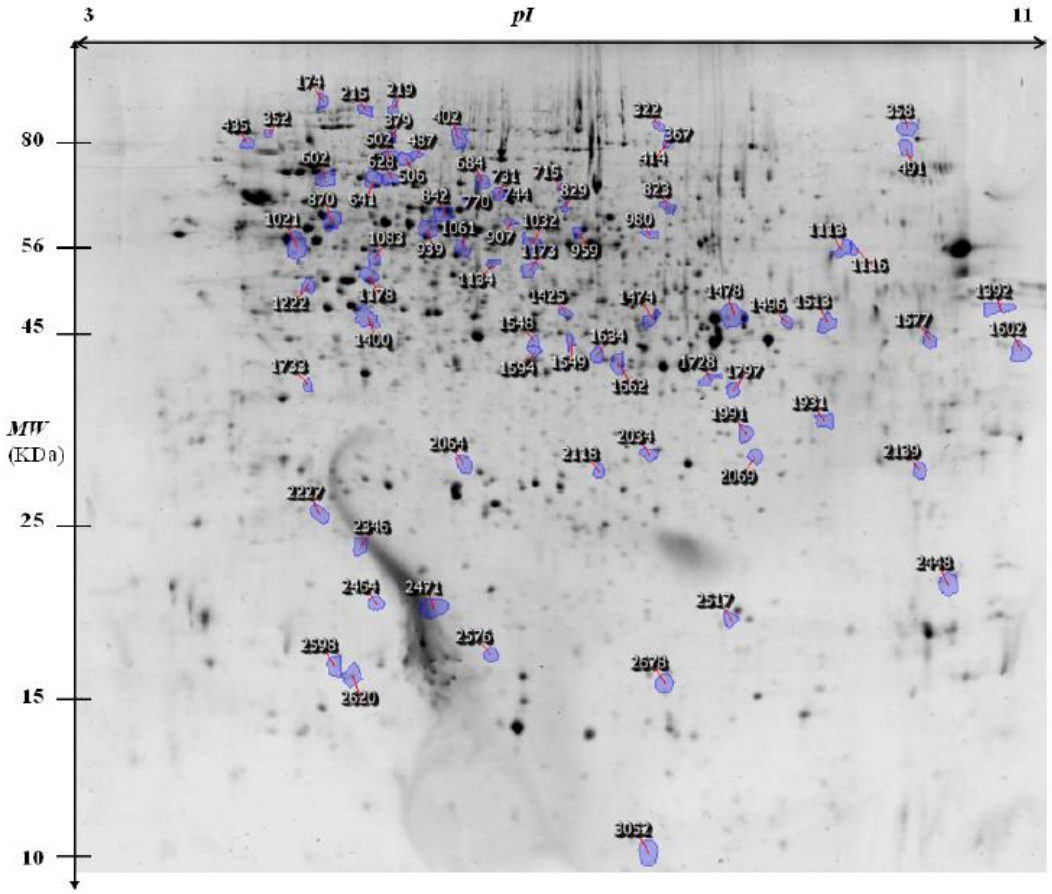

Fig. 2S Reference proteome map depicting all differentially regulated protein spots at the three time points of *Fusarium graminearum* infection in wheat grains (3, 7, 14 days after inoculation; 3, 7 and 14 dai).

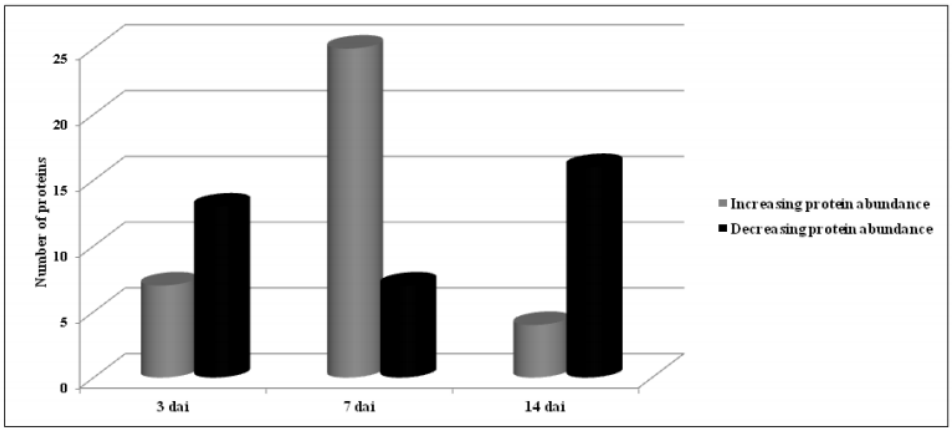

Fig. 3S Number of protein spots showing an increasing or decreasing abundance at three time points of *Fusarium graminearum* infection (3, 7 and 14 days after inoculation ; 3, 7 and 14 dai).

Supplementary Table 1S : Primers used for *F. graminearum* biomass quantification (*Fg* IGS primers) and for *Fg* Tri5 relative gene expression (*Fg* TRI5 primers) and normalization primers (*Ta* RLI and *Ta* 18S).

Gene name	**Forward primer (5'-3')**
***Fg* TRI5**	ATGACTACCCTCAATTCCTTCGT
***Fg* IGS**	GTTGATGGGTAAAAGTGTG
***Ta* 18S**	CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT
***Ta* RLI**	TTGAGCAACTCATGGACCAG
Gene name	**Reverse primer (5'-3')**
***Fg* TRI5**	GAACTTCTTGGCGTCCTCTG
***Fg* IGS**	CTCTCATATACCCTCCG
***Ta* 18S**	CCTGTCGGCCAAGGCTATATAC
***Ta* RLI**	GCTTTCCAAGGCACAAACAT

Fg : *Fusarium graminearum*
Ta : *Triticum aestivum*
TRI5 : Trichodiene synthase 5
RLI : Rnase L inhibitor protein
IGS : non-transcribed DNA termed intergenic spacer

Supplementary Table 2S : Identification of proteins showing significant changes in their abundance as a consequence of *Fg* inoculation.

Spot Id	Protein description Protein name	pI ex	MWex	MWth	Log$_2$ Ratio (±SD) 3 dai	 7 dai	 14 dai	Sub-cellular localization	Accession number
174	Pyruvate,orthophosphate dikinase	5,05	nd	103,70	-1,17(±0,01)	NS	NS	P	Bradi2g25745.1
215	plastid alpha-1,4-glucan phosphorylase (Pho1)	5,16	92,94	108,10	0,97(±0,07)	NS	NS	P	B2LXU4
219	plastid alpha-1,4-glucan phosphorylase (Pho1)	5,24	92,92	108,10	0,98(±0,07)	NS	NS	P	B2LXU4
322	Glutaminyl-tRNA synthetase	6,99	92,00	89,80	-1,26(±0,09)	NS	NS	Cyto	Bradi2g05460.1
358	HMW-glutenin By subunit	7,15	87,00	77,30	NS	-0,95(±0,07)	NS	ER	Q6UJY7
367	methionine-tRNA ligase activity, ATP binding	6,94	85,93	89,60	NS	NS	0,66(±0,007)	Cyto	Bradi1g69880.1
402	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	5,40	82,00	55,10	NS	0,61(±0,05)	NS	M	P12862
487	Starch synthase 1, chloroplastic amyloplastic	5,29	76,66	70,90	NS	NS	-1,01(±0,01)	P	Q43654
502	Transketolase, thiamine diphosphate binding domain	5,22	74,89	79,40	NS	NS	-0,6(±0,01)	Cyto	Bradi1g51670.1
506	Transketolase, thiamine diphosphate binding domain	5,27	74,49	79,40	NS	NS	-0,61(±0,07)	Cyto	Bradi1g51670.1
684	Phosphoglucomutase	5,45	60,66	62,70	NS	NS	-1,58(±0,02)	Cyto	Q8VX48
715	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	6,24	57,10	55,20	NS	0,86(±0,0001)	NS	P	P12112
731	Succinate-CoA ligase activity	5,50	59,25	67,80	NS	NS	-0,713(±0,05)	M	Bradi1g07020.1
770	Methylenetetrahydrofolate reductase	5,41	63,75	64,70	NS	0,91(±0,001)	NS	Cyto	A6XMY8
823	glutathione-disulfide reductase activity	6,96	62,38	52,60	NS	-0,59(±0,05)	NS	P	Q6UQ06
829	Acetohydroxyacid synthase	6,18	62,25	64,50	NS	0,91(±0,07)	NS	Cyto	Q84U05
842	ketol-acid reductoisomerase activity	5,35	61,88	62,70	NS	NS	-1,2(±0,16)	P	Bradi2g15790.1
870	Pyruvate,orthophosphate dikinase	5,07	61,00	56,50	-0,4(±0,0001)	NS	NS	Extr	Bradi2g25745.1
959	Cytosolic glutathione reductase	6,45	58,63	52,90	NS	NS	-0,62(±0,07)	Cyto	Q6UQ06
980	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	6,90	58,00	57,60	NS	NS	-0,92(±0,04)	P	Q7XJA9
1032	glutathione-disulfide reductase activity	5,60	56,75	59,40	NS	0,9(±0,0)	NS	M	Q6UQ06
1061	Phosphoglycerate kinase, cytosolic	5,40	55,75	42,00	NS	NS	-0,81(±0,03)	Cyto	P12783
1134	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	5,48	53,75	57,70	NS	0,63(±0,001)	NS	P	P12299
1392	Low molecular weight glutenin subunit	-	48,81	41,00	NS	-0,86(±0,01)	NS	ER	B2Y2Q1
1400	Glutamine synthetase	5,15	45,63	38,50	NS	NS	-0,8(±0,02)	Cyto	Q6RUJ1
1425	Aspartate aminotransferase/Glutamic oxaloacetic transaminase AAT1/GOT2	6,16	44,94	47,60	-0,8(±0,15)	NS	NS	M	Bradi3g09050.3
1474	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7,22	45,88	36,40	NS	0,54(±0,05)	NS	Cyto	C7C4X1
1478	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6,87	43,38	36,40	NS	0,82(±0,03)	NS	Cyto	C7C4X1
1496	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase	7,03	42,63	38,80	-0,74(±0,03)	NS	NS	Go	Bradi1g66440.1
1548	Malate dehydrogenase	5,61	40,88	35,40	NS	0,98(±0,13)	NS	M	A3KLL4
1549	Aestivum stearoyl-ACP desaturase	6,32	40,88	44,30	NS	0,61(±0,06)	NS	P	E9N9R5
1577	High-molecular-weight glutenin subunit	7,17	39,88	69,60	NS	NS	-0,56(±0,08)	ER	A9ZMG8
1594	Fructose-bisphosphate aldolase	5,60	39,38	38,70	-0,86(±0,06)	NS	NS	Cyto	C1J959
1602	LMW-GS	7,25	39,00	34,50	NS	NS	-0,7(±0,07)	ER	H6VLQ4
1662	NAD-dependent malate dehydrogenase	5,79	38,12	35,30	-0,86(±0,03)	NS	NS	M	Bradi2g15740.1
1728	Polypeptide: ORF	6,95	36,42	31,90	NS	-0,89(±0,04)	NS	uncharacterized	Bradi5g12080.1
1733	S-malonyltransferase	5,01	36,33	40,30	0,72(±0,06)	NS	NS	M	Bradi1g65140.2
1931	Globulin 1 OS	7,07	32,55	24,50	NS	-0,89(±0,08)	NS	ER	Q0Q5D4
1991	SUGAR-1-PHOSPHATE GUANYL TRANSFERASE	6,98	31,47	29,50	NS	0,43(±0,06)	NS	Cyto	Bradi1g19770.1
2034	SUGAR-1-PHOSPHATE GUANYL TRANSFERASE	6,90	30,63	26,20	NS	-1(±0,02)	NS	Cyto	Bradi1g19770.1
2064	oxidoreductase activity/NAD or NADH binding	5,41	29,79	30,60	NS	0,67(±0,03)	NS	M	Bradi2g20370.1
2227	Aci-reductone-dioxygenase-like protein	5,03	26,36	23,40	NS	0,65(±0,08)	NS	Nucl	C4PK50
2346	lactoylglutathione lyase/metal ion binding	5,13	23,48	26,10	0,8(±0,09)	NS	NS	Cyto	Bradi5g03830.1
2448	Triticin	7,19	20,44	64,80	0,61(±0,01)	NS	NS	ER	B2CGM6
744	Vesicle trafficking protein Sly1 (Sec1 family)	5,54	61,45	67,30	NS	0,79(±0,18)	NS	Cyto	Bradi5g24240.1
1083	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism	5,19	55,25	46,80	NS	0,89(±0,01)	NS	ER	Bradi1g34170
2069	Voltage dependent anion channel (VDAC)	6,99	29,73	29,80	NS	0,61(±0,01)	NS	M	Q41591
2139	Clathrin adaptor complex	7,16	28,32	57,30	NS	NS	1,07(±0,05)	Cyto	Bradi3g34620.1
352	Molecular chaperone (HSP90 family)	4,83	87,36	91,20	-1,22(±0,06)	NS	NS	Cyto	Bradi4g06370.1
379	Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases	5,23	84,86	101,90	-1,09(±0,15)	NS	NS	Cyto	I1IA06
435	Molecular chaperone (HSP90 family)	4,70	79,63	89,40	-0,91(±0,03)	NS	NS	Cyto	Bradi4g32941.1
602	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)	5,05	66,98	75,70	NS	NS	-1,37(±0,005)	Cyto	Q9LD25
1173	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase	5,59	52,38	47,00	NS	0,58(±0,04)	NS	Er	Q43207
628	Heat shock protein 70	5,23	65,80	61,90	NS	NS	-0,72(±0,08)	Nucl	C3V133
641	Chaperonin complex component, TCP-1 beta subunit (CCT2)	5,18	63,82	45,00	NS	NS	-1,44(±0,05)	ER	I1HGE3
907	Putative PDI-like protein	5,54	60,13	57,20	-1,09(±0,17)	NS	NS	Cyto	D8L9B4
2517	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	6,97	18.21	25,80	NS	1,03(±0,005)	NS	ER	A7XDG5
2598	thioredoxin peroxidase activity/oxidoreductase activity/antioxidant activity	5,08	15,89	17,30	NS	NS	0,67(±0,02)	Cyto	Bradi2g46380
2678	Response to stress	6,99	14,46	18,10	NS	0,62(±0,054)	NS	Unknown	Bradi2g23560.1
414	Ribonucleotide reductase, barrel domain/ATP binding	6,96	81,21	91,5	NS	NS	-0,75(±0,005)	Nucl	Bradi1g48170.1
939	transcription corepressor activity, phosphopyruvate hydratase activity	5,31	59,38	48,30	NS	NS	-1,08(±0,01)	Nucl	Bradi3g22550
1021	Alpha tubulin-3A	4,97	56,88	49,60	NS	0,59(±0,09)	NS	Cyto	A4K4Y4
1222	ATP-dependent 5'-3' DNA helicase activity	5,00	50,50	41,50	NS	0,51(±0,18)	NS	Nucl	I1GwP1
1513	Mitotic spindle checkpoint protein BUB3, WD repeat superfamily	7,07	42,13	37,70	-0,75(±0,07)	NS	NS	Nucl	gi|357121328
1797	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	6,97	35,19	31,20	NS	0,62(±0,03)	NS	Cyto	I1IDB7
1178	Mitochondrial translation elongation factor Tu	5,17	52,13	50,40	NS	0,97(±0,04)	NS	Cyto	I1IB68
2576	Uncharacterized protein	5,49	16,56	18,60	1,07(±0,03)	NS	NS	Cyto	I1I0C2
1634	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta	6,92	39,21	30,30	-0,65(±0,06)	NS	NS	Cyto	O24473
2118	laminin receptor activity	6,99	28,89	32,40	NS	-0,86(±0,006)		Mem	Bradi1g60310.1
2464	Eukaryotic translation initiation factor 5A3	5,18	19,87	17,30	NS	0,56(±0,04)	NS	Cyto	Q3S4H9
2471	Eukaryotic translation initiation factor 5A3	5,33	19,68	17,30	0,73(±0,05)	NS	NS	Cyto	Q3S4H9
2620	small subunit ribosomal protein S12e	5,12	15,27	15,10	NS	0,52(±0,03)	NS	Cyto	I1GMJ6
3052	small subunit ribosomal protein S21e	6,71	10,30	9,00		NS	1,14(±0,04)	Cyto	I1GMJ6

NS Non-significant
SD Standard deviation
Up regulated protein
Down regulated protein

Supplementary Table 3S : Peptide sequences of identified proteins by LC-MS/MS

Spot Ids	Sequence	Modifs	E-value_peptides	log (E value)_protein
174		**Pyruvate,orthophosphate dikinase**		-64,15401459
	GGMTSHAAVVAR	M3:+15.99	0,0085	
	GGMTSHAAVVAR	M3:+15.99	0,00036	
	GGMTSHAAVVAR		0,001	
	GGMTSHAAVVAR		0,007	
	CCVSGCSSIR	C1:+57.04 - C2:+57.04 - C6:+57.04	0,00071	
	TETSPEDVGGMHAAAGILTAR	M11:+15.99	0,0022	
	TETSPEDVGGMHAAAGILTAR	M11:+15.99	3,9E-06	
	TETSPEDVGGMHAAAGILTAR	M11:+15.99	5,6E-06	
	TETSPEDVGGMHAAAGILTAR	M11:+15.99	8,5E-07	
	ELCSETGAAEDDVLAR	C3:+57.04	0,0047	
	TETSPEDVGGMHAAAGILTAR		4,2E-07	
	TETSPEDVGGMHAAAGILTAR		1,2E-05	
	VGICGEHGGEPSSVAFFAK	C4:+57.04	7,8E-06	
	VGICGEHGGEPSSVAFFAK	C4:+57.04	7,1E-05	
	VGICGEHGGEPSSVAFFAK	C4:+57.04	2,3E-05	
	GTAVNVQCMVFGNMGNTSGTGVLFTR	C8:+57.04 - M9:+15.99 - M14:+15.99	0,0026	
	KLYGEFLVNAQGEDVVAGIR		1,7E-08	
	KLYGEFLVNAQGEDVVAGIR		2,3E-09	
	LYGEFLVNAQGEDVVAGIR		2,5E-06	
	LYGEFLVNAQGEDVVAGIR		8,2E-07	
	LYGEFLVNAQGEDVVAGIR		4,4E-07	
	LYGEFLVNAQGEDVVAGIR		0,0011	
	LYGEFLVNAQGEDVVAGIR		0,0061	
	FLDMFGNVVMDIPHALFEEK	M4:+15.99 - M10:+15.99	0,0083	
	FLDMFGNVVMDIPHALFEEK	M4:+15.99 - M10:+15.99	0,00099	
	FLDMFGNVVMDIPHALFEEK	M4:+15.99 - M10:+15.99	0,00011	
	FLDMFGNVVMDIPHALFEEK	M4:+15.99	1,4E-06	
	FLDMFGNVVMDIPHALFEEK		0,00087	
	FLDMFGNVVMDIPHALFEEK		0,0002	
	QLQLAVLAVFDSWDSPR		4,8E-07	
	QLQLAVLAVFDSWDSPR		1,6E-06	
	QLQLAVLAVFDSWDSPR		0,0089	
	FLPIYLAQGILQHDPFEVLDQR		0,00047	
	FLPIYLAQGILQHDPFEVLDQR		4,6E-05	
	FLPIYLAQGILQHDPFEVLDQR		2,1E-07	
215		**Plastid alpha-1,4-glucan phosphorylase**		-108,4458084
	GLSWNEAWSITER		0,00011	
	GLSWNEAWSITER		0,00065	
	GLSWNEAWSITER		0,0012	
	GLSWNEAWSITER		0,0037	
	SVFDSLIINWNATYDYYNK		1,5E-05	
	SVFDSLIINWNATYDYYNK		3,2E-06	
	SVFDSLIINWNATYDYYNK		2,1E-06	
	QLLNILGIVYR	Q1:-17.02655	0,00047	
219		**Plastid alpha-1,4-glucan phosphorylase**		-85,32360077
	GLSWNEAWSITER		0,00011	
	GLSWNEAWSITER		0,00065	
	GLSWNEAWSITER		0,0012	
	GLSWNEAWSITER		0,0037	
	SVFDSLIINWNATYDYYNK		1,5E-05	
	SVFDSLIINWNATYDYYNK		3,2E-06	
	SVFDSLIINWNATYDYYNK		2,1E-06	
	QLLNILGIVYR	Q1:-17.02655	0,00047	
322		**Glutaminyl-tRNA synthetase**		-28,16448784
	FDDTNPEAEKK		0,0094	
	VVITNLEDGK		0,0084	
	EYIDHIQEIVQ		0,0013	
	GLIAEGAATLR		0,0014	

	WPDAPADEASSYYK		9,5E-05
	WPDAPADEASSYYK		0,00021
	WPDAPADEASSYYK		7,7E-07
	LGYFAVDTDSTPEK		0,00092
	CTEVIYGDNPDDIVEIR	C1:+57.04	0,00058
	CTEVIYGDNPDDIVEIR	C1:+57.04	2E-05
	CTEVIYGDNPDDIVEIR	C1:+57.04	2,5E-05
	VHTEIFFSDGNIWR		0,0059
	AMFIDFGLAK		0,0057
352	**Molecular chaperone (HSP90 family)**		-73,43703461
	DDKGFAHPER		0,0062
	ESSAAAVDSSDAPPAEK		0,0067
	ESSAAAVDSSDAPPAEK		0,0003
	ESSAAAVDSSDAPPAEK		0,00015
	ESSAAAVDSSDAPPAEK		6,1E-05
	ESSAAAVDSSDAPPAEK		0,0025
	EVSTEEYNEFYKK		0,0043
	ESSAAAVDSSDAPPAEKFEYQAEVNR		1,3E-05
	KVFEINPEHEIIK		0,0049
	KVFEINPEHEIIK		0,0027
	LSSSPCVLVAAK	C6:+57.04	0,00051
	LSSSPCVLVAAK	C6:+57.04	0,0019
	EVSTEEYNEFYK		0,0002
	EVSTEEYNEFYK		0,00013
	EVSTEEYNEFYK		0,0016
	QEYSQTCDWIK	C7:+57.04	0,003
	AQTLGDTSSLEFMR	M13:+15.99	1,6E-05
	AQTLGDTSSLEFMR	M13:+15.99	6E-05
	ESSAAAVDSSDAPPAEKFEYQAEVNR		8,5E-05
	IQTDKDNGIITITDSGIGMTR	M19:+15.99	2E-05
	IQTDKDNGIITITDSGIGMTR	M19:+15.99	9E-07
	IQTDKDNGIITITDSGIGMTR	M19:+15.99	0,0058
	IQTDKDNGIITITDSGIGMTR	M19:+15.99	8,4E-05
	ESSAAAVDSSDAPPAEKFEYQAEVNR		0,003
	AIYYIAGDSLSSAK		0,0014
	LMDLIVHSLYSNK	M2:+15.99	0,00082
	LMDLIVHSLYSNK	M2:+15.99	0,00045
	AIYYIAGDSLSSAK		6,9E-05
	AIYYIAGDSLSSAK		1,8E-05
	AIYYIAGDSLSSAK		6,8E-06
	QYVWEAESESNSYTIR		0,0066
	AIYYIAGDSLSSAK		0,00025
	AIYYIAGDSLSSAK		0,00015
	AIYYIAGDSLSSAK		0,00065
	KTFNEYLDPLASSHFTTEGEVEFR		0,0017
	KTFNEYLDPLASSHFTTEGEVEFR		0,0092
	YLSVTDPDLLKDGPELDIR		7,8E-05
	RVFISDDFDGELFPR		0,0087
	YLSVTDPDLLKDGPELDIR		1,8E-07
	RVFISDDFDGELFPR		0,00029
	YLSVTDPDLLKDGPELDIR		9,4E-06
	RVFISDDFDGELFPR		0,0056
	VFISDDFDGELFPR		1,8E-05
	VFISDDFDGELFPR		2,2E-05
	VFISDDFDGELFPR		7,9E-06
	YWDWELTNETQPIWLR		0,0021
379	**Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases**		-27,89794922
	HIEKDPALER		0,0079
	MVGESTEAVGAGVGGGSSGQK	M1:+15.99	1,8E-06
	MVGESTEAVGAGVGGGSSGQK	M1:+15.99	2,7E-10
	MVGESTEAVGAGVGGGSSGQK	M1:+15.99	1E-06
	MVGESTEAVGAGVGGGSSGQK		2,9E-06
	MVGESTEAVGAGVGGGSSGQK		4,9E-08
	VVDEGYNPSYGAR		0,00011

VVDEGYNPSYGAR		0,0044	
VVDEGYNPSYGAR		5E-05	
LAEEGKLDPVVGR		0,0014	
VLESLGADPNNIR		0,0032	
VLESLGADPNNIR		0,0002	
AIDLIDEAGSR		0,0033	
AIDLIDEAGSR		0,0018	
MPTLEEYGTNLTK	M1:+15.99	0,00025	
MPTLEEYGTNLTK	M1:+15.99	0,0053	
VLELSLEEAR		0,00075	
NTLLIMTSNVGSSVIEK	M6:+15.99	1,9E-05	
NTLLIMTSNVGSSVIEK	M6:+15.99	2,7E-09	
VLELSLEEAR		0,0063	
GELQCIGATTLDEYR	C5:+57.04	0,00015	
ALASYYFGSEEAMIR	M13:+15.99	0,0024	
ALASYYFGSEEAMIR	M13:+15.99	1E-04	
ALASYYFGSEEAMIR	M13:+15.99	5,5E-06	
VITLDMGLLVAGTK	M6:+15.99	0,00012	
VITLDMGLLVAGTK	M6:+15.99	3,4E-06	
VPEPTVDETIQILR		3,7E-05	
VPEPTVDETIQILR		0,0021	
VPEPTVDETIQILR		0,0012	
NTLLIMTSNVGSSVIEK		5,2E-05	
ALASYYFGSEEAMIR		0,00011	
ALASYYFGSEEAMIR		0,0002	
GSGFVAVEIPFTPR		0,0066	
VITLDMGLLVAGTK		7,1E-06	
VITLDMGLLVAGTK		2,5E-05	
VITLDMGLLVAGTK		5,5E-06	
LGHNFVGTEQILLGLIGEGTGIAAK		0,0024	
AETESGEVGPLVTEADIQHIVSSWTGIPVEK		0,0011	
QSDDIILFIDEVHTLIGAGAAEGAIDAANILKPALAR		0,00059	
435	**Molecular chaperone (HSP90 family)**		-47,91007614
DCLGTIAQSGTSK	C2:+57.04	0,0012	
ELVSNASDALDK		0,0071	
IYEMMTIALGGR	M4:+15.99 - M5:+15.99	6,6E-05	
IYEMMTIALGGR	M4:+15.99 - M5:+15.99	0,0014	
LMDLIVHSLYSHK	M2:+15.99	0,00023	
IKPDPDAGTITITDSGIGMTK	M19:+15.99	0,0034	
DELKDCLGTIAQSGTSK	C6:+57.04	1,5E-05	
LMDLIVHSLYSHK	M2:+15.99	0,00064	
IKPDPDAGTITITDSGIGMTK	M19:+15.99	3,4E-06	
DELKDCLGTIAQSGTSK	C6:+57.04	4,6E-05	
ELVSNASDALDKLR		0,0023	
ELVSNASDALDKLR		0,0015	
GVVDSNDLPLNVSR		0,0019	
GVVDSNDLPLNVSR		0,00046	
GVVDSNDLPLNVSR		0,00016	
AIYYIATDSLQSAK		7,7E-06	
RVFISDDFDGELFPR		0,00047	
IYEMMTIALGGR		0,0002	
IYEMMTIALGGR		0,00013	
RAVELLYETALISSGYTPESPAELGGK		0,0072	
YWDWELANETKPIWMR		0,00071	
YWDWELANETKPIWMR		0,0049	
EVGADNSLIGQFGVGFYSAFLVAEK		0,0004	
EVGADNSLIGQFGVGFYSAFLVAEK		1,6E-06	
EIGADNGLIGQFGVGFYSAFLVAEK		0,0043	
EIGADNGLIGQFGVGFYSAFLVAEK		4,2E-05	
EIGADNGLIGQFGVGFYSAFLVAEK		0,00031	
870	**Pyruvate,orthophosphate dikinase**		-240,0315857
MHANLGHD		0,008	
HGDKILDEANK		0,0026	
HHASMNFTCAEMR	C9:+57.04 - M5:+15.99	2,7E-05	

HHASMNFTCAEMR	C9:+57.04 - M5:+15.99	0,0011
MHANLGHDPSVD		0,0077
NTDLPVKDHTDVG		0,0039
NTDLPVKDHTDVG		0,0049
HHASMNFTCAEMRD	C9:+57.04 - M12:+15.99	0,0077
NTDLPVKDHTDVGD		0,0017
GLHVACENALGR	C6:+57.04	0,00037
HHASMNFTCAEMR	C9:+57.04	0,0012
EGLHVACENALGR	C7:+57.04 - E1:-18.01056	0,0019
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	8,4E-05
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	3,9E-06
MHANLGHDPSVDPVAPLER		7,1E-05
MHANLGHDPSVDPVAPLER		2,8E-05
MHANLGHDPSVDPVAPLER		8,9E-09
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	0,00062
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	0,00027
LQAIMSFHQCGGNVGD	C10:+57.04 - M5:+15.99	0,0069
MHANLGHDPSVDPVAPLER		0,00065
MHANLGHDPSVDPVAPLER		0,00035
HAAELTAGYYNLDDR		1,5E-07
HAAELTAGYYNLDDR		0,00044
HAAELTAGYYNLDDR		2,3E-07
HAAELTAGYYNLDDR		0,003
AYDWSAYK		0,0032
NTDLPVKDHTDVGDEVL		0,0015
NTDLPVKDHTDVGDEVL		0,0084
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	0,00013
VPNHAAELTAGYYNLDDRDGYR		0,0029
VPNHAAELTAGYYNLDDRDGYR		0,00075
YDATAYNTILR		0,0052
HAAELTAGYYNLDDR		6,1E-05
YDATAYNTILR		0,005
HAAELTAGYYNLDDR		0,005
VPNHAAELTAGYYNLDDR		0,0012
VPNHAAELTAGYYNLDDR		6,5E-09
VPNHAAELTAGYYNLDDR		6,1E-05
VPNHAAELTAGYYNLDDRDGYR		1,9E-05
VPNHAAELTAGYYNLDDR		1,3E-08
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	6,8E-05
VPNHAAELTAGYYNLDDR		0,00041
VPNHAAELTAGYYNLDDR		0,00041
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	0,0095
VPNHAAELTAGYYNLDDRD		0,00028
VPNHAAELTAGYYNLDDRD		0,0013
VPNHAAELTAGYYNLDDRD		1,8E-05
EGLHVACENALGR	C7:+57.04	0,0035
TAVQMYADYMASFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	0,0011
EGLHVACENALGR	C7:+57.04	0,003
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	0,0042
VPNHAAELTAGYYNLDDRDGYR		0,0045
AAELTAGYYNLDDR		0,00074
TAVQMYADYMASFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	0,00011
VPNHAAELTAGYYNLDDR		6,7E-05
TAVQMYADYMASFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	2E-06
TAVQMYADYMASFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	1,4E-05
MHANLGHDPSVDPVAPLER		0,0057
MHANLGHDPSVDPVAPLER	M1:+15.99	0,00085
VPNHAAELTAGYYNLDDR		3,4E-05
TAVQMYADYMASFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	0,0064
TAVQMYADYMASFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	0,001
TAVQMYADYMASFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	0,0013
TAVQMYADYMASFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	4,8E-06
ILDEANKVFLGCR	C12:+57.04	0,0022
MHANLGHDPSVDPVAPLER		0,0002

	AYDWSAYK		0,0087	
	MHANLGHDPSVDPVAPLER		0,006	
	AYDWSAYK		0,0004	
	TAVQMYADYMTSFR	M5:+15.99 - M10:+15.99	0,00021	
	VPNHAAELTAGYYNLDDR		0,0041	
	VPNHAAELTAGYYNLDDR		0,0014	
907	**Chaperonin complex component, TCP-1 beta subunit (CCT2)**			-72,4095993
	GASEHVLDEAER		0,00037	
	GASEHVLDEAER		0,0032	
	RIENANILVANTAMDTDKVK	M14:+15.99	0,0082	
	IENANILVANTAMDTDKVK	M13:+15.99	0,0036	
	IENANILVANTAMDTDKVK	M13:+15.99	0,0019	
	RIENANILVANTAMDTDKVK	M14:+15.99	0,0088	
	RIENANILVANTAMDTDKVK	M14:+15.99	1,2E-05	
	RIENANILVANTAMDTDKVK	M14:+15.99	0,0015	
	RIENANILVANTAMDTDKVK	M14:+15.99	3,3E-06	
	RIENANILVANTAMDTDKVK		8,8E-05	
	LIEEIMIGEDR	M6:+15.99	0,0054	
	LIEEIMIGEDR	M6:+15.99	0,00073	
	IHPMTIIAGYR		2,4E-05	
	IENANILVANTAMDTDK		5,6E-05	
	IENANILVANTAMDTDK		0,0003	
	RIENANILVANTAMDTDKVK		0,0051	
	LIHFSGVAMGQACTIVLR	C13:+57.04 - M9:+15.99	0,008	
	LIHFSGVAMGQACTIVLR	C13:+57.04 - M9:+15.99	0,0033	
	LIHFSGVAMGQACTIVLR	C13:+57.04	0,0053	
	LIHFSGVAMGQACTIVLR	C13:+57.04	0,0016	
	LIHFSGVAMGQACTIVLR	C13:+57.04	6,6E-06	
	LALVTGGDIASTFDNPESVK		6,2E-05	
	LALVTGGDIASTFDNPESVK		1,3E-05	
	DSFLDEGFILDKK		0,0007	
	DSFLDEGFILDKK		0,00091	
	LALVTGGDIASTFDNPESVK		0,0032	
	LALVTGGDIASTFDNPESVK		0,00068	
	DSFLDEGFILDK		0,00072	
	DSFLDEGFILDK		7,2E-05	
	SDLMNIAMTTLSSK		2,1E-05	
	SDLMNIAMTTLSSK		7,4E-07	
	LALVTGGDIASTFDNPESVK		9,3E-05	
	LALVTGGDIASTFDNPESVK		4,8E-05	
	MASFVGAMAIADLVK	M1:+15.99 - M8:+15.99	7,7E-05	
	MASFVGAMAIADLVK	M1:+15.99 - M8:+15.99	7,4E-06	
	MASFVGAMAIADLVK	M1:+15.99 - M8:+15.99	1,3E-05	
	MASFVGAMAIADLVK	M8:+15.99	4,8E-05	
	MASFVGAMAIADLVK	M8:+15.99	2,7E-05	
	MASFVGAMAIADLVK	M8:+15.99	3E-05	
	LALVTGGDIASTFDNPESVK		0,001	
	ILSQDKEYFAELAVDAVLR		3,9E-07	
	ILSQDKEYFAELAVDAVLR		7,4E-07	
	MASFVGAMAIADLVK		2,4E-06	
	VQDDEVGDGTTSVVVLAGELLR		0,0022	
	VQDDEVGDGTTSVVVLAGELLR		0,0017	
	ALQAIPTIIADNAGLDSAELISQLR		1,6E-05	
	ALQAIPTIIADNAGLDSAELISQLR		0,0098	
	ALQAIPTIIADNAGLDSAELISQLR		0,0002	
	QLIYNFPEELFADAGILAVEHADFEGIER		2,1E-06	
	QLIYNFPEELFADAGILAVEHADFEGIER		0,0011	
	QLIYNFPEELFADAGILAVEHADFEGIER		0,00055	
1425	**Aspartate aminotransferase/Glutamic oxaloacetic transaminase AAT1/GOT2**			-79,89112854
	CYSGMTPEQVDR	C1:+57.04 - M5:+15.99	0,0082	
	TFSYYHPESR		0,0044	
	PSPDKVNVGVGAYR		0,0026	
	AHNPTGVDPTEEQWR		0,0009	
	ASLFGHVEPAPK		0,00097	

	ASLFGHVEPAPK		0,00033
	ASLFGHVEPAPK		0,0034
	LLHACAHNPTGVDPTEEQWR	C5:+57.04	0,0091
	MASLFGHVEPAPK	M1:+15.99	3E-05
	MASLFGHVEPAPK	M1:+15.99	0,00034
	ASLFGHVEPAPK		0,00046
	lAAVQALSGTGACR	C13:+57.04	0,0044
	MASLFGHVEPAPK	M1:+15.99	1,1E-05
	MASLFGHVEPAPK	M1:+15.99	6E-05
	IFLEDGHQIGCAQSYAK	C11:+57.04	3,3E-05
	IFLEDGHQIGCAQSYAK	C11:+57.04	2,8E-05
	IFLEDGHQIGCAQSYAK	C11:+57.04	3,8E-08
	IFLEDGHQIGCAQSYAK	C11:+57.04	3,6E-05
	NAPNGSFFLLHACAHNPTGVDPTEEQWR	C13:+57.04	3,9E-05
	NAPNGSFFLLHACAHNPTGVDPTEEQWR	C13:+57.04	3E-05
	NAPNGSFFLLHACAHNPTGVDPTEEQWR	C13:+57.04	6,4E-05
	GLDFAGLMDDIK	M8:+15.99	0,00037
	AGCLSILCEDEMQAVAVK	C3:+57.04 - C8:+57.04	0,00037
	AGCLSILCEDEMQAVAVK	C3:+57.04 - C8:+57.04	0,0011
	GLDFAGLMDDIK	M8:+15.99	0,0042
	GLDFAGLMDDIK	M8:+15.99	0,00092
	LGSPLSWEHVTNQIGMFCYSGMTPEQVDR	C18:+57.04 - M16:+15.99 - M22:+15.99	0,00018
	LGSPLSWEHVTNQIGMFCYSGMTPEQVDR	C18:+57.04 - M16:+15.99 - M22:+15.99	0,002
	NHFPFFDMAYQGFASGDPER	M8:+15.99	0,00037
	ISMAGVTTGNVAYLANAIHDVTK	M3:+15.99	0,00015
	ISMAGVTTGNVAYLANAIHDVTK	M3:+15.99	0,0014
	ISMAGVTTGNVAYLANAIHDVTK	M3:+15.99	2,4E-06
	NHFPFFDMAYQGFASGDPER	M8:+15.99	0,0031
	PILGVTEAFLADPSPDK		8,9E-05
	PILGVTEAFLADPSPDK		0,0004
	PKDPILGVTEAFLADPSPDKVNVGVGAYR		0,0051
	ASLFGHVEPAPKDPILGVTEAFLADPSPDK		0,00032
	DPILGVTEAFLADPSPDK		0,00084
	DPILGVTEAFLADPSPDK		1,6E-10
	DPILGVTEAFLADPSPDK		3,3E-07
	GLDFAGLMDDIK		0,0041
	GLDFAGLMDDIK		0,0052
	DPILGVTEAFLADPSPDK		1,9E-08
	MASLFGHVEPAPKDPILGVTEAFLADPSPDK	M1:+15.99	0,0034
	ASLFGHVEPAPKDPILGVTEAFLADPSPDK		1,7E-07
	ASLFGHVEPAPKDPILGVTEAFLADPSPDK		1,6E-05
1496	**dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase**		-56,22610855
	VAETLMFDYHR	M6:+15.99	0,0025
	ELINPEVTVTMTENTPDDPR	M11:+15.99	5,4E-06
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04 - M8:+15.99 - M13:+15.99	2,9E-06
	ELINPEVTVTMTENTPDD	M11:+15.99	5E-05
	ELINPEVTVTMTENTPDD	M11:+15.99	5,1E-05
	ILLTSTSEVYGD		0,0077
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	2,9E-06
	ILVTGGAGFIGSHLVDK		1E-06
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	0,00034
	ILVTGGAGFIGSHLVDK		5,4E-07
	ELINPEVTVTMTENTPDD	M11:+15.99	9,6E-05
	ELINPEVTVTMTENTPDDPR		0,00051
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	0,00038
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	0,00085
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	0,0014
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK		0,0002
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK		0,00016
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04 - M8:+15.99	7,1E-05
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04 - M8:+15.99	1E-05
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04 - M8:+15.99	2,3E-07
	TNVIGTLNMLGLAK	M9:+15.99	5E-06
	TNVIGTLNMLGLAK	M9:+15.99	2,7E-05

	DGLVLMEDDFR		0,0038
	ILLTSTSEVYGDPLEHPQTEAYWGNVNPIGVR		3,6E-06
	ILLTSTSEVYGDPLEHPQTEAYWGNVNPIGVR		0,00028
	LMNGDNTGPINIGNPGEFTMLELAENVK	M2:+15.99 - M20:+15.99	1,6E-07
	LMNGDNTGPINIGNPGEFTMLELAENVK	M2:+15.99 - M20:+15.99	2,9E-05
	TNVIGTLNMLGLAK	M9:+15.99	0,0013
	TNVIGTLNMLGLAK	M9:+15.99	0,00026
	TNVIGTLNMLGLAK		1,6E-05
	TNVIGTLNMLGLAK		3,6E-05
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04	0,0055
	ILVTGGAGFIGSHLVDKLMENEKNEVIVADNFFTGSK	M19:+15.99	0,00029
1513	**Mitotic spindle checkpoint protein BUB3, WD repeat superfamily**		-32,90206909
	TLVGTYAQPER		0,0015
	FSNHSDHLLVSSWDK		1E-05
	FSNHSDHLLVSSWDK		1,7E-06
	GEFAHPGPVLDCCFHDDSSGFSAGADHTVR	C12:+57.04 - C13:+57.04	0,00011
	GEFAHPGPVLDCCFHDDSSGFSAGADHTVR	C12:+57.04 - C13:+57.04	3,4E-05
	CFPNGTGYALSSVEGR	C1:+57.04	3,4E-06
	CFPNGTGYALSSVEGR	C1:+57.04	9,8E-06
	YASSIAALSFSK		5,3E-05
	YASSIAALSFSK		2,8E-05
	VSMEFFDLSESAQSK	M3:+15.99	3,3E-05
	VSMEFFDLSESAQSK	M3:+15.99	2,2E-07
	CFPNGTGYALSSVEGR	C1:+57.04	0,0053
	VSMEFFDLSESAQSK		1,1E-05
	VSMEFFDLSESAQSK		4,1E-06
	DTVYPVNAIAFHPIYGTF		0,00069
1577	**High-molecular-weight glutenin subunit**		-27,89794922
	AEQQAASPMVAK	M9:+15.99	0,002
	MEGGDALSASQ	M1:+15.99	0,0023
	MEGGDALSASQ	M1:+15.99	0,0048
	SLQQPGQGQQIGK		0,0021
	SLQQPGQGQQIGK		0,0029
	QGSYYPGQASPQQPGQGQQPGK		0,001
	QGSYYPGQASPQQPGQGQQPGK		0,0021
	QGSYYPGQASPQQPGQGQQPGK		0,0004
	QGSYYPGQASPQQPGQGQQPGK		0,0035
	QGSYYPGQASPQQPGQGQQPGK		0,0014
	SLQQPGQGQQGHYPASLQQPGQGQPGQR		0,002
	SSQTVQGYYPGVTSPR		1,7E-06
	SSQTVQGYYPGVTSPR		1,3E-05
	GQQGYYPTSLQQPGQGQQGYYPTSLQHTGQR		0,0029
	GQQGYYPTSLQQPGQGQQGYYPTSLQHTGQR		0,002
	QQPVQGQQPEQGQQPGQWQQGYYPTSPQQLGQGQQPR		0,0058
	LPWSTGLQMR		0,00083
1594	**Fructose-bisphosphate aldolase**		-27,50285339
	GILAADESTGTIGK		7,4E-07
	GILAADESTGTIGK		1,3E-06
	IGATEPSQLSIDQNAQGLAR		7,4E-05
	IGATEPSQLSIDQNAQGLAR		9,1E-05
	FASINVENVEDNR		0,0042
	IGATEPSQLSIDQNAQGLAR		0,00097
	YKDELIKNAAYIGTPGK		7,6E-05
	IGATEPSQLSIDQNAQGLAR		4E-05
	YKDELIKNAAYIGTPGK		7,6E-07
	YKDELIKNAAYIGTPGK		1,4E-05
	IGATEPSQLSIDQNAQGLAR		0,0052
	ALNDQHVLLEGTLLKPNMVTPGSDSK	M18:+15.99	3,5E-06
	ALNDQHVLLEGTLLKPNMVTPGSDSK	M18:+15.99	0,00071
	VAPEVIAEYTVR		0,00098
	VAPEVIAEYTVR		0,00024
	GTIELAGTNGETTTQGFDDLGK		2,4E-05
	GTIELAGTNGETTTQGFDDLGK		0,0028
	GTIELAGTNGETTTQGFDDLGK		3,8E-08

1634	**Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta**		-63,5656662
PADEVDKLAEK		0,00047	
PADEVDKLAEK		4,4E-05	
KEEATEIAPFDPTKK		0,0016	
KEEATEIAPFDPTKK		0,009	
VVIQDPADEVDK		0,00027	
VVIQDPADEVDK		0,00069	
KEEATEIAPFDPTK		0,00062	
KEEATEIAPFDPTK		0,00019	
KEEATEIAPFDPTK		6,6E-05	
KEEATEIAPFDPTK		5E-06	
KVVIQDPADEVDKLAEK		6,1E-05	
KVVIQDPADEVDKLAEK		0,0037	
KVVIQDPADEVDKLAEK		9,9E-05	
DYKYDELLGR		0,0021	
KVVIQDPADEVDKLAEK		0,00028	
EEATEIAPFDPTK		0,0046	
TEGLSVTESGEASFVGLKK		1E-05	
TEGLSVTESGEASFVGLKK		1E-06	
VVIQDPADEVDKLAEK		9,1E-05	
VVIQDPADEVDKLAEK		5,5E-06	
DYKYDELLGR		0,00041	
PADEVDKLAEK		0,0084	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M6:+15.99 - M7:+15.99 - M13:+15.99	0,0053	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M6:+15.99 - M7:+15.99 - M13:+15.99	0,00051	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M6:+15.99 - M7:+15.99 - M13:+15.99	0,0041	
LAEKTEGLSVTESGEASFVGLK		0,0041	
LAEKTEGLSVTESGEASFVGLK		0,00089	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M6:+15.99 - M7:+15.99 - M13:+15.99	0,0038	
TEGLSVTESGEASFVGLK		0,0022	
TEGLSVTESGEASFVGLK		3,1E-07	
TEGLSVTESGEASFVGLK		3,1E-06	
TEGLSVTESGEASFVGLK		1,8E-05	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M7:+15.99 - M13:+15.99	0,001	
TEGLSVTESGEASFVGLK		1,2E-05	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M6:+15.99 - M13:+15.99 - Q1:-17.02655	0,0045	
VVIQDPADEVDKLAEKTEGLSVTESGEASFVGLK		0,00017	
VVIQDPADEVDKLAEKTEGLSVTESGEASFVGLK		0,005	
TVFVNFMDLCK	C10:+57.04	0,0028	
TVFVNFMDLCK	C10:+57.04	0,00062	
TVFVNFMDLCK	C10:+57.04 - M7:+15.99	0,004	
TEGLSVTESGEASFVGLK		0,0077	
TEGLSVTESGEASFVGLK		0,0014	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M7:+15.99	7,9E-05	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M7:+15.99	0,0073	
QPEHVMMFLLAEMGTSGSLDGQQR	M6:+15.99 - M13:+15.99 - Q1:-17.02655	0,001	
TEGLSVTESGEASFVGLK		0,007	
1662	**NAD-dependent malate dehydrogenase**		-89,4342804
TQDGGTEVVEAK		0,0035	
TQDGGTEVVEAK		0,0064	
AGAVFGDACLK	C9:+57.04	0,00034	
AGAVFGDACLK	C9:+57.04	0,0067	
ANVPVTGVNVPVVGGHAG		0,0003	
ANVPVTGVNVPVVGGHAG		9E-06	
ANVPVTGVNVPVVGGH		0,0002	
ANVPVTGVNVPVVGGH		2E-05	
ANVPVTGVNVPVVGGHA		1,6E-05	
ANVPVTGVNVPVVGGHA		2,5E-06	
ANVPVTGVNVPVVGGHA		2,2E-06	
PVNSTVPIAAEVFKK		4,5E-06	
PVNSTVPIAAEVFKK		0,0041	
ANVPVTGVNVPVVGG		0,0051	
ANVPVTGVNVPVVGG		0,00039	
GIGQPLALLMK	M10:+15.99	0,0019	

GIGQPLALLMK	M10:+15.99	0,00033	
GGIGQPLALLMK	M11:+15.99	0,0046	
PVNSTVPIAAEVFK		0,0025	
PVNSTVPIAAEVFK		1,1E-05	
GIGQPLALLMK	M10:+15.99	0,00036	
AGGIGQPLALLMK	M12:+15.99	8E-05	
AGGIGQPLALLMK	M12:+15.99	0,0039	
GSATLSMAYAGAVFGDACLK	C18:+57.04 - M7:+15.99	6,5E-07	
GSATLSMAYAGAVFGDACLK	C18:+57.04 - M7:+15.99	9,6E-08	
NPVNSTVPIAAEVFK		0,0033	
KVAILGAAGGIGQPLALLMK	M19:+15.99	1,3E-07	
KVAILGAAGGIGQPLALLMK	M19:+15.99	5E-07	
MISNPVNSTVPIAAEVFK	M1:+15.99	1,7E-05	
MISNPVNSTVPIAAEVFK	M1:+15.99	0,00039	
MISNPVNSTVPIAAEVFK	M1:+15.99	1,6E-05	
MISNPVNSTVPIAAEVFK	M1:+15.99	0,00012	
KVAILGAAGGIGQPLALLMK	M19:+15.99	0,00069	
KVAILGAAGGIGQPLALLMK	M19:+15.99	0,0024	
MISNPVNSTVPIAAEVFK	M1:+15.99	5,1E-05	
KVAILGAAGGIGQPLALLMK	M19:+15.99	0,0007	
VAILGAAGGIGQPL		0,0047	
VAILGAAGGIGQPL		0,00094	
ALVNMISNPVNSTVPIAAEVFK	M5:+15.99	2,9E-06	
ALVNMISNPVNSTVPIAAEVFK	M5:+15.99	4E-07	
ALVNMISNPVNSTVPIAAEVFK	M5:+15.99	1,4E-06	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	0,00068	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	2,7E-07	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	6,9E-08	
KVAILGAAGGIGQPLALLMK		0,00076	
KVAILGAAGGIGQPLALLMK		0,00011	
KVAILGAAGGIGQPLALLMK		0,0042	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	0,00031	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	4,4E-05	
ANVPVTGVNVPVVGGHAGITILPL		0,0035	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	0,00042	
GFVGDDQLGEALEGADLVIIPAGVPR		0,00048	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	0,0028	
GFVGDDQLGEALEGADLVIIPAGVPR		0,00024	
VAILGAAGGIGQPLALLMK		1,2E-05	
VAILGAAGGIGQPLALLMK		1,2E-05	
VAILGAAGGIGQPLALLMK		0,0071	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	9,4E-07	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	2,1E-06	
VAILGAAGGIGQPLALLMK		0,00058	
GFVGDDQLGEALEGADLVIIPAGVPR		0,0081	
GFVGDDQLGEALEGADLVIIPAGVPR		0,0083	
VAILGAAGGIGQPLALLMK		4,2E-05	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	0,00023	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	1,6E-08	
VAILGAAGGIGQPLALLMK		3,4E-06	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	4,6E-08	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	2E-07	
VAILGAAGGIGQPLALLMK		5,9E-05	
VAILGAAGGIGQPLALLMK		0,00044	
VAILGAAGGIGQPLALLMK	M18:+15.99	0,0043	
1733	**[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase [EC:2.3.1.39]**		-34,82670975
VQQLCDAANEDVDEK	C5:+57.04	0,0003	
VQQLCDAANEDVDEK	C5:+57.04	1,7E-06	
VQQLCDAANEDVDEK	C5:+57.04	8,4E-06	
IPVISNVDAQPHSD		0,00013	
IPVISNVDAQPHSD		0,0012	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M6:+15.99 - M17:+15.99	6,6E-05	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M6:+15.99 - M17:+15.99	0,0002	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M6:+15.99 - M17:+15.99	1,2E-05	

LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M6:+15.99 - M17:+15.99	4,8E-05	
LAVAGAFHTSFMQPAVSR	M12:+15.99	0,0093	
LAVAGAFHTSFMQPAVSR	M12:+15.99	0,0021	
LAVAGAFHTSFMQPAVSR	M12:+15.99	2,4E-05	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M17:+15.99	0,0024	
VQIANFLCPGNYAVSGGVK	C8:+57.04	7,9E-05	
ANDILGYDLLNLCIDGPK	C13:+57.04	3,8E-08	
ANDILGYDLLNLCIDGPK	C13:+57.04	0,00022	
ANDILGYDLLNLCIDGPK	C13:+57.04	1,4E-05	
LNSTVISQPAIYVTSLAAVEVLR		9,4E-05	
LNSTVISQPAIYVTSLAAVEVLR		0,00011	
LNSTVISQPAIYVTSLAAVEVLR		7,8E-05	
VQQLCDAANEDVDEK	C5:+57.04	0,0003	
VQQLCDAANEDVDEK	C5:+57.04	1,7E-06	
VQQLCDAANEDVDEK	C5:+57.04	8,4E-06	
IPVISNVDAQPHSD		0,00013	
IPVISNVDAQPHSD		0,0012	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M6:+15.99 - M17:+15.99	6,6E-05	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M6:+15.99 - M17:+15.99	0,0002	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M6:+15.99 - M17:+15.99	1,2E-05	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M6:+15.99 - M17:+15.99	4,8E-05	
LAVAGAFHTSFMQPAVSR	M12:+15.99	0,0093	
LAVAGAFHTSFMQPAVSR	M12:+15.99	0,0021	
LAVAGAFHTSFMQPAVSR	M12:+15.99	2,4E-05	
LRGEAMQDASDAANSAMVSVIGLDSEK	M17:+15.99	0,0024	
VQIANFLCPGNYAVSGGVK	C8:+57.04	7,9E-05	
ANDILGYDLLNLCIDGPK	C13:+57.04	3,8E-08	
ANDILGYDLLNLCIDGPK	C13:+57.04	0,00022	
ANDILGYDLLNLCIDGPK	C13:+57.04	1,4E-05	
LNSTVISQPAIYVTSLAAVEVLR		9,4E-05	
LNSTVISQPAIYVTSLAAVEVLR		0,00011	
LNSTVISQPAIYVTSLAAVEVLR		7,8E-05	
2346	**lactoylglutathione lyase [EC:4.4.1.5]**		-15,48465633
ATLELTHNWGTESD		0,00014	
GFGHIGVTVDDVYK		5,9E-05	
GFGHIGVTVDDVYK		5,6E-05	
GFGHIGVTVDDVYK		0,0067	
GFGHIGVTVDDVYK		0,0034	
ATLELTHNWGTESDPEFK		0,00016	
ATLELTHNWGTESDPEFK		8,8E-05	
ATLELTHNWGTESDPEFK		3E-07	
ATLELTHNWGTESDPEFK		2,1E-05	
GFGHIGVTVDDVYK		0,0017	
GFGHIGVTVDDVYK		7,8E-06	
GFGHIGVTVDDVYK		2,3E-05	
ATLELTHNWGTESDPEFK		0,00038	
GFGHIGVTVDDVYK		0,00095	
GFGHIGVTVDDVYK		8,5E-05	
GFGHIGVTVDDVYK		0,006	
2448	**Triticin**		-30,63648415
NSILGALPVDVIANAYGISR		0,0081	
NSILGALPVDVIAN		0,00084	
SSILGALPVDVIANAYGISR		1,2E-07	
NSILGALPVDVIANAYGISR		5,7E-06	
SSILGALPVDVIANAYGISR		2,7E-05	
NSILGALPVDVIANAYGISR		0,00027	
SSILGALPVDVIANAYGISR		0,0027	
SSILGALPVDVIANAYGISR		4,2E-05	
NSILGALPVDVIANAYGISR		0,00043	
NSILGALPVDVIANAYGISR		6,2E-05	
NSILGALPVDVIANAYGISR		8,9E-06	
SSILGALPVDVIANAYGISR		1,6E-08	
SSILGALPVDVIANAYGISR		0,00022	
NSILGALPVDVIANAYGISR		0,00033	

	SSILGALPVDVIANAYGISR		5,9E-05
	SSILGALPVDVIANAYGISR		5,5E-05
	NSILGALPVDVIANAYGISR		0,0031
	NSILGALPVDVIANAYGISR		1,7E-06
	NSILGALPVDVIANAYGISR		1,6E-05
	NSILGALPVDVIANAYGISR		2,1E-07
	NVFNDLLSPGQLLIIPQNYVVLK		0,0089
	NVFNDLLSPGQLLIIPQNYVVLK		0,00067
	NSILGALPVDVIANAYGISR		1,9E-06
	SSILGALPVDVIANAYGISR		0,0014
	NSILGALPVDVIANAYGISR		7,4E-07
	SSILGALPVDVIANAYGISR		1,3E-07
	NSILGALPVDVIANAYGISR		8,6E-07
	NSILGALPVDVIANAYGISR		1,3E-06
	NSILGALPVDVIANAYGISR		1,2E-06
	SSILGALPVDVIANAYGISR		0,0028
	SSILGALPVDVIANAYGISR		0,00033
	NSILGALPVDVIANAYGISR		0,0077
2471	**Eukaryotic translation initiation factor 5A3**		-48,18342972
	KLEDIVPSSHN		0,0013
	KLEDIVPSSHNCD	C12:+57.04	0,0021
	KLEDIVPSSHNCD	C12:+57.04	2,9E-05
	KLEDIVPSSH		0,0071
	KLEDIVPSSH		0,001
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,0062
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	1,9E-05
	PSSHNCDVPHVDR	C6:+57.04	0,00031
	LEDIVPSSHNCDVPHVDR	C11:+57.04	0,00013
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,00031
	LEDIVPSSHNCDVPHVDR	C11:+57.04	0,0011
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,0054
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,00092
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,0072
	LPTDDVLLGQIK		0,0021
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	6,1E-05
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,00035
	LPTDDVLLGQIK		0,00062
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,003
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,00092
	TGFADGKDLILSVMSAMGEEQICAVK	C23:+57.04 - M14:+15.99 - M17:+15.99	0,0017
	TGFADGKDLILSVMSAMGEEQICAVK	C23:+57.04 - M14:+15.99 - M17:+15.99	6,4E-05
	DDLKLPTDDVLLGQIK		0,00046
	TGFADGKDLILSVMSAMGEEQICAVK	C23:+57.04 - M14:+15.99 - M17:+15.99	7,6E-06
	TGFADGKDLILSVMSAMGEEQICAVK	C23:+57.04 - M14:+15.99 - M17:+15.99	2,4E-06
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	1,4E-05
	LPTDDVLLGQIK		0,00053
	LPTDDVLLGQIK		0,0054
	YQLIDITDDGYVSLLTESGNTK		0,0011
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,0057
	DDLKLPTDDVLLGQIK		0,0096
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,0013
	CHFVAIDIFNGK	C1:+57.04 - C1:-17.02655	0,0028
	QDYQLIDITDDGYVSLLTESGNTKDDLK		0,002
	CHFVAIDIFNGK	C1:+57.04 - C1:-17.02655	0,0055
	QDYQLIDITDDGYVSLLTESGNTKDDLK		0,0009
	LPTDDVLLGQIK		0,0036
2576	Uncharacterized protein		-37,23802567
	IGSLVDVQTSK		0,0018
	IGSLVDVQTSK		0,00012
	IGSLVDVQTSKD		6,9E-05
	IGSLVDVQTSKD		8,5E-05
	IGSLVDVQTSKDPEGLR		8,6E-05
	IGSLVDVQTSK		0,0023
	IGSLVDVQTSK		0,005

QELEIVMGNEHISFTTSK	M7:+15.99	1,1E-05	
AAVGGAGNGAGEEAGGAEFYLR		1E-06	
AAVGGAGNGAGEEAGGAEFYLR		3,5E-05	
GKFGHEFLEFEFRPDGK		1,6E-05	
GKFGHEFLEFEFRPDGK		3E-05	
GKFGHEFLEFEFRPDGK		0,007	
GKFGHEFLEFEFRPDGK		0,00032	
FGHEFLEFEFRPDGK		0,0075	
FGHEFLEFEFRPDGK		0,00045	
QELEIVMGNEHISFTTSK	M7:+15.99	0,0045	
QELEIVMGNEHISFTTSK		4,9E-05	
QELEIVMGNEHISFTTSK		0,00049	
QELEIVMGNEHISFTTSK		0,0027	
AAVGGAGNGAGEEAGGAEFYLR	A1:+42.01057	1,8E-07	
AAVGGAGNGAGEEAGGAEFYLR	A1:+42.01057	9,9E-05	
AAVGGAGNGAGEEAGGAEFYLR	A1:+42.01057	1,3E-07	
AAVGGAGNGAGEEAGGAEFYLR	A1:+42.01057	2,5E-08	
AAVGGAGNGAGEEAGGAEFYLR	A1:+42.01057	0,00053	
CFVFSLINLHFK	C1:+57.04	0,0017	
CFVFSLINLHFK	C1:+57.04	0,0076	
CFVFSLINLHFK	C1:+57.04	0,00063	
CFVFSLINLHFK	C1:+57.04	4,1E-05	
CFVFSLINLHFK	C1:+57.04	0,0067	
358	**HMW-glutenin By subunit**		-25,41130447
QGQQLEQGQQPGQGQQTR		0,0051	
QGQQLEQGQQPGQGQQTR		3,7E-06	
QQPGQGQQIGQGQQLGQGR		0,00029	
QQPGQGQQIGQGQQLGQGR		2,4E-06	
QQPGQGQQIGQGQQLGQGR		2,1E-05	
ELQESSLEACR	C10:+57.04	0,00032	
VQQPATQLPIMCR	C12:+57.04 - M11:+15.99	0,00039	
VQQPATQLPIMCR	C12:+57.04 - M11:+15.99	0,0019	
VQQPATQLPIMCR	C12:+57.04 - M11:+15.99	0,00062	
QQPGQGQQPEQGQQPGQGQQGYYPTFPQQPGQGK		0,00025	
LPWSTGLQMR		0,0055	
LPWSTGLQMR		0,00014	
LPWSTGLQMR		0,0015	
402	**ATP synthase subunit alpha, mitochondrial**		-22,76257515
VVDALGVPIDGK		0,00055	
AILSTINPELQK		0,0017	
VVDALGVPIDGK		5,1E-05	
AAELTTLLESR		0,0088	
DNGMHALIIYDDLSK		0,0044	
VYGLNEIQAGEMVEFASGVK	M12:+15.99	7,1E-06	
MTNFYTNFQVDEIGR	M1:+15.99	0,00014	
VYGLNEIQAGEMVEFASGVK	M12:+15.99	8,3E-08	
MTNFYTNFQVDEIGR	M1:+15.99	6,2E-05	
VVDALGVPIDGK		0,00055	
AILSTINPELQK		0,0017	
VVDALGVPIDGK		5,1E-05	
AAELTTLLESR		0,0088	
DNGMHALIIYDDLSK		0,0044	
VYGLNEIQAGEMVEFASGVK	M12:+15.99	7,1E-06	
MTNFYTNFQVDEIGR	M1:+15.99	0,00014	
VYGLNEIQAGEMVEFASGVK	M12:+15.99	8,3E-08	
MTNFYTNFQVDEIGR	M1:+15.99	6,2E-05	
715	**ATP synthase subunit alpha, chloroplastic**		-51,4895401
VVNALAKPIDGK		0,00027	
VVQVGDGIAR		0,0026	
HLKDTKPQFQEIISSSK		0,0081	
TAVATDTILNQK		0,002	
VVNALAKPIDGKGEIIASESR		0,0048	
DTKPQFQEIISSSK		0,00074	
PAINVGISVSR		0,0095	

	HTLIIYDDLSK		1,1E-05
	LIESPAPSIISR		0,00052
	HTLIIYDDLSK		1,9E-05
	EAYPGDVFYLHSR		0,00095
	EAYPGDVFYLHSR		6,5E-05
	EAYPGDVFYLHSR		0,00024
	IAQIPVSEAYLGR		0,0022
	NVGIVLMGDGLMIQEGSFVK	M7:+15.99 - M12:+15.99	3,4E-06
	NVGIVLMGDGLMIQEGSFVK	M7:+15.99 - M12:+15.99	1,1E-08
	NVGIVLMGDGLMIQEGSFVK	M7:+15.99	1,9E-07
	NVGIVLMGDGLMIQEGSFVK	M7:+15.99	9,4E-09
	NVGIVLMGDGLMIQEGSFVK	M7:+15.99	4E-09
	NVGIVLMGDGLMIQEGSFVK	M12:+15.99	0,0064
	NVGIVLMGDGLMIQEGSFVK	M12:+15.99	0,00032
	IIGLGEIMSGELVEFAEGTR	M8:+15.99	7E-07
	IIGLGEIMSGELVEFAEGTR	M8:+15.99	1,2E-05
	IIGLGEIMSGELVEFAEGTR	M8:+15.99	0,00017
	NVGIVLMGDGLMIQEGSFVK		3,3E-06
	SVYEPLQTGLIAIDSMIPIGR	M16:+15.99	0,0026
	SVYEPLQTGLIAIDSMIPIGR	M16:+15.99	0,0017
	SVYEPLQTGLIAIDSMIPIGR	M16:+15.99	0,0068
	SVYEPLQTGLIAIDSMIPIGR	M16:+15.99	0,00086
	IIGLGEIMSGELVEFAEGTR		3E-06
	IIGLGEIMSGELVEFAEGTR		3E-07
	IIGLGEIMSGELVEFAEGTR		0,001
	IIGLGEIMSGELVEFAEGTR		0,00015
744	**Vesicle trafficking protein Sly1 (Sec1 family)**		-72,64346313
	HGVTLHLNIDK		0,0024
	HGVTLHLNIDK		0,0028
	SLNTQFAAASSTASR		0,0021
	SLNTQFAAASSTASR		5,1E-07
	VAEEIEAQLAK		0,003
	MIGGGNYIEYR		0,0086
	LYGQSISAVTAGVK		0,0007
	HTNIATALLGH		0,004
	ESEVDMSAFQYVK	M6:+15.99	0,0012
	HTNIATALLGH		0,0019
	MIDKHTNIATALLGHIK	M1:+15.99	0,0057
	HLMNAVNSLPELTER	M3:+15.99	0,0089
	MIDKHTNIATALLGHIK	M1:+15.99	0,00061
	MIDKHTNIATALLGHIK	M1:+15.99	6,9E-06
	HTNIATALLGHIK		1E-05
	HTNIATALLGHIK		0,0014
	HTNIATALLGHIK		3,2E-07
	HTNIATALLGHIK		0,00036
	HTNIATALLGHIK		0,0012
	GGPAEMVAAALDAR	M6:+15.99	0,0037
	ESEVDMSAFQYVK		0,0077
	GGPAEMVAAALDAR	M6:+15.99	0,00045
	SLDGYYECENDMLVNGTVDR	C8:+57.04	4,8E-06
	GGPAEMVAAALDAR	M6:+15.99	0,00017
	PVLCLFDR	C4:+57.04	0,0047
	PVLCLFDR	C4:+57.04	0,00081
	TVEALMEGKPNPEVDNYLLFDPR	M6:+15.99	0,003
	GGPAEMVAAALDAR		0,0006
	GGPAEMVAAALDAR		0,001
	EAIVFMIGGGNYIEYR	M6:+15.99	3,1E-05
	EAIVFMIGGGNYIEYR	M6:+15.99	2,6E-07
	EAIVFMIGGGNYIEYR	M6:+15.99	4,3E-06
	EAIVFMIGGGNYIEYR	M6:+15.99	3,5E-06
	ILVMDGPCISLLSPVLR	C8:+57.04 - M4:+15.99	0,0012
	ILVMDGPCISLLSPVLR	C8:+57.04 - M4:+15.99	1,5E-05
	EAIVFMIGGGNYIEYR		4,8E-05
	ILVMDGPCISLLSPVLR	C8:+57.04	0,0012

ILVMDGPCISLLSPVLR	C8:+57.04	0,00019	
YDLDDSDPFWVANSWSPFPK		0,0091	
YDLDDSDPFWVANSWSPFPK		3,9E-07	
YDLDDSDPFWVANSWSPFPK		4,9E-07	
HVIYGATEILNGVEFIQQLAELGQK		0,00011	
HVIYGATEILNGVEFIQQLAELGQK		0,0004	
TGHAMLHTLYGQAMK	M5:+15.99 - M14:+15.99	0,0066	
AYFSATSAHTCTGDGNAMVAR	C11:+57.04 - M18:+15.99	5E-06	
AYFSATSAHTCTGDGNAMVAR	C11:+57.04 - M18:+15.99	6,5E-05	
770	**Methylenetetrahydrofolate reductase**		-44,50045013
AYGIHLGTEMCK	C11:+57.04 - M10:+15.99	0,001	
AYGIHLGTEMCK	C11:+57.04 - M10:+15.99	0,0032	
GFLTINSQPAVNAEK		4,3E-05	
GFLTINSQPAVNAEK		4E-05	
SESPSVGWGGPGGYVYQK		7,2E-05	
SESPSVGWGGPGGYVYQK		0,0026	
SESPSVGWGGPGGYVYQK		7,6E-05	
SDSPSVGWGGPGGYVYQK		0,003	
TEEGVENLFER		0,004	
AYVEFFCAK	C7:+57.04	0,0073	
IPAEITAALDPIKDNEEAVK		0,007	
IPAEITAALDPIKDNEEAVK		0,00015	
AFPSLTYIAVNK		0,0069	
AFPSLTYIAVNK		0,00034	
QIGITCPIVPGIMPINNYK	C6:+57.04 - M13:+15.99	1,8E-05	
MVAHGPNFCDITWGAGGSTADVTLDIANR	C9:+57.04 - M1:+15.99	0,00022	
MVAHGPNFCDITWGAGGSTADVTLDIANR	C9:+57.04 - M1:+15.99	0,0014	
EIIQPTVVDSASFMVWK		0,002	
EGESISNIPANAVNAVTWGVFPGK		0,0015	
TALAILMNLGLIEESK	M7:+15.99	1,2E-06	
TALAILMNLGLIEESK	M7:+15.99	6,2E-08	
TALAILMNLGLIEESK		2,2E-07	
KVDAGADVIVTQLFYDTDIFLK		0,004	
823	**glutathione-disulfide reductase activity**		-54,88278961
SSFAHHGVK		0,0071	
ALLHSSHMYHEAK	M8:+15.99	0,0046	
AIDDAEGMVK	M8:+15.99	0,001	
AIDDAEGMVK	M8:+15.99	0,0024	
TCHAHPTVSEALK	C2:+57.04	0,0032	
TCHAHPTVSEALK	C2:+57.04	0,00016	
VVGVDTSGSGVK		0,00021	
VVGVDTSGSGVK		0,0083	
NIIVATGSDVK		0,0089	
NIIVATGSDVK		0,0027	
EGHVDYDTVPGVVYTHPEVASVGK		4E-05	
EGHVDYDTVPGVVYTHPEVASVGK		0,0022	
EGHVDYDTVPGVVYTHPEVASVGK		0,00043	
GALGGTCLNVGCIPSK	C7:+57.04 - C12:+57.04	2E-05	
GALGGTCLNVGCIPSK	C7:+57.04 - C12:+57.04	3,6E-05	
FSNLEVDLPAMMSQK	M11:+15.99	0,00087	
AEEDGVACVEFIAGK	C8:+57.04	2,3E-06	
AEEDGVACVEFIAGK	C8:+57.04	0,005	
AEEDGVACVEFIAGK	C8:+57.04	4,7E-05	
VPYTAGIGLDAIGVETDKGGR		0,0026	
VPYTAGIGLDAIGVETDKGGR		0,00074	
SSAEESDVVVIGGGPGGYVAAIK	S1:+42.0	0,0063	
SSAEESDVVVIGGGPGGYVAAIK	S1:+42.0	0,00049	
VPYTAGIGLDAIGVETDK		1,7E-05	
VPYTAGIGLDAIGVETDK		0,00052	
LVSPSEVSVDLVDGGSTIVK		8E-06	
LVSPSEVSVDLVDGGSTIVK		4,7E-05	
LVVIGAGYIGLEMGSVWNR	M13:+15.99	0,00056	
LVVIGAGYIGLEMGSVWNR	M13:+15.99	0,0065	
829	**Acetohydroxyacid synthase**		-90,47877502

	SPVITNHLFR		0,00085	
	SPVITNHLFR		0,0049	
	SPVITNHLFR		0,0069	
	RPILYVGGGCAASGEELR	C10:+57.04	0,00047	
	RPILYVGGGCAASGEELR	C10:+57.04	0,0017	
	AQQGLDFGPWHK		0,0033	
	PGPVLVDIPK		0,00091	
	IVHIDIDPAEIGK		7,5E-05	
	IVHIDIDPAEIGK		0,00051	
	AASPAATSVAPPATALRPWGPSEPR		0,0026	
	GEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYK	M14:+15.99	0,0077	
	GEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYK	M14:+15.99	0,0029	
	GEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYK		0,00063	
	GEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYK		0,001	
	MIGTDAFQETPIVEVTR	M1:+15.99	0,0035	
	MIGTDAFQETPIVEVTR	M1:+15.99	1,8E-06	
	MIGTDAFQETPIVEVTR	M1:+15.99	0,00015	
	HNYLVLDVEDIPR		1E-04	
	HNYLVLDVEDIPR		5,1E-05	
	VIQEAFFLASSGR		0,00097	
	PGPVLVDIPK		0,00027	
	VIQEAFFLASSGR		6,6E-06	
	GEAIIATGVGQHQMWAAQYYTYK		0,0026	
	VIQEAFFLASSGR		7,3E-05	
1021	**Alpha tubulin-3A**			-237,7520752
	PPSVVPGGDLAK		0,0084	
	PPSVVPGGDLAK		0,0074	
	INYQPPGVVPGGDLAK		0,00011	
	INYQPPGVVPGGDLAK		0,00027	
	CGINYQPPGVVPGGDLAK	C1:+57.04	2,1E-05	
	CGINYQPPGVVPGGDLAK	C1:+57.04	6,3E-06	
	GINYQPPGVVPGGDLAK		0,003	
	CGINYQPPSVVPGGDLAK	C1:+57.04	0,0035	
	CGINYQPPSVVPGGDLAK	C1:+57.04	0,00015	
	INYQPPSVVPGGDLAK		0,0034	
	GINYQPPGVVPGGDLAK		0,0066	
	CGINYQPPSVVPGGDLAK	C1:+57.04	0,0053	
	CGINYQPPSVVPGGDLAK	C1:+57.04	0,0016	
	CGINYQPPSVVPGGDLAK	C1:+57.04	9,2E-07	
	CGINYQPPSVVPGGDLAK	C1:+57.04	8,7E-06	
	CGINYQPPGVVPGGDLAK	C1:+57.04	0,0024	
	CGINYQPPGVVPGGDLAK	C1:+57.04	0,0043	
	CGINYQPPGVVPGGDLAK	C1:+57.04	1E-04	
	CGINYQPPGVVPGGDLAK	C1:+57.04	0,00013	
	CGINYQPPGVVPGGDLAK	C1:+57.04	0,00027	
	CGINYQPPSVVPGGDLAK	C1:+57.04 - C1:-17.02655	0,0024	
	NSVLSTHSLLEHTDVSILLDNEAIYDICR	C28:+57.04	2,3E-05	
	NSVLSTHSLLEHTDVSILLDNEAIYDICR	C28:+57.04	4,8E-06	
	NSVLSTHSLLEHTDVAVLLDNEAIYDICR	C28:+57.04	0,00015	
	NSVLSTHSLLEHTDVSILLDNEAIYDICR	C28:+57.04	2,4E-05	
	NSVLSTHSLLEHTDVAVLLDNEAIYDICR	C28:+57.04	0,0021	
	SLLEHTDVSILLDNEAIYDICR	C21:+57.04	0,00048	
	SVLSTHSLLEHTDVAVLLDNEAIYDICR	C27:+57.04	0,00031	
	SLLEHTDVAVLLDNEAIYDICR	C21:+57.04	1,4E-09	
	SLLEHTDVAVLLDNEAIYDICR	C21:+57.04	3,8E-05	
	NSVLSTHSLLEHTDVAVLLDNEAIYDICR	C28:+57.04	1,1E-05	
	SLLEHTDVSILLDNEAIYDICR	C21:+57.04	0,0083	
1032	**Glutathione-disulfide reductase activity**			-98,4450531
	QAVADHANNLASK		0,007	
	QAVADHANNLASK		0,0028	
	QAVADHANNLASK	Q1:-17.02655	4,1E-05	
	QAVADHANNLASK	Q1:-17.02655	0,0083	
	QAVADHANNLASK	Q1:-17.02655	0,00099	
	QAVADHANNLASK		0,00091	

ALAENEGDGIAK		0,0028
ALAENEGDGIAK		0,00032
ALAENEGDGIAK		0,00023
VNSGVSHSVNEPVA		0,0073
VNSGVSHSVNEPVAA		0,0039
VNSGVSHSVNEPVAA		0,0014
QAVADHANNLASK		0,0037
ALAENEGDGIAK		0,0029
ALAENEGDGIAK		0,00075
ALAENEGDGIAK		0,0029
TVFTSDHALK		0,0097
KIDYHTGVFASK		6,5E-06
KIDYHTGVFASK		0,0033
KIDYHTGVFASK		0,00015
GAALHAVEEGLK		0,00031
GAALHAVEEGLK		0,0036
AGVGGHGAALHAVEEGLK		0,004
TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	0,00082
TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	1,1E-06
TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	4,2E-07
TAIIEGDVVGGTCVNRG	C13:+57.04	0,0025
TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	0,00014
TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	7,6E-06
GLGLENINVVTQR		0,0013
TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	0,0046
TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	0,00011
DHILNHLSIPAACFTHPEISMVGLTEPQAR	C13:+57.04 - M21:+15.99	0,0033
TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	0,0093
KPVLIELIDAK		0,0016
KPVLIELIDAK		0,0037
DHILNHLSIPAACFTHPEISMVGLTEPQAR	C13:+57.04 - M21:+15.99	9,6E-05
NIIIATGSVPFVPK		5,8E-06
NIIIATGSVPFVPK		3,7E-05
APFTNGLGLENINVVTQR		0,00031
APFTNGLGLENINVVTQR		0,00018
DGKPVLIELIDAK		4E-06
DHILNHLSIPAACFTHPEISMVGLTEPQAR	C13:+57.04	0,00067
DGKPVLIELIDAK		1,8E-06
DHILNHLSIPAACFTHPEISMVGLTEPQAR	C13:+57.04	0,00012
MQVTDADGNVVPNLFCIGDANGK	C16:+57.04 - M1:+15.99	0,00096
MQVTDADGNVVPNLFCIGDANGK	C16:+57.04 - M1:+15.99	1,8E-05
PVLIELIDAK		0,0048
PVLIELIDAK		0,0021
DGKPVLIELIDAK		9,9E-06
MQVTDADGNVVPNLFCIGDANGK	C16:+57.04 - M1:+15.99	2,6E-07
MQVTDADGNVVPNLFCIGDANGK	C16:+57.04	0,0059
MQVTDADGNVVPNLFCIGDANGK	C16:+57.04	0,00018
MQVTDADGNVVPNLFCIGDANGK	C16:+57.04	1,2E-05
DGKPVLIELIDAK		4,9E-06
NIIIATGSVPFVPK		5,9E-06
NIIIATGSVPFVPK		0,00013
GFDYDLVIIGAGVGGHGAALHAVEEGLK		4E-07
DGKPVLIELIDAK		0,00022
GGFDYDLVIIGAGVGGHGAALHAVEEGLK		0,00075
IGAGVGGHGAALHAVEEGLK		0,0011
GGFDYDLVIIGAGVGGHGAALHAVEEGLK		0,0017
IGAGVGGHGAALHAVEEGLK		0,0004
ETLEVDAALIATGR		0,00051
ETLEVDAALIATGR		4,1E-05
ETLEVDAALIATGR		0,0058
GAGVGGHGAALHAVEEGLK		1E-05
GAGVGGHGAALHAVEEGLK		0,002
NIIIATGSVPFVPK		0,00018
NIIIATGSVPFVPK		0,00028

	DGKPVLIELIDAK		0,0013	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		0,00031	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		0,0017	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		0,00099	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		0,0006	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		9,2E-07	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		4,5E-08	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		0,0004	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		0,00089	
	ETLEVDAALIATGR		0,00084	
	ETLEVDAALIATGR		0,0029	
	NIIIATGSVPFVPK		0,00034	
	NIIIATGSVPFVPK		0,00028	
	LAVHAHPTLSEVLDELFK		0,0065	
	NIIIATGSVPFVPK		0,00044	
	NIIIATGSVPFVPK		6,3E-06	
	ETLEVDAALIATGR		0,0012	
	ETLEVDAALIATGR		0,0052	
	ETLEVDAALIATGR		0,0063	
	ETLEVDAALIATGR		0,00031	
	NIIIATGSVPFVPK		0,002	
	TAIIEGDVVGGTCVNR	C13:+57.04	0,0078	
1083		**hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism**		-105,7001038
	GRDHTVSATHGDMDQNTR	M13:+15.99	0,0054	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	6E-07	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	0,0025	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	1,2E-05	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	0,0028	
	GRDHTVSATHGDMDQNTR		0,0088	
	GRDHTVSATHGDMDQNTR		0,0034	
	DHTVSATHGDMDQNTR		6,4E-09	
	DHTVSATHGDMDQNTR		1,5E-07	
	VHACVGGTSVR	C4:+57.04	3,3E-05	
	VHACVGGTSVR	C4:+57.04	5,8E-06	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	3,5E-06	
	VHACVGGTSVR	C4:+57.04	0,00025	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	0,0017	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	0,0008	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	0,0069	
	DHTVSATHGDMDQNTR	M11:+15.99	0,0034	
	VHACVGGTSVR	C4:+57.04	1,1E-05	
	MAPEGSQFDAK	M1:+15.99	0,00091	
	VHACVGGTSVR	C4:+57.04	3,4E-05	
	AGMAPEGSQFDAK	M3:+15.99 - A1:+42.01057	0,0012	
	AGMAPEGSQFDAK	M3:+15.99 - A1:+42.01057	0,0057	
	ILASGVHVVVGTPGR		9,3E-05	
	ILASGVHVVVGTPGR		1,7E-05	
	ASGVHVVVGTPGR		0,0041	
	ASGVHVVVGTPGR		0,00026	
	AGMAPEGSQFDAK	M3:+15.99 - A1:+42.01057	0,0023	
	SATMPPEALEITR	M4:+15.99	0,0089	
	SATMPPEALEITR	M4:+15.99	0,00047	
	AGMAPEGSQFDAK	M3:+15.99 - A1:+42.01057	0,00011	
	AGMAPEGSQFDAK	M3:+15.99 - A1:+42.01057	0,0042	
	AGMAPEGSQFDAK	A1:+42.01057	6,8E-05	
	GIYAYGFEKPSAIQQR		0,00011	
	GIYAYGFEKPSAIQQR		1,7E-05	
	KGVAINFVTR		0,0015	
	KGVAINFVTR		0,0022	
	GFEKPSAIQQR		0,0028	
	GFEKPSAIQQR		0,0041	
	ILASGVHVVVGTPGR		5,7E-06	
	ILASGVHVVVGTPGR		3,3E-05	
	GIYAYGFEKPSAIQQR		0,00037	

GFEKPSAIQQR		0,0063
QFYVNVEKEEWK		0,0017
GIYAYGFEK		0,0072
QFYVNVEKEEWK		0,00014
QFYVNVEKEEWK		7,2E-05
GIYAYGFEK		0,0045
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	0,0057
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	8,7E-07
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	9,7E-06
ILASGVHVVVGTPGR		0,00052
AGMAPEGSQFDAK	M3:+15.99 - A1:+42.01057	7,4E-06
QFYVNVEKEEWK		0,00043
GIYAYGFEKPSAIQQR		0,00079
QFYVNVEKEEWK		0,0025
QFYVNVEKEEWK		0,00013
GLDVIQQAQSGTGK		0,00074
ILASGVHVVVGTPGR		6,8E-05
GIYAYGFEKPSAIQQR		0,0045
MFVLDEADEMLSR	M10:+15.99	3,4E-05
MFVLDEADEMLSR	M10:+15.99	2E-05
MFVLDEADEMLSRG	M1:+15.99	0,0086
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	0,00041
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	2,2E-05
VLITTDLLAR		0,0026
ILASGVHVVVGTPGR		2,2E-05
ILASGVHVVVGTPGR		6E-07
KIQVGVFSATMPPEALEITR	M11:+15.99	5,2E-05
GLDVIQQAQSGTGK		0,0021
GLDVIQQAQSGTGK		1E-04
MFVLDEADEMLSR	M10:+15.99	1,4E-05
MFVLDEADEMLSR	M10:+15.99	2,4E-05
MFVLDEADEMLSR	M10:+15.99	2,4E-05
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	0,00022
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	9,1E-05
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	7E-05
VLITTDLLAR		0,0037
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99	1,2E-05
IQVGVFSATMPPEALEITR	M10:+15.99	0,00026
IQVGVFSATMPPEALEITR	M10:+15.99	0,00039
ILASGVHVVVGTPGR		0,0013
ILASGVHVVVGTPGR		0,00061
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR		0,0042
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	2,6E-05
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR		6,2E-05
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	4,3E-05
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	1,3E-05
VLITTDLLAR		0,0093
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99 - M10:+15.99	1,8E-06
MFVLDEADEMLSR	M1:+15.99	0,0005
INYDLPTQPENYLHR		0,0053
IQVGVFSATMPPEALEITR		2,8E-05
MFVLDEADEMLSR	M10:+15.99	8,1E-06
IQVGVFSATMPPEALEITR	M10:+15.99	0,00026
IQVGVFSATMPPEALEITR	M10:+15.99	1E-04
VINYDLPTQPENYLHR		0,0025
IQVGVFSATMPPEALEITR	M10:+15.99	5,1E-07
IQVGVFSATMPPEALEITR		5,7E-05
MFVLDEADEMLSR		1,8E-05
MFVLDEADEMLSR		0,00079
MFVLDEADEMLSR		4,1E-06
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR		5,5E-05
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR		0,0016
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR		0,0088
IQVGVFSATMPPEALEITR	M10:+15.99	2,3E-05

IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,00024
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	1,1E-05
GFKDQIYDIFQLLPGK			0,0022
GFKDQIYDIFQLLPGK			0,0022
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,00013
GFKDQIYDIFQLLPGK			0,0016
DQIYDIFQLLPGK			0,0041
GFKDQIYDIFQLLPGK			0,0079
DQIYDIFQLLPGK			0,00024
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR			0,0004
MFVLDEADEMLSR		M1:+15.99 - M10:+15.99	7,8E-05
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR			0,001
VLITTDLLAR			0,0056
DQIYDIFQLLPGK			0,0042
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,0016
TATFCSGILQQLDYGLVECQALVLAPTR		C5:+57.04 - C19:+57.04	0,00012
DQIYDIFQLLPGK			0,00012
FYNVVIEELPANVADLL			0,0034
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR			0,0005
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,00049
MFVLDEADEMLSR		M1:+15.99	0,0017
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,001
MFVLDEADEMLSR		M1:+15.99 - M10:+15.99	0,0022
GFKDQIYDIFQLLPGK			0,00015
VLITTDLLAR			0,0055
VLITTDLLAR			0,0068
GFKDQIYDIFQLLPGK			0,0021
FYNVVIEELPANVADLL			0,0014
DQIYDIFQLLPGK			0,00019
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,0014
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,0025
MFVLDEADEMLSR		M1:+15.99 - M10:+15.99	5,3E-05
GLDVIQQAQSGTGK			0,0065
FYNVVIEELPANVADLL			0,00024
VLITTDLLAR			0,0097
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,001
VLITTDLLAR			0,0039
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,00073
IQVGVFSATMPPEALEITR		M10:+15.99	0,00019
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR			0,00064
GIDVQQVSLVINYDLPTQPENYLHR			0,0034
LDTLCDLYETLAITQSVIFVNTR		C5:+57.04	0,0071
1134	**Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit, chloroplastic amyloplastic**		-55,06058884
VPIGVGENTK			0,0014
VPIGVGENTK			0,0023
NAMMMGADSYETEDEISR		M3:+15.99 - M4:+15.99 - M5:+15.99	3,5E-08
NAMMMGADSYETEDEISR		M3:+15.99 - M4:+15.99 - M5:+15.99	4,1E-07
HVDDNADITLSCAPVGESR		C12:+57.04	0,00063
HVDDNADITLSCAPVGESR		C12:+57.04	0,00051
HVDDNADITLSCAPVGESR		C12:+57.04	9,4E-07
HVDDNADITLSCAPVGESR		C12:+57.04	0,00044
HVDDNADITLSCAPVGESR		C12:+57.04	6,6E-10
HVDDNADITLSCAPVGESR		C12:+57.04	2,7E-12
HVDDNADITLSCAPVGESR		C12:+57.04	2,9E-05
IKEAIISHGCFLR		C10:+57.04	0,0016
IFVMTQFNSASLNR		M4:+15.99	0,005
LIDIPMSNCFNSGINK		C9:+57.04 - M6:+15.99	0,00029
LIDIPMSNCFNSGINK		C9:+57.04 - M6:+15.99	0,00059
LIDIPMSNCFNSGINK		C9:+57.04 - M6:+15.99	0,00081
SFFDANMALCEQPPK		C10:+57.04 - M7:+15.99	0,00077
SFFDANMALCEQPPK		C10:+57.04 - M7:+15.99	2,2E-05
YAELHDFGSEILPR			0,0018
GPAATGAQCVLTSDASPADTLVLR		C9:+57.04	5,3E-08
GPAATGAQCVLTSDASPADTLVLR		C9:+57.04	8,4E-06

	YPYIASMGVYVFK	M7:+15.99	0,0058
	GPAATGAQCVLTSDASPADTLVLR	C9:+57.04	2E-07
	YPYIASMGVYVFK	M7:+15.99	0,00017
	GPAATGAQCVLTSDASPADTLVLR	C9:+57.04	1,2E-05
	VDTSFLNFAIDDPAK		0,00022
	VDTSFLNFAIDDPAK		1,3E-05
	ALHDHNVQAYVFTDYWEDIGTIR		1,1E-05
	ALHDHNVQAYVFTDYWEDIGTIR		4,3E-05
	VDTSFLNFAIDDPAK		0,00087
	NYADPNEVAAVILGGGTGTQLFPLTSTR		0,00011
1173	**Putative PDI-like protein**		-40,59753418
	QVGVGGYGYPAMVALNVK	M12:+15.99	0,00015
	GNLPLEGAPTVVESEPWDGK		4,3E-06
	GNLPLEGAPTVVESEPWDGK		0,00036
	LYSAGSPVLQLNPNNFK		0,0017
	LYSAGSPVLQLNPNNFK		0,0017
	DVEPIVNFALSQVK		0,00098
	SPYSFVWAGAGK		0,0096
	SPYSFVWAGAGK		0,0012
	QVGVGGYGYPAMVALNVK		5,4E-05
	QVGVGGYGYPAMVALNVK		1,5E-05
	YLELLLSVAEK		0,0026
	YLELLLSVAEK		0,0074
	GNLPLEGAPTVVESEPWDGKDGEVIEEDEFSLE		0,00084
	VEGFPTILVFGADKESPFPYQGAR		0,0063
1178	**Mitochondrial translation elongation factor Tu**		-152,0831604
	PGSITPHTK		0,0036
	PGSITPHTK		0,00084
	PGSITPHTK		0,0023
	HYAHVDCPGH	C7:+57.04	0,00021
	HYAHVDCPGHAD	C7:+57.04	0,00022
	HYAHVDCPGHAD	C7:+57.04	0,00012
	IGTIGHVDHGK		0,00095
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	0,0039
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	3,6E-05
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	0,00038
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	1,1E-05
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	1,6E-05
	PGSITPHTK		0,0083
	PGSITPHTK		0,0072
	KPHVNIGTIGHVDHGK		0,0036
	GMVLAKPGSITPHTK	M2:+15.99	0,0056
	GMVLAKPGSITPHTK	M2:+15.99	0,00069
	KYDEIDAAPEER		0,0045
	GMVLAKPGSITPHTK	M2:+15.99	0,00058
	GMVLAKPGSITPHTK	M2:+15.99	0,0015
	TATVEYETETR		0,0022
	KYDEIDAAPEER		0,0049
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	0,0021
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	0,001
	VNIGTIGHVDHGK		0,004
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	0,0012
	HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	0,00034
	TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK	M12:+15.99	0,00085
	GMVLAKPGSITPH	M2:+15.99	0,00098
	TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK	M12:+15.99	0,0043
	GMVLAKPGSITPHTK		4,6E-05
	GMVLAKPGSITPHTK		3,6E-05
	KYDEIDAAPEER		6,1E-05
	TTDVTGNVTNIMNDK	M12:+15.99	2,5E-06
	TTDVTGNVTNIMNDK	M12:+15.99	2,6E-05
	TTDVTGNVTNIMNDKD	M12:+15.99	8,2E-05
	KYDEIDAAPEER		0,0066
	TTDVTGNVTNIMNDKD	M12:+15.99	0,00082

KYDEIDAAPEER		0,00046
TTDVTGNVTNIMNDKDE	M12:+15.99	0,002
TTDVTGNVTNIMNDKDEE	M12:+15.99	0,00038
HYAHVDCPGHADYVK	C7:+57.04	0,0086
TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK	M12:+15.99	0,0088
TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK	M12:+15.99	0,0047
TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK	M12:+15.99	5,1E-06
TTDVTGNVTNIMND	M12:+15.99	0,00012
TTDVTGNVTNIMND	M12:+15.99	0,0053
NATVTGVEMFQK	M9:+15.99	0,00011
NATVTGVEMFQK	M9:+15.99	0,00061
TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK		5,6E-06
KYDEIDAAPEER		0,0024
TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK		1,5E-05
KYDEIDAAPEER		0,0062
GAILVVSGADGPMPQTK	M13:+15.99	1,3E-05
AILVVSGADGPMPQTK	M12:+15.99	0,0015
GAILVVSGADGPMPQTK	M13:+15.99	1,8E-06
TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK	M12:+15.99	0,0028
TTDVTGNVTNIMNDK		4,5E-07
TTDVTGNVTNIMNDK		0,00013
TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK	M12:+15.99	0,00061
NATVTGVEMFQK	M9:+15.99	0,0025
NATVTGVEMFQK	M9:+15.99	0,0032
TTDVTGNVTNIMNDKDEEAK	M12:+15.99	0,0026
NATVTGVEMFQK		0,00058
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	0,0035
NATVTGVEMFQK	M9:+15.99	0,00032
MVVELIQPVACEQGMR	C11:+57.04 - M1:+15.99 - M15:+15.99	0,0014
MVVELIQPVACEQGMR	C11:+57.04 - M1:+15.99 - M15:+15.99	0,0026
NMITGAAQMDGAILVVSGADGPMPQTK	M2:+15.99 - M9:+15.99 - M23:+15.99	0,003
NATVTGVEMFQK		0,0027
NATVTGVEMFQK		0,0011
NMITGAAQMDGAILVVSGADGPMPQTK	M2:+15.99 - M9:+15.99 - M23:+15.99	0,00013
GITINTATVEYETETR		0,0026
VGDPVDLVGIR		0,0065
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	0,00033
VGDPVDLVGIR		0,0041
TKFEAVVYVLK		0,0061
TKFEAVVYVLK		0,0016
GITINTATVEYETETR		0,0073
GITINTATVEYETETR		1,3E-06
GITINTATVEYETETR		7,2E-06
NATVTGVEMFQK		0,00094
GITINTATVEYETETR		8,8E-07
ALEALMATPGIK		0,0047
ALEALMATPGIK		0,0024
ALEALMATPGIK		0,0014
NMITGAAQMDGAILVVSGADGPMPQTK	M2:+15.99 - M9:+15.99	0,00046
NMITGAAQMDGAILVVSGADGPMPQTK	M2:+15.99 - M9:+15.99 - M23:+15.99	0,0011
FEAVVYVLK		0,0061
NMITGAAQMDGAILVVSGADGPMPQTK	M2:+15.99 - M23:+15.99	0,0096
AIAGDNVGLLLR		0,0086
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	4,8E-05
AIAGDNVGLLLR		0,0031
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	0,00048
MVVELIQPVACEQGMR	C11:+57.04	0,0012
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	9,6E-05
MVVELIQPVACEQGMR	C11:+57.04	0,0054
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	4,2E-05
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	7,3E-05
VGDPVDLVGIR		0,0014
VGDPVDLVGIR		0,0062
MVVELIQPVACEQGMR	C11:+57.04	0,0042

MVVELIQPVACEQGMR	C11:+57.04	0,0011
FEAVVYVLK		0,0022
GITINTATVEYETETR		1,4E-05
FEAVVYVLK		0,0013
GITINTATVEYETETR		0,00058
FEAVVYVLK		0,001
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	6,7E-07
TMDDAIAGDNVGLLLR		1,5E-05
TMDDAIAGDNVGLLLR		0,00013
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	0,00085
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	0,0019
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	1,8E-05
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	4,1E-07
VGDPVDLVGIR		0,0026
VGDPVDLVGIR		0,0047
VGDPVDLVGIR		0,00071
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	4,5E-06
VGDPVDLVGIR		0,0014
NMITGAAQMDGAILVVSGADGPMPQTK	M23:+15.99	0,0028
NMITGAAQMDGAILVVSGADGPMPQTK		0,0073
NMITGAAQMDGAILVVSGADGPMPQTK	M2:+15.99 - M9:+15.99 - M23:+15.99	0,0045
GITINTATVEYETETR		1E-05
GITINTATVEYETETR		7,7E-05
FEAVVYVLK		0,0022
FEAVVYVLK		0,0063
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	1,2E-05
VGDPVDLVGIR		0,0019
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	0,00015
VGDPVDLVGIR		0,0016
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	0,0025
KDQVDDEELLELVDLEVR		0,0029
KDQVDDEELLELVDLEVR		0,0026
QVGVPSIVVFLNK		0,0024
DQVDDEELLELVDLEVR		0,00043
KDQVDDEELLELVDLEVR		8,7E-05
DQVDDEELLELVDLEVR		0,0021
FEAVVYVLK		0,0022
DQVDDEELLELVDLEVR		0,00031
DQVDDEELLELVDLEVR		0,0024
DQVDDEELLELVDLEVR		0,0058
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	2,8E-07
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	4,1E-07
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	0,00017
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	2E-06
QVGVPSIVVFLNK	Q1:-17.02655	0,0037
QVGVPSIVVFLNK	Q1:-17.02655	0,00071
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	1E-05
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	2,2E-05
ALEALMATPGIK	M6:+15.99	0,002
DQVDDEELLELVDLEVR		0,00037
DQVDDEELLELVDLEVR		0,00031
DQVDDEELLELVDLEVR		4E-05
KDQVDDEELLELVDLEVR		0,0022
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		3,1E-05
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		8,7E-05
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		2,6E-07
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		8,9E-05
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		4,2E-06
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	4,2E-06
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	1,6E-06
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	5,8E-06
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	3,7E-05
DQVDDEELLELVDLEVR		0,00026
DQVDDEELLELVDLEVR		0,0004

TTLTAALTMVLASVGGSAPK		1,4E-06	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	3,1E-06	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	0,00022	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	0,00016	
LPFLLAVEDVFSITGR		2,4E-05	
LPFLLAVEDVFSITGR		0,00012	
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	4,2E-05	
DQVDDEELLELVDLEVR		5,6E-05	
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	8,8E-05	
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	0,00018	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		3,5E-06	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		1,9E-07	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		1,1E-05	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		1,9E-06	
DQVDDEELLELVDLEVR		0,00015	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	0,0066	
VGDPVDLVGIR		0,008	
LPFLLAVEDVFSITGR		3,1E-05	
VGDPVDLVGIR		0,0065	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		7,8E-05	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		5,3E-06	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		2,5E-06	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		0,00024	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		0,0013	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		0,00018	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		2,5E-05	
TDLPFLLAVEDVFSITGR		6,1E-07	
DQVDDEELLELVDLEVR		1,4E-06	
TDLPFLLAVEDVFSITGR		8,7E-07	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	0,0002	
DQVDDEELLELVDLEVR		0,00038	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	4,2E-06	
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	9,9E-05	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK	M9:+15.99	0,00021	
TTLTAALTMVLASVGG		0,0032	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR	Q1:-17.02655	9,6E-06	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR	Q1:-17.02655	1,6E-08	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR	Q1:-17.02655	1,8E-06	
TMDDAIAGDNVGLLLR	M2:+15.99	2,7E-05	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		0,0063	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		1,8E-06	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		1,5E-05	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		0,0024	
TTLTAALTMVLASVGGSAPK		2,3E-05	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		4,7E-07	
QTDLPFLLAVEDVFSITGR		0,0095	
1222	**ATP-dependent 5'-3' DNA helicase activity**		-55,2135849
GEYDESGPAIVHR		5,1E-06	
GEYDESGPAIVHR		1,7E-06	
DEYDESGPAIVHR		1E-04	
DEYDESGPAIVHR		0,0021	
GEYDESGPAIVH		0,00028	
GEYDESGPAIVH		1,6E-06	
GYSFTTTAER		0,0091	
IWHHTFYNELR		0,0056	
1392	**Low molecular weight glutenin subunit**		-42,71300507
SQMLQQSSCHVMQQQ	C9:+57.04 - M3:+15.99 - M12:+15.99	0,007	
SQMLQQSSCHVMQQQC	C9:+57.04 - C16:+57.04 - M3:+15.99 - M12:+15.99	0,00052	
SQMLQQSSCHVMQQQC	C9:+57.04 - C16:+57.04 - M3:+15.99 - M12:+15.99	0,0021	
SQMLQQSSCHVMQQQ	C9:+57.04 - M12:+15.99	0,0063	
SQMLQQSSCHVMQQQ	C9:+57.04 - M12:+15.99	0,0073	
SQMLQQSSCHVMQQQ	C9:+57.04 - M12:+15.99	0,0038	
PVAMPQSLAR	M4:+15.99	0,0042	
SPVAMPQSLAR	M5:+15.99	0,0067	

	GSIQTQQQQPQQLGQ		0,007
	GSIQTQQQQPQQLGQ		0,002
	CSPVAMPQSLAR	C1:+57.04 - M6:+15.99	0,0075
	PSQQQPLPPQQTLSH		0,0028
	SIVLQEQQQVR		0,0041
	CSPVAMPQSLAR	C1:+57.04	0,0049
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0027
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0017
	VFLQQQCSPVAMPQ	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,00031
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04 - M12:+15.99	3,3E-05
	VHPSILQQLNPCK	C12:+57.04	0,0027
	VHPSILQQLNPCK	C12:+57.04	0,0015
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,00096
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04	0,00036
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04	4,4E-05
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04	0,00023
	QIAQLEVMTSIALR	M8:+15.99	7,2E-07
	QIAQLEVMTSIALR	M8:+15.99	4,1E-06
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04	0,0017
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0028
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04	0,0094
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0009
	QIAQLEVMTSIALR	M8:+15.99	7,4E-06
	QIAQLEVMTSIALR	M8:+15.99	4,1E-06
	QIAQLEVMTSIALR	M8:+15.99	0,00022
	QIAQLEVMTSIALR	M8:+15.99	0,0084
	VFLQQQCSPVAMPQSLAR	C7:+57.04	0,00015
	GTFLQPHQIAQLEVMTSIALR	M15:+15.99	0,0082
	AIIYSIVLQEQQQVR		0,0006
	QIAQLEVMTSIALR		2,3E-05
	QIAQLEVMTSIALR		4,1E-07
	AIIYSIVLQEQQQVR		0,0096
	QIAQLEVMTSIALR	M8:+15.99	0,0012
1474	**Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**		-44,22797775
	KVVISAPSK		0,0099
	YDTVHGHWK		0,0061
	YDTVHGHWK		0,0019
	VPTVDVSVVDLTVR		0,00011
	VPTVDVSVVDLTVR		0,0021
	LVSWYDNEWGYSNR		7,1E-06
	LVSWYDNEWGYSNR		2,8E-05
	DAPMFVVGVNEDKYTSDVNIVSNASCTTNCLAPLAK	C26:+57.04 - C30:+57.04 - M4:+15.99	0,00013
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,00069
	DAPMFVVGVNEDKYTSDVNIVSNASCTTNCLAPLAK	C26:+57.04 - C30:+57.04 - M4:+15.99	0,0087
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,0032
	VPTVDVSVVDLTVR		7,9E-06
	VPTVDVSVVDLTVR		4,1E-07
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	1,2E-07
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	0,0002
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	0,00067
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	6,4E-05
	LVSWYDNEWGYSNR		2,7E-06
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,00015
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,0003
	LVSWYDNEWGYSNR		0,00027
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	8,8E-08
	LVSWYDNEWGYSNR		0,00042
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	0,00019
	VPTVDVSVVDLTVR		8,9E-06
	IINDNFGIIEGLMTTVH	M13:+15.99	8,9E-06
	NPEEIPWGEAGADYVVESTGVFTDKDK		0,0053
	IINDNFGIIEGLMTTVH	M13:+15.99	0,00017
	VPTVDVSVVDLTVR		0,001
	VPTVDVSVVDLTVR		0,00035

	TLLFGEKPVTVFGVR		0,00064
	VPTVDVSVVDLTVR		3,8E-05
	TLLFGEKPVTVF		0,0013
	VPTVDVSVVDLTVR		0,00061
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR		1,4E-05
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR		0,0009
	VALQSDDVELVAVNDPFITTEYMTYMFK	M23:+15.99 - M26:+15.99	0,0052
	VALQSDDVELVAVNDPFITTEYMTYMFK		0,0027
1478	**Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**		-200,2679443
	KVVISAPSK		0,0099
	YDTVHGHWK		0,0061
	YDTVHGHWK		0,0019
	VPTVDVSVVDLTVR		0,00011
	VPTVDVSVVDLTVR		0,0021
	LVSWYDNEWGYSNR		7,1E-06
	LVSWYDNEWGYSNR		2,8E-05
	DAPMFVVGVNEDKYTSDVNIVSNASCTTNCLAPLAK	C26:+57.04 - C30:+57.04 - M4:+15.99	0,00013
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,00069
	DAPMFVVGVNEDKYTSDVNIVSNASCTTNCLAPLAK	C26:+57.04 - C30:+57.04 - M4:+15.99	0,0087
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,0032
	VPTVDVSVVDLTVR		7,9E-06
	VPTVDVSVVDLTVR		4,1E-07
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	1,2E-07
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	0,0002
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	0,00067
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	6,4E-05
	LVSWYDNEWGYSNR		2,7E-06
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,00015
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,0003
	LVSWYDNEWGYSNR		0,00027
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	8,8E-08
	LVSWYDNEWGYSNR		0,00042
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR	M3:+15.99	0,00019
	VPTVDVSVVDLTVR		8,9E-06
	IINDNFGIIEGLMTTVH	M13:+15.99	8,9E-06
	NPEEIPWGEAGADYVVESTGVFTDKDK		0,0053
	IINDNFGIIEGLMTTVH	M13:+15.99	0,00017
	VPTVDVSVVDLTVR		0,001
	VPTVDVSVVDLTVR		0,00035
	TLLFGEKPVTVFGVR		0,00064
	VPTVDVSVVDLTVR		3,8E-05
	TLLFGEKPVTVF		0,0013
	VPTVDVSVVDLTVR		0,00061
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR		1,4E-05
	GIMGYVEEDLVSTDFVGDSR		0,0009
	VALQSDDVELVAVNDPFITTEYMTYMFK	M23:+15.99 - M26:+15.99	0,0052
	VALQSDDVELVAVNDPFITTEYMTYMFK		0,0027
1496	**dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase**		-56,22610855
	VAETLMFDYHR	M6:+15.99	0,0025
	ELINPEVTVTMTENTPDDPR	M11:+15.99	5,4E-06
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04 - M8:+15.99 - M13:+15.99	2,9E-06
	ELINPEVTVTMTENTPDD	M11:+15.99	5E-05
	ELINPEVTVTMTENTPDD	M11:+15.99	5,1E-05
	ILLTSTSEVYGD		0,0077
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	2,9E-06
	ILVTGGAGFIGSHLVDK		1E-06
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	0,00034
	ILVTGGAGFIGSHLVDK		5,4E-07
	ELINPEVTVTMTENTPDD	M11:+15.99	9,6E-05
	ELINPEVTVTMTENTPDDPR		0,00051
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	0,00038
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	0,00085
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK	M2:+15.99	0,0014
	LMENEKNEVIVADNFFTGSK		0,0002

	LMENEKNEVIVADNFFTGSK		0,00016
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04 - M8:+15.99	7,1E-05
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04 - M8:+15.99	1E-05
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04 - M8:+15.99	2,3E-07
	TNVIGTLNMLGLAK	M9:+15.99	5E-06
	TNVIGTLNMLGLAK	M9:+15.99	2,7E-05
	DGLVLMEDDFR		0,0038
	ILLTSTSEVYGDPLEHPQTEAYWGNVNPIGVR		3,6E-06
	ILLTSTSEVYGDPLEHPQTEAYWGNVNPIGVR		0,00028
	LMNGDNTGPINIGNPGEFTMLELAENVK	M2:+15.99 - M20:+15.99	1,6E-07
	LMNGDNTGPINIGNPGEFTMLELAENVK	M2:+15.99 - M20:+15.99	2,9E-05
	TNVIGTLNMLGLAK	M9:+15.99	0,0013
	TNVIGTLNMLGLAK	M9:+15.99	0,00026
	TNVIGTLNMLGLAK		1,6E-05
	TNVIGTLNMLGLAK		3,6E-05
	SFCYVADMVNGLMK	C3:+57.04	0,0055
	ILVTGGAGFIGSHLVDKLMENEKNEVIVADNFFTGSK	M19:+15.99	0,00029
1548	**Malate dehydrogenase**		-59,46192551
	KMDATAQELSEEK	M2:+15.99	0,00056
	KMDATAQELSEEK	M2:+15.99	0,00034
	AQASALEAHAAPNCK	C14:+57.04	3,9E-07
	AQASALEAHAAPNCK	C14:+57.04	1,1E-05
	MDATAQELSEEK	M1:+15.99	0,00047
	MDATAQELSEEK	M1:+15.99	0,0067
	AQASALEAHAAPNCK	C14:+57.04	0,00054
	MDATAQELSEEK		0,00026
	MDATAQELSEEK		0,00043
	MDATAQELSEEK		0,00013
	KLSSALSAASSACDHIR	C13:+57.04	7,7E-05
	KLSSALSAASSACDHIR	C13:+57.04	1,1E-05
	LSSALSAASSACDHIR	C12:+57.04	2,2E-05
	LSSALSAASSACDHIR	C12:+57.04	8,2E-05
	LSSALSAASSACDHIR	C12:+57.04	0,0053
	LGVQVSDVK		0,0097
	NAIIWGNHSSSQYPDVNHATVK		0,0016
	NAIIWGNHSSSQYPDVNHATVK		0,00014
	NAIIWGNHSSSQYPDVNHATVK		4,4E-05
	NAIIWGNHSSSQYPDVNHATVK		2,8E-05
	NAIIWGNHSSSQYPDVNHATVK		0,0017
	NAIIWGNHSSSQYPDVNHATVK		6,9E-05
	LSSALSAASSACDHIR	C12:+57.04	0,0058
	LGVQVSDVK		0,0069
	NAIIWGNHSSSQYPDVNHATVK		0,0056
	LGVQVSDVK		0,0079
	GVMLGADQPVILH	M3:+15.99	0,0011
	GVMLGADQPVILH	M3:+15.99	0,00025
	VLVTGAAGQIGY		8,8E-06
	VLVVANPANTNALILK		1,3E-05
	VLVVANPANTNALILK		0,00038
	VLVVANPANTNALILK		3,1E-05
	VLVTGAAGQIGYALVPMIAR	M17:+15.99	0,0087
	VLVTGAAGQIGYALVPMIAR	M17:+15.99	2,6E-05
	VLVTGAAGQIGYALVPMIAR	M17:+15.99	0,00075
	VLVTGAAGQIGYALVPMIAR	M17:+15.99	0,00049
	VLVVANPANTNALILK		0,0069
	ELVQDDEWLNGEFIATVQQR		0,00047
	ELVQDDEWLNGEFIATVQQR		4E-05
	VLVVANPANTNALILK		0,001
	ELVQDDEWLNGEFIATVQQR		0,0028
	ELVQDDEWLNGEFIATVQQR		2,3E-05
	ELVQDDEWLNGEFIATVQQR		1,2E-05
	SGGEWTIVQGLPIDEFSR		0,00032
	SGGEWTIVQGLPIDEFSR		0,0028
	VLVTGAAGQIGYALVPMIAR		0,0027

VLVTGAAGQIGYALVPMIAR	M17:+15.99	0,0059	
ELVQDDEWLNGEFIATVQQR		0,0084	
MELIDAAFPLLK		0,0081	
MELIDAAFPLLK		0,0015	
1549	**Aestivum stearoyl-ACP desaturase**		-46,52961349
VPELTGLSGEGHK		0,00094	
VPELTGLSGEGHK		0,0015	
VPELTGLSGEGHK		0,0013	
LAQICGIIASDEKR	C5:+57.04	9,6E-06	
LAQICGIIASDEKR	C5:+57.04	6,1E-06	
DNLLLHLKPVEK		0,0051	
WKVPELTGLSGEGHK		0,0022	
WKVPELTGLSGEGHK		0,00094	
LAQICGIIASDEK	C5:+57.04	5,9E-06	
WKVPELTGLSGEGHK		0,0087	
AQDYLCTLAGR	C6:+57.04	0,0058	
TIQYLIGSGMDPR		0,00071	
TIQYLIGSGMDPR		0,00086	
DETGASPTAWAVWTR		8,8E-07	
DETGASPTAWAVWTR		0,0015	
DETGASPTAWAVWTR		0,0019	
LFEIDPDGTVLALADMMR	M16:+15.99 - M17:+15.99	0,00013	
LFEIDPDGTVLALADMMR	M16:+15.99 - M17:+15.99	8,5E-05	
LFEIDPDGTVLALADMMR	M16:+15.99 - M17:+15.99	1,2E-07	
LFEIDPDGTVLALADMMR	M16:+15.99 - M17:+15.99	3,3E-06	
TENNPYLGFIYTSFQER		0,00025	
LFEIDPDGTVLALADMMR	M16:+15.99	2E-05	
LFEIDPDGTVLALADMMR	M16:+15.99	1,2E-05	
DYADILEFLVGR		5E-05	
DYADILEFLVGR		0,00019	
LFEIDPDGTVLALADMMR		2,9E-05	
LFEIDPDGTVLALADMMR		5,6E-06	
DYADILEFLVGR		0,0031	
DYADILEFLVGR		0,00015	
DYADILEFLVGR		9,6E-06	
1728	Uncharacterized protein		-43,15936279
KPSSLPEVAK		0,0036	
MKEMTGSGIFAEK	M1:+15.99 - M4:+15.99	6,2E-06	
MKEMTGSGIFAEK	M1:+15.99 - M4:+15.99	0,00061	
MKEMTGSGIFAEK	M1:+15.99 - M4:+15.99	0,00053	
MKEMTGSGIFAEK	M1:+15.99 - M4:+15.99	0,00012	
LKEMSGNDIFSDGK	M4:+15.99	0,0067	
LKEMSGNDIFSDGK	M4:+15.99	0,0032	
MKEMTGSGIFAEK	M1:+15.99 - M4:+15.99	0,00086	
MKEMTGSGIFAEK	M1:+15.99 - M4:+15.99	0,00077	
VSNPAGGPSNITFSEDPVTK		7,1E-08	
VSNPAGGPSNITFSEDPVTK		1,4E-06	
NKELSGSDIFGPPPETPARPLAAR		0,0018	
NKELSGSDIFGPPPETPARPLAAR		0,0017	
PSLKPAGGITPAMFGAPVSEHEAEDLSNSER	M13:+15.99	3,9E-05	
PAGGITPAMFGAPVSEHEAEDLSNSER	M9:+15.99	0,0071	
VSNPAGGPSNITFSED		5,8E-06	
VSNPAGGPSNITFSED		1,4E-05	
PSLKPAGGITPAMFGAPVSEHEAEDLSNSER	M13:+15.99	5,1E-06	
PAGGITPAMFGAPVSEHEAEDLSNSER	M9:+15.99	0,0011	
PAGGITPAMFGAPVSEHEAEDLSNSER	M9:+15.99	1,1E-05	
VSNPAGGPSNITFSEDPVTK		6,6E-05	
ELSGSDIFGPPPETPARPLAAR		0,0038	
ELSGSDIFGPPPETPAR		6,5E-06	
ELSGSDIFGPPPETPAR		1,5E-05	
1797	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G		-31,55516624
ADEPSASGDPLAMASK	M13:+15.99	2,2E-05	
ADEPSASGDPLAMASK	M13:+15.99	7,9E-07	
PSASGDPLAMASK	M10:+15.99	2E-05	

	ADEPSASGDPLAMASK	M13:+15.99	1,6E-06	
	GGAVLMVCR	C8:+57.04	0,0042	
	ADEPSASGDPLAMASK		7,1E-07	
	ADEPSASGDPLAMASK		2,7E-07	
	ADEPSASGDPLAMASK		1,2E-07	
	ADEPSASGDPLAMASK	M13:+15.99	1,2E-06	
	ADEPSASGDPLAMASK	M13:+15.99	0,00065	
	ADEPSASGDPLAMASK		0,0011	
	ADEPSASGDPLAMASK		0,0034	
	GFGFVNFVHREDAEK		0,0029	
	GFGFVNFVHRED		0,00067	
	LNGYGYDNLILHVEMAAPRPT	M15:+15.99	0,0066	
	GFGFVNFVHR		0,0079	
	LNGYGYDNLILHVEMAAPRPT	M15:+15.99	0,00045	
	LNGYGYDNLILHVEMAAPRPT		0,0037	
	NLILHVEMAAPRPT		0,0027	
	VTNLSEDTREPDLLELFR		0,00044	
	VTNLSEDTREPDLLELFR		0,0053	
	VTNLSEDTREPDLLELFR		0,00024	
	VTNLSEDTREPDLLELFR		0,0013	
	WGELEEDDGGDLDFLLPPR		0,00095	
	WGELEEDDGGDLDFLLPPR		8,9E-07	
	WGELEEDDGGDLDFLLPPR		7,5E-07	
	WGELEEDDGGDLDFLLPPR		7,8E-05	
	VTNLSEDTREPDLLELFR		0,00056	
	WGELEEDDGGDLDFLLPPR		0,0021	
	WGELEEDDGGDLDFLLPPR		0,0032	
1931	**Globulin 1 OS**			-35,62402725
	QEVQGGQYGSETGGGQQQGGGYHGVTVGR		4,30913E-09	
	QEVQGGQYGSETGGGQQQGGGYHGVTVGR		4,51658E-09	
	QQGEGFSGEGAQQKPQAGR		5,8675E-05	
	DYEQSmPPLGEGR	M6(Oxidation)	7,53197E-05	
	AGEGAVGVPLFHAQWGAR		0,001289213	
	AGEGAVGVPLFHAQWGAR		0,001650364	
	AGEGAVGVPLFHAQWGAR		0,00297514	
	DYEQSmPPLGEGR	M6(Oxidation)	0,004503401	
	QILEQQLTGR		0,008816916	
	QQGEGFSGEGAQQKPQAGR		0,008265816	
	DYEQSmPPLGEGR	M6(Oxidation)	0,009132714	
	DYEQSmPPLGEGR	M6(Oxidation)	0,010829054	
	QQGEGFSGEGAQQKPQAGR		0,034093797	
	AGEGAVGVPLFHAQWGAR		0,039449563	
1991	**Sugar 1 phosphate Guanyl transferase**			-35,62402725
	KFAHKDEEYDSMLGVVR	M12:+15.99	0,0011	
	KFAHKDEEYDSMLGVVR	M12:+15.99	9,2E-05	
	FAHKDEEYDSMLGVVR	M11:+15.99	0,0019	
	FAHKDEEYDSMLGVVR	M11:+15.99	0,00027	
	FAHKDEEYDSMLGVVR	M11:+15.99	0,00046	
	FAHKDEEYDSMLGVVR	M11:+15.99	6,4E-06	
	FAHKDEEYDSMLGVVR	M11:+15.99	0,0035	
	DEEYDSMLGVVR	M7:+15.99	0,00038	
	DEEYDSMLGVVR	M7:+15.99	0,00041	
	FAHKDEEYDSMLGVVR		0,00035	
	FAHKDEEYDSMLGVVR		8,2E-06	
	FAHKDEEYDSMLGVVR		2,2E-06	
	IPSGEVWVGNPAK		0,0027	
	FAHKDEEYDSMLGVVR	M11:+15.99	0,0084	
	IPSGEVWVGNPAK		0,0071	
	IPSGEVWVGNPAK		0,0025	
	DEEYDSMLGVVR		0,0039	
	IPSGEVWVGNPAK		0,0015	
	IPSGEVWVGNPAK		0,002	
	IPSGEVWVGNPAK		0,0075	
	EIPPELILPDNILPDKAPK		0,00034	

	EIPPELILPDNILPDKAPK		0,00013
	SAVLHACTIEDEAFVGMGATLLDGVVVEK	C7:+57.04 - M17:+15.99	0,0027
	TIEDEAFVGMGATLLDGVVVEK	M10:+15.99	1,5E-05
	TIEDEAFVGMGATLLDGVVVEK	M10:+15.99	7,3E-09
	TIEDEAFVGMGATLLDGVVVEK	M10:+15.99	1,3E-08
	TIEDEAFVGMGATLLDGVVVEK	M10:+15.99	0,0012
	PPELILPDNILPDK		0,0012
	CTIEDEAFVGMGATLLDGVVVEK	C1:+57.04 - C1:-17.02655	0,0067
	PPELILPDNILPDK		0,004
	EIPPELILPDNILPDKAPK	E1:-18.01056	0,0021
2034	**Sugar 1 phosphate guanyl transferase**		-21,42461777
	TVVQAQKLDEMLAK	M11:+15.99	0,0028
	TVVQAQKLDEMLAK	M11:+15.99	0,0056
	TPGVDDVSGEPLIQR		0,00051
	TPGVDDVSGEPLIQR		0,0014
	TPGVDDVSGEPLIQR		0,0014
	VPSVELMTELLR	M7:+15.99	0,0064
	EAMNKGELVSDDLVVGIIDEAMK	M3:+15.99 - M22:+15.99	0,0087
	EAMNKGELVSDDLVVGIIDEAMK	M3:+15.99 - M22:+15.99	0,0014
	VLNFAIDDAILEER		0,0007
	VLNFAIDDAILEER		0,00033
	VLNFAIDDAILEER		0,00014
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	4,7E-06
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	1,9E-06
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	2,1E-07
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	2,2E-05
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	0,0029
	VLNFAIDDAILEER		0,0026
	TVVQAQKLDEMLAK	M11:+15.99	0,0028
	TVVQAQKLDEMLAK	M11:+15.99	0,0056
	TPGVDDVSGEPLIQR		0,00051
	TPGVDDVSGEPLIQR		0,0014
	TPGVDDVSGEPLIQR		0,0014
	VPSVELMTELLR	M7:+15.99	0,0064
	EAMNKGELVSDDLVVGIIDEAMK	M3:+15.99 - M22:+15.99	0,0087
	EAMNKGELVSDDLVVGIIDEAMK	M3:+15.99 - M22:+15.99	0,0014
	VLNFAIDDAILEER		0,0007
	VLNFAIDDAILEER		0,00033
	VLNFAIDDAILEER		0,00014
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	4,7E-06
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	1,9E-06
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	2,1E-07
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	2,2E-05
	GELVSDDLVVGIIDEAMK	M17:+15.99	0,0029
	VLNFAIDDAILEER		0,0026
2064	oxidoreductase activity/NAD or NADH binding		-12,37685394
	YHLLVCGTTPCMIR	C6:+57.04 - C11:+57.04 - M12:+15.99	0,00057
	YHLLVCGTTPCMIR	C6:+57.04 - C11:+57.04 - M12:+15.99	0,00015
	YHLLVCGTTPCMIR	C6:+57.04 - C11:+57.04 - M12:+15.99	3,4E-05
	RNEVTSDGLFSVGEMECMGCCVNAPMIAVADYTK	C17:+57.04 - C20:+57.04 - C21:+57.04 - M15:+15.99 - M18:+15.99 - M26:+15.99	0,0065
	VYEVATFYSMFNR	M10:+15.99	0,00038
	VYEVATFYSMFNR	M10:+15.99	0,0039
	QSGIIPMLDLAQQQHGGWVPVAAMNAIAE	M7:+15.99 - M24:+15.99	0,005
2069	**Voltage dependent anion channel (VDAC)**		-60,93324661
	SLVTISGEVDTKAIEK		5,2E-05
	SLVTISGEVDTKAIEK		0,00047
	NESTLIFGSQHSLDPH		0,0083
	APGLYTDIGK		0,00085
	APGLYTDIGK		0,00075
	DTLTASYYHLVK		0,0017
	DTLTASYYHLVK		0,0078
	SLVTISGEVDTK		2E-05
	FNNYGMASALVQHEWR	M6:+15.99	0,0069
	FNNYGMASALVQHEWR	M6:+15.99	0,002

	FNNYGMASALVQHEWR	M6:+15.99	0,00072
	SLVTISGEVDTK		4,7E-06
	SLVTISGEVDTK		6,7E-05
	APGLYTDIGKK		0,009
	FTLTTCTPEGVAITAAGTR	C6:+57.04	0,0034
	FTLTTCTPEGVAITAAGTR	C6:+57.04	3E-05
	SLVTISGEVDTK		0,0021
	SLVTISGEVDTK		0,0018
	SLVTISGEVDTK		5,4E-05
	FNNYGMASALVQHEWR		0,00068
	FNNYGMASALVQHEWR		0,0015
	FNNYGMASALVQHEWR		0,00034
	FNNYGMASALVQHEWR		0,00065
	KNESIFGELQTQLK		0,0013
	KNESIFGELQTQLK		0,00089
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		4,5E-05
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,00028
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		5E-05
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		1E-06
	FTLTTCTPEGVAITAAGTR	C6:+57.04	4,7E-05
	FTLTTCTPEGVAITAAGTR	C6:+57.04	0,0043
	NESIFGELQTQLK		0,00063
	SLVTISGEVDTK		0,0018
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		4,4E-07
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,00014
	FTLTTCTPEGVAITAAGTR	C6:+57.04	9,6E-05
	ANSESDLLTTFTVDEFATPGLK		5,6E-07
	ANSESDLLTTFTVDEFATPGLK		9,2E-06
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,0052
	ANSESDLLTTFTVDEFATPGLK		0,00086
	ANSESDLLTTFTVDEFATPGLK		8,4E-07
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,00071
	ANSESDLLTTFTVDEFATPGLK		1,1E-06
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		5,1E-05
	ANSESDLLTTFTVDEFATPGLK		0,00076
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		3,1E-05
	ANSESDLLTTFTVDEFATPGLK		0,0003
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,0058
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,00091
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,00016
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,00052
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		0,00029
	ELSVGVDVSFDTATSNFTK		3,9E-05
2118		**laminin receptor activity**	-10,19207287
	FAQHTGANAIAGR		0,0009
	FAQHTGANAIAGR		0,002
	FAQHTGANAIAGR		0,0031
	FAQHTGANAIAGR		0,00019
	YVDIGIPANNK		0,0089
	VIVAIENPQDIIVQSAR		0,00092
	VIVAIENPQDIIVQSAR		0,00013
	VIVAIENPQDIIVQSAR		3,8E-05
	FAQHTGANAIAGR		0,0009
	FAQHTGANAIAGR		0,002
	FAQHTGANAIAGR		0,0031
	FAQHTGANAIAGR		0,00019
	YVDIGIPANNK		0,0089
	VIVAIENPQDIIVQSAR		0,00092
	VIVAIENPQDIIVQSAR		0,00013
	VIVAIENPQDIIVQSAR		3,8E-05
	FAQHTGANAIAGR		0,0009
	FAQHTGANAIAGR		0,002
	FAQHTGANAIAGR		0,0031
	FAQHTGANAIAGR		0,00019

	YVDIGIPANNK		0,0089	
	VIVAIENPQDIIVQSAR		0,00092	
	VIVAIENPQDIIVQSAR		0,00013	
	VIVAIENPQDIIVQSAR		3,8E-05	
2227		**Aci-reductone-dioxygenase-like protein**		-32,26399994
	GGMIVLPAGMYHR	M10:+15.99	0,0073	
	NFFEEHLHTDEEIR		4,7E-06	
	NFFEEHLHTDEEIR		8,6E-05	
	LKNFFEEHLHTDEEIR		0,0061	
	GYSYVDICDVCPEK	C8:+57.04 - C11:+57.04	0,0044	
	GYSYVDICDVCPEK	C8:+57.04 - C11:+57.04	4,2E-05	
	GYSYVDICDVCPEKLPNYEAK	C8:+57.04 - C11:+57.04	1,2E-06	
	GYSYVDICDVCPEKLPNYEAK	C8:+57.04 - C11:+57.04	3,6E-05	
	YCLEGSGYFDVR	C2:+57.04	1E-04	
	LSELGVVSWNLNADDWEKDENLKK		0,00058	
	LSELGVVSWNLNADDWEK		0,0059	
	LSELGVVSWNLNADDWEK		8,9E-06	
	LSELGVVSWNLNADDWEK		0,00018	
	LSELGVVSWNLNADDWEK		1,4E-05	
2464		**Eukaryotic translation initiation factor 5A3**		-26,99829292
	KLEDIVPSSHN		0,0013	
	KLEDIVPSSHNCD	C12:+57.04	0,0021	
	KLEDIVPSSHNCD	C12:+57.04	2,9E-05	
	KLEDIVPSSH		0,0071	
	KLEDIVPSSH		0,001	
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,0062	
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	1,9E-05	
	PSSHNCDVPHVDR	C6:+57.04	0,00031	
	LEDIVPSSHNCDVPHVDR	C11:+57.04	0,00013	
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,00031	
	LEDIVPSSHNCDVPHVDR	C11:+57.04	0,0011	
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,0054	
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,00092	
	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR	C12:+57.04	0,0072	
	LPTDDVLLGQIK		0,0021	
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	6,1E-05	
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,00035	
	LPTDDVLLGQIK		0,00062	
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,003	
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,00092	
	TGFADGKDLILSVMSAMGEEQICAVK	C23:+57.04 - M14:+15.99 - M17:+15.99	0,0017	
	TGFADGKDLILSVMSAMGEEQICAVK	C23:+57.04 - M14:+15.99 - M17:+15.99	6,4E-05	
	DDLKLPTDDVLLGQIK		0,00046	
	TGFADGKDLILSVMSAMGEEQICAVK	C23:+57.04 - M14:+15.99 - M17:+15.99	7,6E-06	
	TGFADGKDLILSVMSAMGEEQICAVK	C23:+57.04 - M14:+15.99 - M17:+15.99	2,4E-06	
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	1,4E-05	
	LPTDDVLLGQIK		0,00053	
	LPTDDVLLGQIK		0,0054	
	YQLIDITDDGYVSLLTESGNTK		0,0011	
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,0057	
	DDLKLPTDDVLLGQIK		0,0096	
	DLILSVMSAMGEEQICAVK	C16:+57.04 - M7:+15.99 - M10:+15.99	0,0013	
	CHFVAIDIFNGK	C1:+57.04 - C1:-17.02655	0,0028	
	QDYQLIDITDDGYVSLLTESGNTKDDLK		0,002	
	CHFVAIDIFNGK	C1:+57.04 - C1:-17.02655	0,0055	
	QDYQLIDITDDGYVSLLTESGNTKDDLK		0,0009	
	LPTDDVLLGQIK		0,0036	
2517		**Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase**		-48,6771431
	SASAEPYAPELQSK		0,0094	
	SASAEPYAPELQSK		0,00069	
	DFMIQGGDFDKGNGTGGK	M3:+15.99	0,00036	
	DFMIQGGDFDKGNGTGGK	M3:+15.99	4,1E-05	
	VIKDFMIQGGDFDKGNGTGGK	M6:+15.99	1,5E-05	
	VIKDFMIQGGDFDKGNGTGGK	M6:+15.99	6,9E-05	

DFMIQGGDFDKGNGTGGK		2,4E-07	
DFMIQGGDFDKGNGTGGK		0,00018	
DFMIQGGDFDKGNGTGGK		0,00028	
VIKDFMIQGGDFDK	M6:+15.99	0,00025	
DFMIQGGDFDKGNGTGGK		2,6E-05	
VIKDFMIQGGDFDK	M6:+15.99	0,001	
TFKDENFQLVHTGPGVLSMAN	M19:+15.99	0,0024	
VIKDFMIQGGDFDK		0,00096	
HVVFGQVLEGMDIVR	M11:+15.99	1,5E-05	
HVVFGQVLEGMDIVR	M11:+15.99	0,0068	
AGPNTNGSQFFICTVK	C13:+57.04	0,00024	
AGPNTNGSQFFICTVK	C13:+57.04	0,00045	
AGPNTNGSQFFICTVK	C13:+57.04	0,0092	
HVVFGQVLEGMDIVR	M11:+15.99	0,0086	
HVVFGQVLEGMDIVR	M11:+15.99	0,0093	
VYFDISIGNPVGK		0,00017	
VYFDISIGNPVGK		0,0025	
VYFDISIGNPVGK		0,0023	
HVVFGQVLEGMDIVR	M11:+15.99	0,007	
TFKDENFKLVHTGPGVLSMANAGPNTNGSQFFICTVK	C34:+57.04 - M19:+15.99	5,4E-05	
HVVFGQVLEGMDIVR	M11:+15.99	0,0036	
TFKDENFQLVHTGPGVLSMANAGPNTNGSQFFICTVK	C34:+57.04 - M19:+15.99	0,00047	
DENFQLVHTGPGVLSMANAGPNTNGSQFFICTVK	C31:+57.04 - M16:+15.99	1,3E-07	
VYFDISIGNPVGK		0,00038	
VYFDISIGNPVGK		1,2E-05	
VYFDISIGNPVGK		3,3E-05	
IVIGLYGDDVPQTVENFR		0,00081	
HVVFGQVLEGMDIVR		9,9E-07	
HVVFGQVLEGMDIVR		6,1E-06	
HVVFGQVLEGMDIVR		0,0013	
IVIGLYGDDVPQTVENFR		0,0097	
VYFDISIGNPVGK		9,2E-05	
VYFDISIGNPVGK		0,002	
IVIGLYGDDVPQTVENFR		0,0026	
IVIGLYGDDVPQTVENFR		0,0036	
2620	**small subunit ribosomal protein S12e**		-17,53025818
ALCAEHNVHLVTVPSAK	C3:+57.04	0,00095	
ALCAEHNVHLVTVPSAK	C3:+57.04	0,0063	
ALCAEHNVHLVTVPSAK	C3:+57.04	0,0029	
ALCAEHNVHLVTVPSAK	C3:+57.04	0,0003	
ALCAEHNVHLVTVPSAK	C3:+57.04	0,0058	
ALCAEHNVHLVTVPSAK	C3:+57.04	0,0033	
ALCAEHNVHLVTVPSAK	C3:+57.04	0,0023	
HAAQICVLAEDCDQPDYVK	C6:+57.04 - C12:+57.04	3,2E-06	
HAAQICVLAEDCDQPDYVK	C6:+57.04 - C12:+57.04	8,9E-06	
HAAQICVLAEDCDQPDYVK	C6:+57.04 - C12:+57.04	3,5E-07	
ALCAEHNVHLVTVPSAK	C3:+57.04	0,0015	
HAAQICVLAEDCDQPDYVK	C6:+57.04 - C12:+57.04	1,4E-06	
2678	**response to stress**		-19,39653397
IDTIVMGSR	M6:+15.99	0,0024	
RIGVAMDFSASSK	M6:+15.99	0,0082	
IDTIVMGSR	M6:+15.99	0,0053	
IDTIVMGSR		0,0019	
IDTIVMGSR		0,0069	
IDTIVMGSR		0,0077	
IDTIVMGSR		0,0013	
EKLCEAVDEQKIDTIVMGSR	C4:+57.04 - M17:+15.99	0,0033	
EKLCEAVDEQKIDTIVMGSR	C4:+57.04 - M17:+15.99	0,0012	
AEVLDMLDTAAR	M6:+15.99	0,004	
AEVLDMLDTAAR	M6:+15.99	0,0029	
LCEAVDEQKIDTIVMGSR	C2:+57.04 - M15:+15.99	0,00036	
EKLCEAVDEQKIDTIVMGSR	C4:+57.04	0,0052	
GVRCDAEVLDMLDTAAR	C4:+57.04 - M11:+15.99	0,0088	
ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,0032	

	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,0043
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	2,8E-06
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	3,1E-06
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,009
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,00058
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,00078
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,0003
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,00053
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,00066
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	0,005
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	2,7E-05
	ILLGSVTNYVLSNASCPVTVVK	C16:+57.04	6,3E-06
939	**transcription corepressor activity, phosphopyruvate hydratase activity**		-195,334549
	HAGWGVMTSHR	M7:+15.99	0,0099
	HAGWGVMTSHR	M7:+15.99	0,00011
	HAGWGVMTSHR	M7:+15.99	0,0024
	HAGWGVMTSHR		0,00026
	HAGWGVMTSHR		0,0023
	DQTYDLNFKEENNDGSQK		0,0037
	DQTYDLNFKEENNDGSQK		3,8E-06
	MDVAASEFYNDKDK	M1:+15.99	0,0057
	DVAASEFYNDKDK		0,0017
	MDVAASEFYNDKDK	M1:+15.99	0,0015
	HAGWGVMTSHR		0,0087
	KVVIGMDVAASEFYNDKDK	M6:+15.99	0,0066
	TYDLNFKEENNDG		0,00013
	KVVIGMDVAASEFYNDKDK	M6:+15.99	0,002
	TYDLNFKEENND		0,0026
	VVIGMDVAASEFYNDKDK	M5:+15.99	0,00018
	VVIGMDVAASEFYNDKDK	M5:+15.99	5,2E-06
	VVIGMDVAASEFYNDKDK	M5:+15.99	1,4E-05
	VVIGMDVAASEFYNDKDK	M5:+15.99	0,0012
	VVIGMDVAASEFYNDK	M5:+15.99	1,4E-07
	VVIGMDVAASEFYNDK	M5:+15.99	7,1E-05
	VVIGMDVAASEFYNDKD	M5:+15.99	0,00013
	VVIGMDVAASEFYNDKD	M5:+15.99	2,8E-07
	PTTQAELDNFMVQQLDGTK	M11:+15.99	3,4E-05
	PTTQAELDNFMVQQLDGTK	M11:+15.99	2,4E-06
	PTTQAELDNFMVQQLDGTK	M11:+15.99	1E-04
	PTTQAELDNFMVQQLDGTK	M11:+15.99	0,0019
	PTTQAELDNFMVQQLDGTK	M11:+15.99	0,0031
	VVIGMDVAASEFYNDKDKTYDLNFKEENNDGSQK		0,0052
	VVIGMDVAASEFYNDK	M5:+15.99	5,2E-07
	VVIGMDVAASEFYNDKDK	M5:+15.99	0,0012
	VVIGMDVAASEFYNDKDK		0,00012
	VVIGMDVAASEFYNDKDK		1,5E-06
	VVIGMDVAASEFYNDKDK	M5:+15.99	0,00076
	EQVQIVGDDLLVTNPTR		2,7E-05
	LAMQEFMILPTGATSFK	M3:+15.99 - M7:+15.99	0,00026
	LAMQEFMILPTGATSFK	M3:+15.99 - M7:+15.99	4,6E-05
	VVIGMDVAASEFYNDKD		0,00031
	VVIGMDVAASEFYNDKDK		1,9E-06
	KLVLPVPAFNVINGGSHAGNK		0,0035
	VVIGMDVAASEFYNDKDK		0,00025
	VVIGMDVAASEFYNDKDK		7,3E-07
	VVIGMDVAASEFYNDKDK		0,0002
	DPTTQAELDNFMVQQLDGTK	M12:+15.99	2,9E-06
	DPTTQAELDNFMVQQLDGTK	M12:+15.99	7,4E-05
	VNQIGSVTESIEAVK		0,0014
	DPTTQAELDNFMVQQLDGTK		9,2E-06
	AAVPSGASTGVYEALELR		5,6E-06
	AAVPSGASTGVYEALELR		0,00012
	VNQIGSVTESIEAVK		7,3E-05
	VNQIGSVTESIEAVK		0,0016

	KLVLPVPAFNVINGGSHA		0,00026	
	AAVPSGASTGVYEALELR		6,8E-07	
	AAVPSGASTGVYEALELR		4,8E-07	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		0,0084	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		0,00032	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		1,1E-05	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		0,0016	
	VNQIGSVTESIEAVK		6,3E-05	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		0,0056	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		8,5E-05	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		0,00065	
	VNQIGSVTESIEAVK		0,00031	
	KLVLPVPAFNVING		0,00058	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		2,1E-05	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		6E-07	
	AAVPSGASTGVYEALELR		5,8E-05	
	AAVPSGASTGVYEALELR		4,7E-05	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		0,0006	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		6,3E-08	
	VNQIGSVTESIEAVK		0,00034	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		0,00048	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		0,0014	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		1,7E-06	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		0,00033	
	AAVPSGASTGVYEALELR		2,3E-06	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		1,2E-07	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		2,4E-07	
	GNPTVEVDVCCSDGTFAR	C10:+57.04 - C11:+57.04	0,0029	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		1,1E-08	
	AAVPSGASTGVYEALELR		9,7E-07	
	AAVPSGASTGVYEALELR		5,6E-06	
	VNQIGSVTESIEAVK		2,6E-05	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		9,8E-07	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		0,0081	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		6,4E-06	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		0,0019	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		6,4E-06	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		1,3E-06	
	AAVPSGASTGVYEALELR		3,7E-05	
	AAVPSGASTGVYEALELR		1E-05	
	VVIGMDVAASEFYNDKDK		0,0017	
	MTEEIGEQVQIVGDDLLVTNPTR	M1:+15.99	0,0045	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		6,1E-07	
	VNQIGSVTESIEAVK		8,6E-05	
	SGETEDTFIADLAVGLSTGQIK		3,1E-09	
	VNQIGSVTESIEAVK		0,00058	
	SFVSEYPIVSIEDPFDQDDWVHYAK		9,5E-05	
	VNQIGSVTESIEAVK		0,0026	
	AAVPSGASTGVYEALELR		0,002	
	GNPTVEVDVCCSDGTFAR	C10:+57.04 - C11:+57.04	0,0059	
	VNQIGSVTESIEAVK		0,0017	
	LGANAILAVSLAVCK	C14:+57.04	0,0057	
	AAVPSGASTGVYEALELR		0,00015	
367	**methionine-tRNA ligase activity, tyrosine-tRNA ligase activity, ATP binding**			-23,31033707
	CPTEGCNYEAAR	C1:+57.04 - C6:+57.04	0,0025	
	CPTEGCNYEAAR	C1:+57.04 - C6:+57.04	0,0042	
	SHGIGVFGNDAK		0,0067	
	SHGIGVFGNDAK		0,00012	
	GYNAIYICGTDEYGTATETK	C8:+57.04	1E-05	
	GYNAIYICGTDEYGTATETK	C8:+57.04	4,2E-07	
	TISVTEYLNYEAGK		0,0037	
	DNVPFHTVMFPSTLLGTGENWTMMK	M9:+15.99 - M23:+15.99 - M24:+15.99	0,0073	
	DNVPFHTVMFPSTLLGTGENWTMMK	M9:+15.99 - M23:+15.99	0,0036	
	LNSELLNNLGNFINR		0,00081	

	DTDHLFLELPLLSDK		0,0036
414	**Ribonucleotide reductase, barrel domain**		-47,88005829
	VSVGIHKDDIESAVK		0,002
	VSVGIHKDDIESAVK		0,00042
	VSVGIHKDDIDSAIR		0,00048
	VSVGIHKDDIDSAIR		3,3E-05
	SAGGIGVSVHNIR		0,0086
	EGPYETYEGSPVSK		0,003
	SAGGIGVSVHNIR		0,0099
	VSVGIHKDDIDSAIR		0,00044
	VSVGIHKDDIDSAIR		0,00013
	HLLHDLTEMGIWTPALK	M9:+15.99	0,0037
	HLLHDLTEMGIWTPALK	M9:+15.99	0,0024
	GVTTSQLDELAAETAAALTASHPDYASLAAR		0,00024
	GVTTSQLDELAAETAAALTASHPDYASLAAR		0,0039
	GAFAVYLEPWHADIFEFLDLR		0,002
	GAFAVYLEPWHADIFEFLDLR		0,00045
	GAFAVYLEPWHADIFEFLDLR		0,0085
487	**Starch synthase 1, chloroplastic amyloplastic**		-44,97836685
	CLPHHYSVDDLSGK	C1:+57.04	0,0026
	CLPHHYSVDDLSGK	C1:+57.04	5,1E-05
	CLPHHYSVDDLSGK	C1:+57.04	0,00023
	HALDKGEAVNFLK		0,0064
	HALDKGEAVNFLK		0,00014
	ITAGCDILLMPSR	C5:+57.04 - M10:+15.99	0,0072
	GWVGFSVPVSHR		4,1E-05
	SIVFVTGEAAPYAK		0,0032
	SIVFVTGEAAPYAK		0,00054
	GWVGFSVPVSHR		0,00044
	IPCFGGSHEVTFFHEYR	C3:+57.04	0,00022
	IPCFGGSHEVTFFHEYR	C3:+57.04	1,9E-07
	IPCFGGSHEVTFFHEYR	C3:+57.04	3,2E-06
	SIVFVTGEAAPYAK		0,00011
	PGSLYGDNFGAFGDNQFR		0,00025
	PGSLYGDNFGAFGDNQFR		3E-06
	PGSLYGDNFGAFGDNQFR		1,9E-06
	PGSLYGDNFGAFGDNQFR		0,00011
	SGGLGDVCGSLPIALAAR	C8:+57.04	0,00019
	SGGLGDVCGSLPIALAAR	C8:+57.04	7,8E-07
	GEEGTGWAFSPLTVDK		0,00035
	EDVPLIGFIGR		0,005
	SGGLGDVCGSLPIALAAR	C8:+57.04	0,00022
	ELGLPVREDVPLIGFIGR		0,0092
502	**Transketolase, thiamine diphosphate binding domain**		-141,5547485
	PADGKETAGAYK		2E-06
	PADGKETAGAYK		0,0048
	PADGKETAGAYK		8,8E-07
	PADGKETAGAYK		3,3E-06
	NGNDGYDEIRK		0,0024
	GGYTISDNSTGNKPD		0,00058
	ALPQYTTESPADATR		0,0026
	ALPQYTTESPADATR		7,7E-05
	GSADLASSNMTLLK	M10:+15.99	0,00026
	AMPNMLMFRPAD	M2:+15.99 - M5:+15.99 - M7:+15.99	0,0047
	GSADLASSNMTLLK	M10:+15.99	0,00013
	AMPNMLMFRPAD	M2:+15.99 - M5:+15.99 - M7:+15.99	0,00048
	QWGSSTPGHPENFE		0,00072
	NLSQQCLNALAK	C6:+57.04	0,00082
	NLSQQCLNALAK	C6:+57.04	0,00096
	NLSQQCLNALAK	C6:+57.04	0,00041
	NLSQQCLNALAK	C6:+57.04	0,0012
	VTTTIGFGSPNK		0,0073
	SADLASSNMTLLK		0,0038
	LLGGSADLASSNMTLLK	M13:+15.99	0,0021

ISIEAGSTLGWQK		0,00011
ISIEAGSTLGWQK		0,00031
EYGITAESVIAAAK		0,002
GIANAVGLALAEK		4E-06
GIANAVGLALAEK		6E-05
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,001
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	4,1E-07
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	7,2E-09
GIANAVGLALAEK		1,4E-06
ISIEAGSTLGWQK		0,00069
ISIEAGSTLGWQK		0,0017
ISALSEAGVIYVMTHD	M13:+15.99	0,00014
ISALSEAGVIYVMTHD	M13:+15.99	0,00081
ISALSEAGVIYVMTHD	M13:+15.99	0,00028
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,00058
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,003
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		7,4E-05
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		0,0032
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,0013
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		3,2E-08
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		3,4E-07
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,00094
ISIEAGSTLGWQK		0,00055
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	1,1E-08
ISIEAGSTLGWQK		0,00038
CATFFVFTDYMR	C1:+57.04 - M11:+15.99	4,4E-05
CATFFVFTDYMR	C1:+57.04 - M11:+15.99	5,1E-05
SIITGELPAGWADALPQYTTESPADATR		0,0034
ISIEAGSTLGWQK		0,0029
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		1,3E-09
FVLSAGHGCMLQYALLHLAGYDAVK	C9:+57.04 - M10:+15.99	4,1E-05
FVLSAGHGCMLQYALLHLAGYDAVK	C9:+57.04 - M10:+15.99	0,00014
FEALGWHTIWVK		0,0002
SIITGELPAGWADALPQYTTESPADATR		0,0041
FEALGWHTIWVK		0,00061
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,0018
FVLSAGHGCMLQYALLHLAGYDAVK	C9:+57.04 - M10:+15.99	0,00021
FEALGWHTIWVK		0,00062
FEALGWHTIWVK		5,1E-05
PLGQGIANAVGLALAEK		9,6E-05
PLGQGIANAVGLALAEK		7E-06
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	1E-06
CATFFVFTDYMR	C1:+57.04 - M11:+15.99	9,2E-05
FEALGWHTIWVK		2,8E-05
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		0,0042
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	7,4E-05
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	6E-08
SIITGELPAGWADALPQYTTESPADATR		0,0046
CATFFVFTDYMR	C1:+57.04 - M11:+15.99	5,1E-05
SIITGELPAGWADALPQYTTESPADATR		0,0019
HPENFETPGVEVTTGPLGQGIANAVGLALAEK		0,0079
TPGVEVTTGPLGQGIANAVGLALAEK		0,005
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,0035
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,00018
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,00013
ISIEAGSTLGWQK		0,0016
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,0073
ISIEAGSTLGWQK		0,0094
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	5,6E-06
QWGSSTPGHPENFETPGVEVTTGPLGQGIANAVGLALAEK		0,0053
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		0,0022
506	**Transketolase, thiamine diphosphate binding domain**	-90,09801483
PADGKETAGAYK		2E-06
PADGKETAGAYK		0,0048

PADGKETAGAYK		8,8E-07
PADGKETAGAYK		3,3E-06
NGNDGYDEIRK		0,0024
GGYTISDNSTGNKPD		0,00058
ALPQYTTESPADATR		0,0026
ALPQYTTESPADATR		7,7E-05
GSADLASSNMTLLK	M10:+15.99	0,00026
AMPNMLMFRPAD	M2:+15.99 - M5:+15.99 - M7:+15.99	0,0047
GSADLASSNMTLLK	M10:+15.99	0,00013
AMPNMLMFRPAD	M2:+15.99 - M5:+15.99 - M7:+15.99	0,00048
QWGSSTPGHPENFE		0,00072
NLSQQCLNALAK	C6:+57.04	0,00082
NLSQQCLNALAK	C6:+57.04	0,00096
NLSQQCLNALAK	C6:+57.04	0,00041
NLSQQCLNALAK	C6:+57.04	0,0012
VTTTIGFGSPNK		0,0073
SADLASSNMTLLK		0,0038
LLGGSADLASSNMTLLK	M13:+15.99	0,0021
ISIEAGSTLGWQK		0,00011
ISIEAGSTLGWQK		0,00031
EYGITAESVIAAAK		0,002
GIANAVGLALAEK		4E-06
GIANAVGLALAEK		6E-05
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,001
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	4,1E-07
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	7,2E-09
GIANAVGLALAEK		1,4E-06
ISIEAGSTLGWQK		0,00069
ISIEAGSTLGWQK		0,0017
ISALSEAGVIYVMTHD	M13:+15.99	0,00014
ISALSEAGVIYVMTHD	M13:+15.99	0,00081
ISALSEAGVIYVMTHD	M13:+15.99	0,00028
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,00058
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,003
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		7,4E-05
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		0,0032
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,0013
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		3,2E-08
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		3,4E-07
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,00094
ISIEAGSTLGWQK		0,00055
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	1,1E-08
ISIEAGSTLGWQK		0,00038
CATFFVFTDYMR	C1:+57.04 - M11:+15.99	4,4E-05
CATFFVFTDYMR	C1:+57.04 - M11:+15.99	5,1E-05
SIITGELPAGWADALPQYTTESPADATR		0,0034
ISIEAGSTLGWQK		0,0029
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		1,3E-09
FVLSAGHGCMLQYALLHLAGYDAVK	C9:+57.04 - M10:+15.99	4,1E-05
FVLSAGHGCMLQYALLHLAGYDAVK	C9:+57.04 - M10:+15.99	0,00014
FEALGWHTIWVK		0,0002
SIITGELPAGWADALPQYTTESPADATR		0,0041
FEALGWHTIWVK		0,00061
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,0018
FVLSAGHGCMLQYALLHLAGYDAVK	C9:+57.04 - M10:+15.99	0,00021
FEALGWHTIWVK		0,00062
FEALGWHTIWVK		5,1E-05
PLGQGIANAVGLALAEK		9,6E-05
PLGQGIANAVGLALAEK		7E-06
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	1E-06
CATFFVFTDYMR	C1:+57.04 - M11:+15.99	9,2E-05
FEALGWHTIWVK		2,8E-05
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		0,0042
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	7,4E-05

VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	6E-08
SIITGELPAGWADALPQYTTESPADATR		0,0046
CATFFVFTDYMR	C1:+57.04 - M11:+15.99	5,1E-05
SIITGELPAGWADALPQYTTESPADATR		0,0019
HPENFETPGVEVTTGPLGQGIANAVGLALAEK		0,0079
TPGVEVTTGPLGQGIANAVGLALAEK		0,005
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,0035
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,00018
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,00013
ISIEAGSTLGWQK		0,0016
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	0,0073
ISIEAGSTLGWQK		0,0094
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK	M17:+15.99	5,6E-06
QWGSSTPGHPENFETPGVEVTTGPLGQGIANAVGLALAEK		0,0053
VVPGLLGGSADLASSNMTLLK		0,0022
602	**Phenylalanine ammonia lyase (PAL)**	-81,8240509
KVLTMNPTGDLSSAR	M5:+15.99	0,0046
KVLTMNPTGDLSSAR	M5:+15.99	1,4E-05
SVNDNPVIDVHR		0,0069
VLTMNPTGDLSSAR	M4:+15.99	1E-04
VLTMNPTGDLSSAR	M4:+15.99	5,8E-05
EVNSVNDNPVIDVHR		6,1E-05
EVNSVNDNPVIDVHR		6,2E-07
VLTMNPTGDLSSAR	M4:+15.99	5,3E-05
ALHGGNFQGTPIGVSMDNTR	M16:+15.99	0,0081
ALHGGNFQGTPIGVSMDNTR	M16:+15.99	0,00055
ALHGGNFQGTPIGVSMDNTR	M16:+15.99	1,1E-05
ALHGGNFQGTPIGVSMDNTR	M16:+15.99	2,3E-05
IAGLITGRPNAQATTADGR		3,7E-05
ALHGGNFQGTPIGVSMDNTR	M16:+15.99	2,1E-05
VLTMNPTGDLSSAR	M4:+15.99	0,00032
VLTMNPTGDLSSAR	M4:+15.99	0,0028
EVNSVNDNPVIDVHR		0,0013
VLTMNPTGDLSSAR	M4:+15.99	0,00026
EVNSVNDNPVIDVHR		0,00034
VLTMNPTGDLSSAR	M4:+15.99	0,00019
EVNSVNDNPVIDVHR	E1:-18.01056	1,6E-05
EVNSVNDNPVIDVHR	E1:-18.01056	1,9E-05
DASGISVELDEEARPR		0,0071
ALHGGNFQGTPIGVSMDNTR		1,6E-06
ALHGGNFQGTPIGVSMDNTR		8,5E-08
NPSLDYGFK		0,007
VLTMNPTGDLSSAR		0,0014
VLTMNPTGDLSSAR		0,00011
VLTMNPTGDLSSAR		0,0011
FVREELGCVYLTGEK	C8:+57.04	3,5E-05
FVREELGCVYLTGEK	C8:+57.04	0,00029
TKDGPALQVELLR		0,001
EELGCVYLTGEK	C5:+57.04	0,00077
EELGCVYLTGEK	C5:+57.04	0,00014
EELGCVYLTGEK	C5:+57.04	0,0011
EAVFSYADDACSANYPLMQK	C11:+57.04 - M18:+15.99	9,9E-09
EAVFSYADDACSANYPLMQK	C11:+57.04 - M18:+15.99	1E-06
LIDPMLECLK	C8:+57.04 - M5:+15.99	0,006
EAVFSYADDACSANYPLMQK	C11:+57.04 - M18:+15.99	2,7E-05
EAVFSYADDACSANYPLMQK	C11:+57.04 - M18:+15.99	0,0045
LLNTGVSPCLPLR	C9:+57.04	0,0013
LLNTGVSPCLPLR	C9:+57.04	0,0024
EAVFSYADDACSANYPLMQK	C11:+57.04	9,4E-07
DGPALQVELLR		0,0077
EAVFSYADDACSANYPLMQK	C11:+57.04	4E-06
EAVFSYADDACSANYPLMQK	C11:+57.04	2,1E-09
DGPALQVELLR		0,0074
EAVFSYADDACSANYPLMQK	C11:+57.04 - M18:+15.99	8,4E-05

	PLNWGAAAAELTGSHLDEVKR		0,00066	
	PLNWGAAAAELTGSHLDEVKR		0,00078	
	LLNTGVSPCLPLR	C9:+57.04	0,0075	
	INTLLQGYSGIR		0,0016	
	PLNWGAAAAELTGSHLDEVK		1,8E-05	
	PLNWGAAAAELTGSHLDEVK		6,1E-05	
	PLNWGAAAAELTGSHLDEVK		0,00035	
	LMFAQFSELVNEFYNNGLTSNLAGSR	M2:+15.99	0,0054	
	LMFAQFSELVNEFYNNGLTSNLAGSR	M2:+15.99	0,00077	
	LMFAQFSELVNEFYNNGLTSN	M2:+15.99	0,00066	
	LMFAQFSELVNEFYNNGLTSNLAGSR		0,0042	
	LMFAQFSELVNEFYNNGLTSNLAGSR		0,0046	
	GTITASGDLVPLSYIAGLITGR		0,0022	
628	**70 kDa peptidyl-prolyl isomerase**			-59,94512177
	TVTEIGDDKK		0,0076	
	ITCNLNNAACK	C3:+57.04 - C10:+57.04	0,0016	
	ITCNLNNAACK	C3:+57.04 - C10:+57.04	0,0047	
	DKESWDLNNSEK		0,00054	
	DKESWDLNNSEK		0,00084	
	GHDEQEPFEFK		0,0038	
	GHDEQEPFEFK		0,0018	
	FIEYDTSFSEDEKK		0,00077	
	FIEYDTSFSEDEKK		7,5E-05	
	GHDEQEPFEFK		0,0072	
	FIEYDTSFSEDEKK		0,00096	
	GHDEQEPFEFK		0,0052	
	GHDEQEPFEFK		0,0009	
	FIEYDTSFSEDEKK		2,6E-05	
	WENPKDPDEVFVK		0,00073	
	WENPKDPDEVFVK		0,0013	
	FIEYDTSFSEDEKK		6,2E-05	
	FIEYDTSFSEDEK		1E-04	
	FIEYDTSFSEDEK		0,0014	
	VLLAVKPQYGFGEMGR	M14:+15.99	0,0056	
	VLLAVKPQYGFGEMGR	M14:+15.99	0,0038	
	TPEVGDEVEVHYTGTLLDGK		0,0049	
	KGEVALVTIPPEYAYGSTESK		8,1E-06	
	KGEVALVTIPPEYAYGSTESK		0,0052	
	TPEVGDEVEVHYTGTLLDGK		0,0029	
	KGEVALVTIPPEYAYGSTESK		0,0095	
	EGEGWDTPEVGDEVEVHYTGTLLDGKK		0,00043	
	EGEGWDTPEVGDEVEVHYTGTLLDGK		0,0074	
	GHDEQEPFEFKTDEEAVIEGLDR		0,0072	
	GHDEQEPFEFKTDEEAVIEGLDR		0,0037	
	GHDEQEPFEFKTDEEAVIEGLDR		1,4E-05	
	AQAYTQLADLELAEVDIKK		2,8E-06	
	AQAYTQLADLELAEVDIKK		5,3E-08	
	AQAYTQLADLELAEVDIK		3E-06	
	AQAYTQLADLELAEVDIK		2,3E-05	
	PAAGEGGAVPPNASLVIDLELVSWK		0,0055	
	PAAGEGGAVPPNASLVIDLELVSWK		0,0011	
	PAAGEGGAVPPNASLVIDLELVSWK		0,00016	
	PAAGEGGAVPPNASLVIDLELVSWK		0,0043	
	PAAGEGGAVPPNASLVIDLELVSWK		0,00026	
641	**Heat shock protein 70**			-186,3556824
	SQVFSTAADNQTQVGIR		0,00014	
	SQVFSTAADNQTQVGIR		6,8E-06	
	SQVFSTAADNQTQVGIR		6,8E-06	
	EVDEVLLVGGMTR	M11:+15.99	0,00024	
	EVDEVLLVGGMTR	M11:+15.99	0,00052	
	GVNPDEAVAMGAALQGGILR	M10:+15.99	6,9E-06	
	GVNPDEAVAMGAALQGGILR	M10:+15.99	1,3E-05	
	EVDEVLLVGGMTR		0,0019	
	DKIPAEVATEIETAVADLR		0,003	

	ELLLLDVTPLSLGIETLGGIFTR		4,4E-08	
	ELLLLDVTPLSLGIETLGGIFTR		2,3E-09	
684	**Phosphoglucomutase**			-234,5201416
	YNMGNGGPAPESVTDK	M3:+15.99	8,8E-05	
	YNMGNGGPAPESVTDK	M3:+15.99	0,0011	
	YDYENVDAEAAK		0,0022	
	YDYENVDAEAAK		0,00019	
731	**Succinate-CoA ligase (GDP-forming) activity**			-50,71987534
	HSLGYWEDEKVR		0,004	
	IMQNNAAVFR	M2:+15.99	0,0098	
	HSLGYWEDEKVR		2,3E-06	
	AYFSATSAHTCTGDGNAMVAR	C11:+57.04	7,4E-05	
	STNTIIATGGYGR		2E-05	
	TGHAMLHTLYGQAMK		5,4E-05	
	TGHAMLHTLYGQAMK		0,00022	
	AAIGLSEHGFNTACITK	C14:+57.04	0,00022	
	AAIGLSEHGFNTACITK	C14:+57.04	7,4E-07	
	AFGGQSLDFGK		0,0071	
	AFGGQSLDFGK		0,0021	
	AFGGQSLDFGK		0,00096	
	DHIYLHLNHLPPEVLK		3,6E-05	
	DHIYLHLNHLPPEVLK		1,1E-06	
	DHIYLHLNHLPPEVLK		0,0082	
	DHIYLHLNHLPPEVLK		0,0012	
	TTSSSYTLVDHSYDAVVVGAGGAGLR		0,002	
842	**ketol-acid reductoisomerase activity**			-160,6439667
	GSQGPAQAQNLR		0,00047	
	LISDSAQADNYEK		0,00029	
	LISDSAQADNYEK		0,00034	
	KGMLEVYNSLSEEGKK	M3:+15.99	1,4E-06	
	KGMLEVYNSLSEEGKK	M3:+15.99	2,7E-06	
	HLQSHGLDFPK		0,0026	
	KGMLEVYNSLSEEGKK	M3:+15.99	0,0011	
	KGMLEVYNSLSEEGKK	M3:+15.99	0,0059	
	EKVSLAGHEEYIVR		0,0015	
	EKVSLAGHEEYIVR		0,0041	
	KGMLEVYNSLSEEGK	M3:+15.99	0,00049	
	KGMLEVYNSLSEEGK	M3:+15.99	0,0097	
	VSLAGHEEYIVR		0,0009	
	VSLAGHEEYIVR		0,00022	
	VSLAGHEEYIVR		0,0034	
	GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04 - M5:+15.99	0,0011	
	GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04 - M5:+15.99	0,00053	
	VSLAGHEEYIVR		0,00018	
	EVNGAGINASFAVHQDVDGR		6,1E-07	
	NISVVAVCPK	C8:+57.04	0,0055	
	EVNGAGINASFAVHQDVDGR		5E-06	
	NISVVAVCPK	C8:+57.04	0,00092	
	GMLEVYNSLSEEGKK	M2:+15.99	4,4E-06	
	EVNGAGINASFAVHQDVDGR		0,0077	
	NASFAVHQDVDGR		5,7E-06	
	KGMLEVYNSLSEEGKK		0,0081	
	RFYDKEGLPAFPMGK	M13:+15.99	0,0073	
	KGMLEVYNSLSEEGKK		1,4E-06	
	GMLEVYNSLSEEGK	M2:+15.99	7,2E-05	
	GMLEVYNSLSEEGK	M2:+15.99	0,00016	
	GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	7,5E-06	
	GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	2,5E-06	
	GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	3,6E-06	
	GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04 - M5:+15.99	1,1E-07	
	GMLEVYNSLSEEGKK	M2:+15.99	0,0064	
	GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04 - M5:+15.99	0,00018	
	GMLEVYNSLSEEGKK	M2:+15.99	0,0051	
	GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	3,4E-06	

EGLPAFPMGK	M8:+15.99	0,0096
EVNGAGINASFAVHQDVDGR		0,00036
FYDKEGLPAFPMGK	M12:+15.99	1,4E-05
NISVVAVCPK	C8:+57.04	0,0055
EVNGAGINASFAVHQDVDGR		0,00019
FYDKEGLPAFPMGK	M12:+15.99	1,7E-06
EVNGAGINASFAVHQDVDGR	E1:-18.01056	9,7E-09
STVEGITGIISK		0,0028
GMLEVYNSLSEEGK	M2:+15.99	0,0035
EVNGAGINASFAVHQDVDGR	E1:-18.01056	8,7E-07
EVNGAGINASFAVHQDVDGR	E1:-18.01056	5,1E-08
GMLEVYNSLSEEGKK		8,2E-05
GMLEVYNSLSEEGKK		0,0013
STVEGITGIISK		0,00012
FYDKEGLPAFPMGK	M12:+15.99	0,0058
STVEGITGIISK		0,00017
EVNGAGINASFAVHQDVDGR	E1:-18.01056	8,8E-05
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	1,6E-05
GMLEVYNSLSEEGK	M2:+15.99	0,0064
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	2,7E-05
NASFAVHQDVDGR		0,0081
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04 - M5:+15.99	7,1E-05
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	0,00015
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04 - M5:+15.99	0,00013
GMLEVYNSLSEEGKK	M2:+15.99	0,0007
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	0,00018
FYDKEGLPAFPMGK		6,6E-06
FYDKEGLPAFPMGK		7,4E-07
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		2,7E-06
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		6,9E-05
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		1,2E-07
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		1,8E-06
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		2,8E-06
NISVVAVCPK	C8:+57.04	0,0083
GMLEVYNSLSEEGKK		0,00087
GMLEVYNSLSEEGK		3,9E-06
GMLEVYNSLSEEGK	M2:+15.99	0,002
EVNGAGINASFAVHQDVDGR		0,0084
GMLEVYNSLSEEGKK		0,0031
STVEGITGIISK		0,00072
GMLEVYNSLSEEGKK		0,0033
STVEGITGIISK		0,0042
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		6,1E-05
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04 - M5:+15.99	0,0089
FYDKEGLPAFPMGK	M12:+15.99	6,3E-05
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	3,1E-05
GHSYSEIINESVIESVD		0,0084
GVAFMVDNCSTTAR	C9:+57.04	0,00032
FYDKEGLPAFPMGK	M12:+15.99	0,0074
FYDKEGLPAFPMGK	M12:+15.99	0,002
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		7E-05
STVEGITGIISK		5,9E-06
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		6E-06
STVEGITGIISK		0,00016
SILGLSHGFLLGHLQSHGLDFPK		0,0019
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		1,9E-05
LVLLLISDSAQADNYEK		5,2E-05
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		0,003
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		0,0024
FDYILTQQAFVTVDK		0,00043
EVNGAGINASFAVHQDVDGR		5,9E-05
GSPFTFATTLEQEYK		3,7E-06
TAGVYVALMMAQIEVLR	M9:+15.99 - M10:+15.99	1,1E-05
FDYILTQQAFVTVDK		0,0013

TAGVYVALMMAQIEVLR	M9:+15.99 - M10:+15.99	3,1E-06	
GSPFTFATTLEQEYK		0,0061	
LVLLLISDSAQADNYEK		0,0024	
GSPFTFATTLEQEYK		0,00026	
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		0,0011	
GSPFTFATTLEQEYK		4,5E-06	
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR	Q1:-17.02655	1,6E-06	
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR	Q1:-17.02655	8,7E-07	
KGHSYSEIINESVIESVDSLNPFMHAR	M24:+15.99	0,0035	
KGHSYSEIINESVIESVDSLNPFMHAR	M24:+15.99	0,00019	
QIGVIGWGSQGPAQAQNLR		0,0051	
STVEGITGIISK		0,002	
STVEGITGIISK		0,00019	
GHSYSEIINESVIESVDSLNPFMHAR	M23:+15.99	4,1E-05	
GHSYSEIINESVIESVDSLNPFMHAR	M23:+15.99	0,00015	
SVALGSPFTFATTLEQEYK		2E-05	
SVALGSPFTFATTLEQEYK		6,2E-06	
GHSYSEIINESVIESVDSLNPFMHAR		0,00011	
GHSYSEIINESVIESVDSLNPFMHAR		4,1E-05	
SYSEIINESVIESVDSLNPFMHAR	M21:+15.99	0,0027	
SYSEIINESVIESVDSLNPFMHAR	M21:+15.99	0,0016	
SDLVLLLISDSAQADNYEK		0,0039	
SDLVLLLISDSAQADNYEK		0,00036	
GDLGPLHPFTAGVYVALMMAQIEVLR	M18:+15.99 - M19:+15.99	1E-04	
GHSYSEIINESVIESVDSLNPF		0,005	
ATDVALGWSVALGSPF		0,00033	
ATDVALGWSVALGSPF		8,3E-05	
TAGVYVALMMAQIEVLR		0,0011	
ATDVALGWSVALGSPFTFATTLEQEYK		1,4E-05	
ATDVALGWSVALGSPFTFATTLEQEYK		1,1E-06	
GILLGAVHGIVEALFR		4,2E-05	
GILLGAVHGIVEALFR		1,8E-07	
ATDVALGWSVALGSPFTFATTLEQEYKSDIFGER		0,00062	
ATDVALGWSVALGSPFTF		0,0019	
STVEGITGIISK		0,002	
ATDVALGWSVALGSPFTFATTLEQEYK		0,0084	
ATDVALGWSVALGSPFTFATTLEQEYK		0,00035	
STVEGITGIISK		0,0012	
GAGFSEENGTLGDIWETISGSDLVLLLISDSAQADNYEK		8,9E-08	
959	**Cytosolic glutathione reductase**		-87,44754028
ILGGSGVTMIEGAGSIVDAHTVEVTQPDGSK	M9:+15.99	1E-05	
ILGGSGVTMIEGAGSIVDAHTVEVTQPDGSK	M9:+15.99	0,00018	
ATFDSTVGIHPSAAEEFVTMR	M20:+15.99	0,00018	
ILGGSGVTMIEGAGSIVDAHTVEVTQPDGSK	M9:+15.99	0,00017	
NDLLVYTSSFNPMK	M13:+15.99	0,0022	
NDLLVYTSSFNPMK	M13:+15.99	0,0019	
TSVPSIWAVGDVTNR		0,00089	
TSVPSIWAVGDVTNR		5,8E-05	
GLGAEVDLFYR		0,0035	
GLGAEVDLFYR		0,00011	
ILGGSGVTMIEGAGSIVDAHTVEVTQPDGSK		0,00018	
ELAITSDEALSLEELPK		0,00048	
ELAITSDEALSLEELPK		2,1E-06	
INLTPVALMEATCFAK	C13:+57.04 - M9:+15.99	0,0018	
NDLLVYTSSFNPMK		0,0017	
VAICELPFHPISSEWLGGHGGTCVIR	C4:+57.04 - C23:+57.04	0,0062	
LNLEAVGVEVDQIGAIK		0,0081	
1061	**Phosphoglycerate kinase, cytosolic**		-58,87381744
TFAEALDTTK		0,0071	
ELDYLVGAVANPK		0,00019	
ELDYLVGAVANPK		0,0011	
LAAALPDGGVLLLENVR		0,0066	
1400	**Glutamine synthetase**		-95,33504486
RHAQHIAAYGEGNER		0,0002	

RHAQHIAAYGEGNER		0,0036
RHAQHIAAYGEGNER		0,0081
HAQHIAAYGEGNER		3,4E-05
HAQHIAAYGEGNER		5E-05
HAQHIAAYGEGNER		5,9E-05
IAAYGEGNER		0,0078
TGHHETADINTFK		0,0007
HAQHIAAYGEGNER		0,0054
HAQHIAAYGEGNER		0,00011
HAQHIAAYGEGNER		8,3E-05
LTGHHETADINTFK		3,1E-05
LTGHHETADINTFK		1,3E-06
PQGPYYCAAGADK	C7:+57.04	0,00055
PQGPYYCAAGADK	C7:+57.04	0,00051
RLTGHHETADINTFK		0,0012
EAGGYGVIK	E1:-18.01056	0,0056
LTGHHETADINTFK		3,5E-05
LTGHHETADINTFK		0,00025
YPGPQGPYYCAAGADK	C10:+57.04	0,0002
YPGPQGPYYCAAGADK	C10:+57.04	0,00036
LTGHHETADINTFK		0,0043
TVNGPITDASQLPK		0,0024
YPGPQGPYYCAAGADK	C10:+57.04	2,6E-05
TVNGPITDASQLPK		0,0002
TVNGPITDASQLPK		0,00024
TVNGPITDASQLPK		0,00056
RGDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNKR	C9:+57.04 - C11:+57.04 - M8:+15.99	0,0031
RGDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNKR	C9:+57.04 - C11:+57.04 - M8:+15.99	0,00071
TVNGPITDASQLPK		0,00054
TVNGPITDASQLPK		0,00053
RGDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNKR	C9:+57.04 - C11:+57.04	0,00012
GDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNK	C8:+57.04 - C10:+57.04 - M7:+15.99	0,00029
GDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNK	C8:+57.04 - C10:+57.04 - M7:+15.99	0,0022
TVNGPITDASQLPK		0,0066
RGDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNK	C9:+57.04 - C11:+57.04 - M8:+15.99	0,0047
TVNGPITDASQLPK		0,0007
TVNGPITDASQLPK		0,00012
RGDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNK	C9:+57.04 - C11:+57.04 - M8:+15.99	0,0064
RGDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNK	C9:+57.04 - C11:+57.04	0,0094
ITEVAGVVLSLDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTK		0,0064
ITEVAGVVLSLDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTK		0,00058
GDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNK	C8:+57.04 - C10:+57.04	5,6E-06
GDNLLVMCDCYTPQGVPIPTNK	C8:+57.04 - C10:+57.04	2E-08
ITEVAGVVLSLDPK		0,00043
ITEVAGVVLSLDPK		0,001
SEVILYPQAIFK		0,0026
ITEVAGVVLSLDPKPIPGDWNGAGAHTNYSTK		0,0013
GSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFK		0,00095
GSSTGQAPGEDSEVILYPQAIFK		0,0087
ITEVAGVVLSLDPKPIPGDWNGAGAHTNY		0,00027
ITEVAGVVLSLDPKPIPGD		0,0012
ITEVAGVVLSLDPKPIPG		0,00043
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04	0,0012
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04	0,0033
ITEVAGVVLSLDPK		0,0036
ITEVAGVVLSLDPK		0,0005
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		1,1E-05
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		1E-04
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,00068
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,0031
IIVEYLWVGGSGIDIR		0,00079
IIVEYLWVGGSGIDIR		9,2E-05
DVNWPLGWPIGGYPGPQGPYYCAAGADK	C22:+57.04	0,00059
PIGGYPGPQGPYYCAAGADK	C14:+57.04	0,0021

ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04 - A1:+42.01057	0,0099	
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04 - A1:+42.01057	0,00013	
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04 - A1:+42.01057	8,2E-06	
IFNTPNVAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,0009	
IFNTPNVAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,0023	
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,0078	
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,0047	
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04 - A1:+42.01057	2,9E-05	
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04 - A1:+42.01057	3,9E-05	
DVNWPLGWPIGGYPGPQGPYYCAAGADK	C22:+57.04	0,0024	
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,0094	
ITEVAGVVLSLDPK		0,00049	
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04 - A1:+42.01057	0,00025	
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,00023	
VAAEETWYGIEQEYTLLQK		0,00041	
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04 - A1:+42.01057	3,8E-05	
ITEVAGVVLSLDPK		0,0032	
ASLADLVNLDLSDCTDK	C14:+57.04 - A1:+42.01057	0,00023	
IIVEYLWVGGSGIDIR		0,00023	
1602	**LMW-GS**		-16,64554405
QMLQQCSCHVMQQQCCQQLPQIPQQSR	C6:+57.04 - C8:+57.04 - C15:+57.04 - C16:+57.04 - M2:+15.99 - M11:+15.99	0,0091	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0023	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	3,2E-05	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	7,3E-06	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0033	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0014	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,00096	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0018	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04	0,00025	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04	0,0013	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0017	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0045	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0081	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,002	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0013	
QIPVVQPSILQQLNPCK	C16:+57.04	0,00028	
LFLQQQCSPVAMPQR	C7:+57.04 - M12:+15.99	0,0042	
QQLVQQQIPVVQPSILQQLNPCK	C22:+57.04	0,00064	
QIAQLEVMTSIALR		0,0019	
QIAQLEVMTSIALR		0,0089	
2139	**Clathrin adaptor complex**		-13,70774364
YVYQPIEGLYLLLITNK		2,7E-05	
YVYQPIEGLYLLLITNK		1,9E-06	
YVYQPIEGLYLLLITNK		1,4E-08	
YVYQPIEGLYLLLITNK		0,0031	
YVYQPIEGLYLLLITNK		1,3E-05	
YVYQPIEGLYLLLITNK		9,3E-07	
TAFELIFAFDEAISLGNK		1,4E-06	
TAFELIFAFDEAISLGNK		3,4E-06	
2598	**thioredoxin peroxidase activity**		-6,861381531
AKGVDEILLVSVNDPFVMK	M18:+15.99	0,0043	
GVDEILLVSVNDPFVMK	M16:+15.99	0,00013	
GVDEILLVSVNDPFVMK	M16:+15.99	8,9E-05	
GVDEILLVSVNDPFVMK	M16:+15.99	0,00039	
GVDEILLVSVNDPFVMK	M16:+15.99	0,0017	
GVDEILLVSVNDPFVMK	M16:+15.99	0,004	
GVDEILLVSVNDPFVMK	M16:+15.99	3,2E-05	
GVDEILLVSVNDPFVMK	M16:+15.99	0,0097	
GVDEILLVSVNDPFVMK	M16:+15.99	0,001	
3052	**small subunit ribosomal protein S21e**		-28,80496597
AQGDADGSLDR		0,00047	
AQGDADGSLDR		0,0081	
AQGDADGSLDR		1,8E-05	
IGHVDENGLYDGR		0,0038	

IGHVDENGLYDGR		1,1E-05
IGHVDENGLYDGR		6,1E-05
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		3,6E-06
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		4,7E-07
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		1,7E-08
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		1,1E-11
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		3,4E-09
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		8,3E-06
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		4,5E-06
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		3,5E-13
IITAKDHASVQINIGHVDENGLYDGR		0,00017
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		0,00059
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		9E-08
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		1E-04
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		0,00011
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		1,5E-05
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		1,5E-05
MQNEEGKMVDLYVPR	M1:+15.99 - M8:+15.99	0,0022
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		0,0023
MQNEEGKMVDLYVPR	M1:+15.99 - M8:+15.99	0,0039
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		6,7E-06
MQNEEGKMVDLYVPR	M1:+15.99 - M8:+15.99	0,0091
MQNEEGKMVDLYVPR	M1:+15.99 - M8:+15.99	0,00057
FTTFALSGFVR		0,00025
FTTFALSGFVR		0,00045
DHASVQINIGHVDENGLYDGR		0,0058
FTTFALSGFVR		0,00075
FTTFALSGFVR		0,0033
FTTFALSGFVR		0,00037
FTTFALSGFVR		0,0052
FTTFALSGFVR		0,00018
FTTFALSGFVR		0,00074
FTTFALSGFVR		4,2E-05
FTTFALSGFVR		0,0035

Supplementary Table 4Sa : Comparative analysis of three studies published in 2010, 2011 and 2013 on the interaction *Fg* / wheat interaction with our analysis

	Study 1 (Emmie Dornez et al, 2010)				Study 2 (Lina Ding et al , 2011)			Study 3 (Xianghui Zang et al, 2013)			Our study (Chetouhi et al, 2014)			
Tissue	Grain				Spike			Spike			Grain during its development			
Time point	Time course (5, 15, 25 dpi)				One time point (12 hpi)			One time point (72 hpi)			Infection time course (3, 7, 14 dpi)/development time course (50, 150, 250°Cd)			
Plant	Wheat				Wheat			Wheat			Wheat			
Cultivar	Bobwhite (susceptible)				Wangshuibai (resistant) *vs* Meh0106 (susceptible)			NILs 75 (resistant) vs NILs 98 (susceptible)			French cultivar Récital (susceptible)			
Strain	*Fusarium graminearum* ΔTri5 (no mycotoxins)				*Fusarium graminearum* (Unknown)			*Fusarium graminearum* (From Kansas, USA)			*Fusarium graminearum* (*Fg1* from France)			
Inoculation	Spray inoculation				Point inoculation			Injection into a spike with a syringe			Spray inoculation			
Mycotoxins production	No				Yes			Yes			Yes			
Proteomic approach	2D-DIGE (pH 6-11)				In gel (pH 3-10)			In gel (pH 3-10)			In gel (pH 3-11)			
Number of identified proteins	**dpi**	**5**	**15**	**25**		**Resistant**	**Susceptible**		**Resistant**	**Susceptible**	**dai**	**3**	**7**	**14**
	Up	5	1	6	**Up**	31	27	**Up**	20	9	**Up**	7	25	4
	Down	11	10	4	**Down**	17	22	**Down**	NA	NA	**Down**	13	6	17

Study 1	2-D DIGE reveals changes in wheat xylanase inhibitor protein families due to Fusarium graminearum DeltaTri5 infection and grain development.
Study 2	Resistance to Hemi-Biotrophic *F. graminearum* Infection Is Associated with Coordinated and Ordered Expression of Diverse Defense Signaling Pathways
Study 3	Differentially Expressed Proteins Associated with Fusarium Head Blight Resistance in Wheat

dpi : days post inoculation
dai : days after inoculation

Supplementary Table 4Sb : Comparative analysis of three studies published in 2010, 2011 and 2013
on the interaction *Fq* / wheat interaction with our analysis

Study 1 (Essmie Durmez et al, 2010)

Spot No	Protein name	Biochemical pathways	5 dai	15 dai	25 dai
591	TAXI-IIa	Enzyme inhibitors			
593	TAXI-Ia	Enzyme inhibitors			
594	TAXI-IIa	Enzyme inhibitors			
610	TAXI-Ia	Enzyme inhibitors			
612	TAXI-Ia	Enzyme inhibitors			
626	TAXI-Ia	Enzyme inhibitors			
990	TAXI-725ACCN/725ACC	Enzyme inhibitors			
1044	TAXI-Ia	Enzyme inhibitors			
953	XIP-I	Enzyme inhibitors			
994	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1049	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1060	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1063	XIP-III	Enzyme inhibitors			
1064	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1091	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1093	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1096	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1099	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1100	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1101	XIP-I	Enzyme inhibitors			
1102	XIP-I	Enzyme inhibitors			
711	Peroxidase	Stress and defense			
727	Peroxidase	Stress and defense			
740	Peroxidase	Stress and defense			
747	Peroxidase	Stress and defense			
751	Peroxidase	Stress and defense			
757	Peroxidase	Stress and defense			
930	Chitinase	Stress and defense			
939	Chitinase	Stress and defense			
942	Chitinase	Stress and defense			
1007	Chitinase	Stress and defense			
1142	Chitinase	Stress and defense			
1149	Chitinase	Stress and defense			
1152	Chitinase	Stress and defense			
1153	Chitinase	Stress and defense			
1156	Chitinase	Stress and defense			
1223	TLP7	Stress and defense			
1242	TLP7	Stress and defense			
1728	Wheatwin-2 precursor	unknown			

Study 2 (Lina Ding et al , 2011)

Spot No	Protein name	Function	R	S
8	Reversibly glycosylated polypeptide	Polysaccharides metabolism		
10	Glycosyl transferase family 8 protein	Polysaccharides metabolism		
65	Beta 1,3-glycosyltransferase-like protein II	Polysaccharides metabolism		
26	Fructokinase-2	Starch synthesis		
74	Peroxisomal targeting signal type 2 receptor	Transport		
25	Las1-like family protein	Cell growth		
15	CATA1 WHEAT Catalase-1	oxidative stress		
27	L-ascorbate peroxidase 6	defense protein		
23	NADP-specific isocitrate dehydrogenase	oxidative stress		
21	NADP-dependent oxidoreductase P1	oxidative stress		
73	NADH-ubiquinone oxidoreductase	oxidative stress		
4	Ubiquinone oxidoreductase subunit 1	oxidative stress		
42	Oxygen-evolving enhancer protein 1	Photosystem II		
57	Oxygen-evolving enhancer protein 1	Photosystem II		
14	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis		
24	Xylulose kinase	Pentose phosphate pathway		
16	Aspartate aminotransferase	AA metabolism		
18	Dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	Pyruvate metabolism		
50	Dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	Pyruvate metabolism		
13	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Organelle biogenesis		
3	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	Organelle biogenesis		
20	Expressed protein	Unknown		
60	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	oxidative stress		
29	Diaminopimelate epimerase	AA metabolism		
5	Beta 7 subunit of 20S proteasome	Protein degradation		
38	26S proteasome regulatory particle non-ATPase subunit12	Protein degradation		
44	Proteasome subunit beta type 1	Protein degradation		
6	Unknown	Unknown		
9	Chitinase 1	defense protein		
36	Caffeoyl CoA O-methyltransferase	defense protein		
63	Isoflavone reductase homolog	Hormon		
41	Cytochrome P450, similar to CaCYP1	defense protein		
7	DNA-damage inducible protein	defense protein		
35	O-methyltransferase ZRP4-like	AA metabolism		
32	NAC domain-containing protein, similar to OsNAC6	Gene regulation		
12	Polyinositol-polyphosphate 5-phosphatase	Lipid metabolism		
59	TGB12K interacting protein-3 like	defense protein		
46	Peroxidase	defense protein		
48	Ascorbate Peroxidase	defense protein		
11	Glutathione transferase F5	oxidative stress		
62	Alcohol dehydrogenase III	Fermentation		
39	Malic enzyme	C3 and C4 cycle		
1	NADPH producing 6-phosphogluconate dehydrogenase	oxidative stress		
67	S-adenosylmethionine synthetase 1	Hormon		
71	S-adenosylmethionine synthetase 1	Hormon		
76	ENO2 MAIZE Enolase 2	Energy metabolism		
17	Zinc-binding protein	Gene regulation		
30	Translation elongation factor Tu	Translation		
52	Ras-related protein Rab11C	Unknown		
28	Ras_like_GTPase	Unknown		
33	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase	Hormon		
43	Ethylene-formine enzyme	Hormon		
58	12-oxophytodienoate reductase 3	Hormon		
61	12-oxo-phytodienoic acid reductase 1	Hormon		
54	DnaJ-C chaperone	Protein folding		
64	GATA transcription factor	Gene regulation		
51	Aldo-keto reductases	oxidative stress		
66	Adenosine kinase 2	defense protein		
75	Pyrophosphate-dependent phosphofructo kinase	oxidative stress		

Study 3 (Xiaoghui Zang et al, 2013)

Spot No	Protein name	Function	R	S
1	Rossmann-fold NAD(P)	Fermentation		
2	Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1	Photosystem II		
3	Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1	Photosystem II		
7	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	Photosynthesis		
10	superoxyde dismutase	oxidative stress		
11	superoxyde dismutase	oxidative stress		
48	Cu/Zn superoxyde dismutase	oxidative stress		
49	Nucleoside diphosphate kinase Group	C3 and C4 cycle		
50	Cu/Zn superoxyde dismutase	oxidative stress		
4	Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 1	Photosystem II		
5	Rossmann-fold NAD(P)	Fermentation		
6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis		
9	Manganese superoxide dismutase	oxidative stress		
12	Nucleoside diphosphate kinase Group	C3 and C4 cycle		
14	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain precursor	Photosynthesis		
15	Pathogenesis-related protein4	defense protein		
16	Pathogenesis-related protein4	defense protein		
17	20 kDa chaperonin, chloroplastic-like	Protein folding		
18	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	Photosynthesis		
19	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	Photosynthesis		
20	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	Photosynthesis		
21	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	Photosynthesis		
22	ND	ND		
23	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	Photosynthesis		
24	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic	Photosynthesis		
27	single-strand nucleic acid binding protein	Transcription		
28	single-strand nucleic acid binding protein	Transcription		
34	Nucleoside diphosphate kinase Group	Transcription		
46	wd40 domain	Transcription		
47	chitinase1	defense protein		
51	Cu/Zn super oxyde dismutase	oxidative stress		
52	Actin depolymerisation factor	Cytoskeleton Structure		

Our study (Cheinobi et al, 2014)

Our study					
Spot Id	Protein description Protein name	3 dai	7 dai	14 dai	Functional category
174	Pyruvate,orthophosphate dikinase				Pyruvate metabolism
215	plastid alpha-1,4-glucan phosphorylase (Pho1)				Polysaccharides catabolism
219	plastid alpha-1,4-glucan phosphorylase (Pho1)				Polysaccharides catabolism
322	Glutamine-tRNA synthetase				AA metabolism
358	HMW-glutenin Bv subunit				Storage protein
367	methionine-tRNA lease activity, ATP binding				AA metabolism
402	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial				Energy metabolism
487	Starch synthase 1, chloroplastic amyloplastic				Starch synthesis
502	Transketolase, thiamine diphosphate binding domain				Energy metabolism
506	Transketolase, thiamine diphosphate binding domain				Energy metabolism
684	Phosphoglucomutase				Glucose metabolism
715	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic				Energy metabolism
731	Succinate-CoA ligase activity				C3 and C4 cycle
770	Methylenetetrahydrofolate reductase				AA metabolism
823	glutathione-disulfide reductase activity				Energy metabolism
829	Acetohydroxyacid synthase				Energy metabolism
842	keto-acid reductoisomerase activity				AA metabolism
870	Pyruvate,orthophosphate dikinase				Pyruvate metabolism
959	Cytosolic glutathione reductase				Energy metabolism
980	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase				Starch synthesis
1032	glutathione-disulfide reductase activity				Energy metabolism
1061	Phosphoglycerate kinase, cytosolic				C3 and C4 cycle
1134	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase				Starch synthesis
1392	Low molecular weight glutenin subunit				Storage protein
1400	Glutamine synthetase				AA metabolism
1425	Asnartate aminotransferase/Glutamic oxaloacetic transaminase AAT1/GOT2				AA metabolism
1474	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydroxenase				Glycolysis
1478	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase				Glycolysis
939	transcription corepressor activity, phosphopyruvate hydratase activity				Glycolysis
1496	dTDP-glucose 4-6-dehydratase/UDP-glucuronic acid decarboxylase				Xylose biosynthesis
1548	Malate dehydrogenase				C3 and C4 cycle
1549	Aesthuum stearoyl-ACP desaturase				Fatty acid metabolism
1577	Hiah-molecular-weight glutenin subunit				Storage protein
1594	Fructose-bisohosphate aldolase				Glycolysis
1602	LMW-GS				Storage protein
1662	NAD-dependent malate dehydrogenase				C3 and C4 cycle
1733	S-malonyltransferase				Energy metabolism
1931	Globulin 1 OS				Storage protein
1991	SUGAR-1-PHOSPHATE GUANYL TRANSFERASE				Lipopolysaccharide biosynthesis
2034	SUGAR-1-PHOSPHATE GUANYL TRANSFERASE				Lipopolysaccharide biosynthesis
2064	oxidoreductase activity/NAD or NADH binding				Energy metabolism
2227	Aci-reductone-dioxoenase-like protein				AA metabolism
2346	lactoylglutathione lyase/metal ion binding				Energy metabolism
2448	Triticin				Storage protein
352	Molecular chaperone (HSP90 family)				Protein folding
379	Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases				Protein folding
435	Molecular chaperone (HSP90 family)				Protein folding
602	Phenylalanine ammonia lyase (PAL)				Stress and defense
628	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase				Protein folding
641	Heat shock protein 70				Protein folding
907	Chaperonin complex component. TCP-1 beta subunit (CCT2)				Protein folding
1173	Putative PDI-like protein				Cell redox homeostasis
2517	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase				Protein folding
2598	thioredoxin peroxidase activity/oxidoreductase activity/antioxidant activity				Stress and defense
2678	Response to stress				Stress and defense
414	Ribonucleotide reductase, barrel domain/ATP binding				DNA reolication
1021	Alpha tubulin-3A				Cytoskeleton Structure
1178	Mitochondrial translation elongation factor Tu				Translation
1222	ATP-dependent 5'-3' DNA helicase activity				DNA replication
1513	Mitotic spindle checkpoint protein BUB3, WD repeat superfamily				Cell Cycle
1634	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta				Translation
1797	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G				Translation
2464	Eukaryotic translation initiation factor 5A3				Translation
2471	Eukaryotic translation initiation factor 5A3				Translation
2576	Uncharacterized protein				Translation
2620	small subunit ribosomal protein S12e				Translation
3052	small subunit ribosomal protein S21e				Translation
2118	laminin receptor activity				Signaling
744	Vesicle trafficking protein Sly1 (Sec1 family)				Transport
1083	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism				Transport
2069	Voltage dependent anion channel (VDAC)				Transport
2139	Clathrin adaptor complex				Transport
1728	Polypeptide: ORF				uncharacterized

Up-regulated
Down-regulated
Specific to susceptible genotype
Common to our study
Common function

Supplementary Table 5S : Comparative analysis of three studies published in 2010, 2011 and 2013 on the interaction *Fg* / wheat interaction with our analysis

	Emmie Dornez et al, 2010		**Lina Ding et al , 2011**		**Xianghui Zang et al, 2013**		**Our study**	
	U	D	U	D	U	D	U	D
Metabolism	7	5	10	12	16	0	23	24
Stress and defense	3	9	13	7	10	0	6	9
DNA and gene regulation	0	0	3	0	4	0	2	3
Cell expansion	0	0	10	7	1	0	1	0
Transport	0	0	0	1	0	0	4	0