



HAL
open science

Effets de la septoriose foliaire sur la sénescence et les flux d'azote pendant le remplissage des grains chez le blé tendre

Rym Ben Slimane

► **To cite this version:**

Rym Ben Slimane. Effets de la septoriose foliaire sur la sénescence et les flux d'azote pendant le remplissage des grains chez le blé tendre. Agronomie. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0091 . pastel-00560282

HAL Id: pastel-00560282

<https://pastel.hal.science/pastel-00560282>

Submitted on 27 Jan 2011

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

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



Doctorat ParisTech

THÈSE

Pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement**

(AgroParisTech)

Présentée et soutenue publiquement par

Rym Ben Slimane

Le 15 décembre 2010

**Effets de la septoriose foliaire sur la sénescence et les flux d'azote
pendant le remplissage des grains chez le blé tendre**

Directeur de thèse: **Marie Odile Bancal**
Co-encadrement de la thèse: **Pierre Bancal**

Jury

M. Christophe Salon, directeur de recherches, INRA Dijon
M. Bernard Tivoli, ingénieur de recherches, INRA Rennes
M. Christian Lannou, directeur de recherches, INRA Grignon
Mme Nadine Brisson, directrice de recherches, INRA Avignon
M. David Gouache, ingénieur de recherches, Arvalis
M. Bertrand Ney, Professeur, SIAFEE, Agroparistech
M. Pierre Bancal, chargé de recherches, INRA Grignon

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Président du jury
Co-directeur de thèse

Remerciements

Je commence par un agréable devoir, celui de remercier tous ceux qui m'avaient aidée d'une façon ou d'une autre, ou encouragée au cours de cette thèse. Je remercie par la même occasion tous ceux qui ne sont peut être pas cités mais qui se reconnaîtront, et dont la présence ou intervention à un moment donné de la thèse était bénéfique.

Je commence par Marie-Odile et Pierre Bancal qui ont dirigé cette thèse. J'ai beaucoup appris à leurs côtés. Outre leurs qualités humaines, je salue la qualité de leur encadrement, leur disponibilité pour répondre à mes questions ou pour me relire mêmes pendant les périodes chaudes de leurs expérimentations, leur vigilance scientifique, ainsi que leur patience dans les corrections de mes écrits, suite aux nombreux allers-retours. Je leur remercie également pour avoir élargi les champs de mes compétences, pour les discussions fructueuses, et pour m'avoir laissé libre court pour participer aux formations et aux congrès. Je n'oublie pas les efforts et les démarches incontestables de Marie-Odile pour me retrouver les compléments de bourse, les aides financières, ainsi que le financement de la dernière année de thèse.

Je remercie Josianne Jean-Jacques pour sa rigueur technique, surtout pour le grand boulot d'analyses d'azote total et toutes les tâches s'y attendant depuis les expérimentations au champ, mais aussi je la remercie pour l'amie qu'elle a été pour moi. Son contact facile nous a permis de travailler pour une grande partie de la thèse côte à côte, dans une ambiance agréable, et de partager d'innombrables moments de bonne humeur et de complicité.

Je remercie également toute l'équipe technique de l'équipe plante: Emmanuelle Fovart pour ses conseils techniques, Maxime pour son aide dans l'énorme travail de broyages et autres tâches techniques, Alain Fortineau, Fabrice Duhamel et Julie Rodriguez pour leurs participations ponctuelles toujours dans la bonne humeur, et Florence Lafouge pour les discussions techniques. Merci à Pierre Belluomo pour les programmes OPTIMAS qu'il avait développé et adapté pour répondre à nos exigences. Je remercie Pascal Duprix pour la mise à exécution du dispositif de prise de photo.

Mes remerciements s'adressent également aux stagiaires qui ont dévalé depuis 2008, sans qui les expérimentations fastidieuses au champ n'ont pu être menées à bien. J'ai eu l'occasion d'en encadrer directement deux en 2008. Je remercie pour cela Marie-Odile. Je remercie également les stagiaires recrutés pour les dosages biochimiques, sous la direction de Pierre Bancal.

Je suis reconnaissante envers Frédéric Suffert pour les conseils et l'expertise en épidémiologie qu'il m'avait inculqué, et pour m'avoir sauvé une expérimentation qui a constitué un chapitre à part entière dans ma thèse. Un énorme merci pour la collaboration que j'ai trouvée agréable. J'ai côtoyé par la même occasion une partie de l'équipe technique de l'UMR BIOGER (équipe de pathologie des plantes), qui s'est montrée disponible, et collaborante. Evidemment, Christian Lannou a beaucoup facilité, directement ou indirectement, cette collaboration. Je lui suis reconnaissante.

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail: Christophe Salon, Bernard Tivoli pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, Christian Lannou, Nadine Brisson, et David Gouache pour avoir accepté d'examiner ce travail; et évidemment le président de jury Bertrand Ney. Je remercie sincèrement tous les membres de mon comité de

pilotage et notamment Céline Masclaux, Maxime Trottet, Frederic Suffert et Bertrand Ney pour les conseils prodigués au cours de nos réunions.

Je voudrais remercier Claudine Lauransot pour son efficacité dans les commandes d'article, ainsi que Marina Pavlidès pour les conseils de la gestion de la bibliographie. Toutes les deux ont assuré la bonne gestion du service bibliographique avec la gentillesse et la bonne humeur.

Je remercie vivement Enrique Barrioso pour m'avoir trouvé des compléments de bourse et accordé plusieurs avantages d'ordres social et administratif. Je n'oublierais pas de remercier Philippe Gate (Arvalis) pour m'avoir financé en grande partie la dernière année de la thèse.

Je remercie mes amis: Inès, Najla, Rim, Emna, Majed, Sylvia, Nicolas, Nawel, Abir, Achwak, Linda et Séjir pour les bons moments partagés ensemble, et pour leur soutien et leur écoute pendant mes moments difficiles. Je n'oublie pas mon collègue de bureau Patrick pour ses consolations pendant mes moments de détresse. Je remercie également mes collègues (Dominique, Sylvie Masson, Brigitte, Corinne Robert, Andrée Tuzet, Christophe Gigot, Emir Feiz, Pietro), pour la bonne humeur, leur sympathie et les discussions variées mais toujours fructueuses, partagées pendant les pauses. Je remercie également Romain Roche pour les discussions en statistiques qui m'avaient beaucoup aidée. Je voudrais aussi remercier Michel Burban pour sa gentillesse et pour les divers services qu'il m'avait rendus, et Christine Tual pour sa gentillesse permanente.

Un grand merci à mes très chers parents, mes frères, ma sœur, et ma famille en Tunisie, pour leur soutien au quotidien, un soutien sans faille, sans quoi je n'aurais pas pu tenir ces années. Je remercie ma tante Fouzia et Alain pour leur accueil toujours chaleureux à Paris, et pour les nombreux services qu'ils m'avaient rendus. Une pensée spéciale à l'âme de ma très chère grand-mère qui n'a cessé de compter les jours pour fêter ma réussite et mon retour définitif au pays, et qui malheureusement nous a quittés il y a quelque temps. Je lui dédie affectueusement cette thèse.

Sommaire

	Page
Introduction générale	1
Analyse bibliographique	7
I- Pathosystème étudié	9
1. La septoriose foliaire	9
a. Importance	9
b. Cycle biologique.....	9
c. Symptômes et nuisibilité.....	10
2. Cycle biologique du blé tendre	11
3. Fonctionnement du pathosystème	13
II- Métabolisme azoté d'une plante saine	13
A- Métabolisme azoté dans les plantes en cours de remplissage	14
1. Absorption et assimilation de l'azote inorganique	14
a. Absorption	14
b. Assimilation	14
2. Remobilisation de l'azote	15
a. Métabolisme azoté et recyclage pendant la sénescence foliaire	15
b. Contribution quantitative des différents organes à la remobilisation vers le grain	17
B- Régulation des flux d'azote au cours du remplissage	19
1. Flux d'azote à l'échelle de la plante	19
a. Régulation par les sources ou par les puits du remplissage du grain	19
b. Régulation hormonale de l'absorption et de la remobilisation	19
2. Flux d'azote à l'échelle du couvert	21
III- Sénescence foliaire chez les plantes saines	23
A- Généralités	23
1. Types de sénescence	23
2. Phases de sénescence	23
3. Mécanismes de sénescence	23
a. Echelle moléculaire	23
b. Echelles cellulaire et tissulaire	24
c. Echelle de la plante	24
B- Facteurs influençant la sénescence	24
1. Rôle des sucres, invertases et cytokinines	24
2. Interaction de l'azote avec les voies de signalisation	25
3. Interaction de la lumière avec les voies de signalisation	27
IV- Fonctionnement azoté des plantes malades	29
1. Effet des maladies foliaires sur l'absorption post-floraison	29
2. Effet des maladies foliaires sur l'assimilation de l'azote	29
3. Effets sur la remobilisation azotée	31
a) Modifications métaboliques de la remobilisation chez les feuilles malades	31
b) Remobilisation par les organes malades	33
c) Remobilisation par les organes non atteints	34
V- Effets des maladies foliaires sur la sénescence	37
A. Réactions incompatibles	37
B. Réactions compatibles	37
1. Cinétique de sénescence induite par les maladies	37
2. Différentes sénescences dans une feuille malade	38
a) Cinétique de sénescence locale	38
b) Cinétique de sénescence apicale	38
3. Perturbation des facteurs internes (sucres, hormones, azote).....	39
Références bibliographiques	43
Problématique	53

Chapitre 1: La vitesse de remobilisation azotée est régulée par le haut lorsque la disponibilité en azote varie pendant le remplissage. Article soumis à *Annals of Botany*: “Nitrogen remobilisation rate is up regulated while varying nitrogen availability during grain filling in wheat”

Abstract	57
Introduction	58
Materials and methods	59
1-Field experiment	59
2-Sample proceeding	59
3-Blade enzymatic activities	60
Results	61
1-Green area evolution	61
a-Chlorophyll	61
b-Green area and absorbed PAR	63
2-DM evolution	63
3-Evolution of total nitrogen amount	64
4-Evolution of nitrogen-related metabolite contents and enzyme activities.....	67
Discussion	68
1-Effect of blade wrapping	68
2-Effects of treatments on DM fluxes	68
3-Effects of treatments on N fluxes	69
4-Conclusion	70
Acknowledgements	71
Références bibliographiques	72

Chapitre 2: Les lésions provoquées sur la feuille drapeau du blé par une inoculation locale de septoriose (*Mycosphaerella graminicola*) accélèrent-elles sa sénescence apicale? Version préliminaire d’un article à soumettre à *Plant Pathology*: “Does *Septoria tritici* blotch lesions induced by a localized *Mycosphaerella graminicola* inoculation accelerate apical senescence of winter wheat flag leaf?”

Abstract	77
Introduction	78
Materials and methods	79
1-Greenhouse experimental design	79
2-Plants preparation	80
3-Inoculum preparation and inoculation	80
4-Diseased and senescent areas assessment	80
5-Image analysis	81
6-Statistical analyses and data transformation	81
Results	82
1. Diffuse senescence	83
2. Senescence around inoculated area	83
3. Apical senescence	85
Discussion	88
Conclusion and perspectives	90
Références bibliographiques	91

Chapitre 3: Effets de la dose et de la date des fertilisations azotées sur les cinétiques de la septoriose foliaire (*Mycosphaerella graminicola*) et de la sénescence apicale du blé d’hiver (*Triticum aestivum*) en conditions naturelles

Introduction	97
Matériels et méthodes	98
1. Matériels	98
a. Les plantes	98
b. Les champignons	98

2. Dispositifs expérimentaux	99
a. Essais agricoles	99
b. Inoculation au spray en 2008	100
c. Inoculation au pinceau en 2009	100
3. Suivi de la sénescence foliaire	101
a. Plantes inoculées en 2009	101
b. Autres plantes	101
4. Traitement des données et analyses statistiques	102
a. Cinétiques de sénescence	102
b. Analyses de variance	102
Résultats	102
A. Epidémies naturelles	102
1. Epidémie 2008	103
a. Caractérisation agronomique des peuplements à l'anthèse	103
b. Cinétiques de sénescence	104
c. Paramètres des ajustements	106
2. Epidémie 2009	108
a. Caractérisation agronomique des peuplements à l'anthèse	108
b. Cinétiques de sénescence	108
c. Paramètres des ajustements	110
B. Inoculation au champ	112
a. Données brutes	112
b. Cinétiques de sénescence	114
c. Paramètres des ajustements	115
Discussion	117
Références bibliographiques	119

Chapitre 4: Métabolisme azoté et remplissage en azote des grains chez le blé d'hiver (*Triticum aestivum*) attaqué au champ par la septoriose foliaire (*Mycosphaerella graminicola*)

Introduction	123
Matériels et méthodes	124
1. Le matériel végétal	124
a. Caractérisation des variétés utilisées	124
b. Modalités expérimentales	125
c. Traitements phytosanitaires	125
2. Les prélèvements et mesures réalisées	125
a. Prélèvements de placettes	125
b. Prélèvements de brins moyens	125
c. Mesure des surfaces foliaires	126
d. Mesure des activités enzymatiques liées au métabolisme azoté pendant le remplissage du grain	126
3. Traitement des données et analyses statistiques	126
a. Normalisation des données par le NGE	126
b. Interpolations selon le temps depuis l'anthèse	127
c. Calcul de l'efficacité d'utilisation de la lumière (RUE)	127
d. Analyse statistique	128
Résultats	128
Généralités	128
1. Etat des capteurs photosynthétiques	129
a. Cinétique des surfaces vertes totales	129
b. Sénescence des différents étages foliaires	130
c. Chlorophylle des feuilles	131
2. Effet des traitements sur les cinétiques de matière sèche	132
a. Effets de la variété et de la conduite agricole	132

b. Effets des fongicides	133
3. Effet des traitements sur les cinétiques d'azote	134
a. Azote des parties aériennes et absorption post floraison	134
b. Azote des parties végétatives et remobilisation	135
c. Azote des grains et remplissage	136
d. Effet des fongicides sur l'azote des différents organes végétatifs	137
4. Effet des fongicides sur les flux d'azote et activités enzymatiques des feuilles	138
a. Evolution du contenu en azote des feuilles 1, 2 et 3 selon le traitement fongicide	138
b. Activités enzymatique par feuille et par unité de chlorophylle	139
Analyse globale.	139
Analyse par période.	140
c. Relations entre flux d'azote et indicateurs métaboliques	141
d. Indicateurs intégrés	143
Discussion	144
1. Comparaison des expérimentations 2007 et 2008	145
2. Comparaison plantes saines et malades: le fonctionnement azoté des feuilles atteintes par la septoriose est-il très modifié par rapport aux feuilles saines ?	148
Références bibliographiques	151
Conclusion générales et perspectives	155
ANNEXES	159

Liste des figures

Introduction générale:

Figure 0: Modèle conceptuel des relations entre plante-hôte et agents pathogènes 4

Analyse bibliographique:

Figure 1: Représentation schématique du développement polycyclique de *M. graminicola* (d'après Caron, 2000) 8

Figure 2: Phases de développement d'une plante de blé 12

Figure 3: Schéma du métabolisme azoté dans une plante de blé (processus par compartiment cellulaire dans les feuilles jeunes et les feuilles sénescentes) 16

Figure 4: Récapitulation sur la régulation des relations source/puits pendant le remplissage du grain suite à des manipulations artificielles des sources (défoliation), des puits (égrainage), des sources et des puits (ombrage) 18

Figure 5A: Hypothèse sur la régulation de la relation entre l'absorption et la remobilisation d'N en conditions de satiété (d'après Barneix, 2007) 20

Figure 5B: Hypothèse sur la régulation de la relation entre l'absorption et la remobilisation d'N en conditions de carence en N (d'après Barneix, 2007) 20

Figure 6: Progression de la sénescence au niveau d'une feuille, avec les différentes classes des gènes SAG (Senescence Associated Genes) (d'après Buchanan-Wollaston, 1997) 22

Figure 7: Régulation hormonale de la sénescence à l'échelle foliaire (d'après Schippers et al., 2007) 26

Figure 8: Régulation de la sénescence à l'échelle foliaire: action et interaction des facteurs endogènes et exogènes majeurs 28

Figure 9: Schéma simplifié des voies nécessaires pour l'expression des gènes au cours de la sénescence (d'après Buchanan-Wallaston et al., 2003) 30

Figure 10: Récapitulation des différents gradients métaboliques, hormonal et de la lumière observés pendant la sénescence foliaire dans une plante dans le couvert (d'après Masclaux et al., 2000) 32

Figure 11: État de l'art de l'impact d'une maladie foliaire sur le métabolisme N chez une graminée pendant le remplissage du grain 36

Figure 12: Régulation de la sénescence foliaire dans le cas d'un pathogène biotrophe 40

Figure 13: Schéma hypothétique du mode d'action d'un pathogène biotrophe sur la sénescence par la voie des sucres (d'après Walters et McRoberts, 2006) 40

Figure 14: Régulation de la sénescence foliaire dans le cas d'un pathogène nécrotrophe.. 42

Chapitre 1:

Figure 1-1: Green area evolution within the 0.8 NNI crop 62

Figure 1-2: Dry mass developments (g.culm^{-1}) in the 0.8 NNI crop 63

Figure 1-3: Nitrogen developments (mg.culm^{-1}) in the 0.8 NNI crop 66

Chapitre 2:

Figure 2-1: Dispositif de prises de vues numériques..... 81

Figure 2-2: Evolutions de la sénescence à l'apex (sa) et autour de la zone inoculée (da) d'une feuille 82

Figure 2-3: Box plots for area of diffuse senescence (da) by control (A,C) and inoculated plants (B,D) 83

Figure 2-4: Box plots for senescence area around inoculation zone (sa) for each cultivar .. 84

Figure 2-5: Data for senescence area around inoculation zone (sa). A: evolution of sa by four individual plants (cv. Soissons; i2 isolate) and corresponding logistic fitting. B,C,D Box plot of logistic parameters for each cultivar	84
Figure 2-6: Box plots for area of apical senescence (aa) by control (A,C) and inoculated plants (B,D)	86
Figure 2-7: Rapport des sénescences apicales entre brin inoculé et témoin correspondant selon la sévérité à différentes dates après inoculation: 768 °Cd (A), 932°Cd (B), 1058 °Cd (C) et 1153 °Cd (D)	86
Figure 2-8: A, B: evolution of aa and corresponding exponential fitting by four control plants (A) and four i2 inoculated plants cv. Soissons (B). C, D, E, F Box plot of logistic parameters for each cultivar in control (C, E) and inoculated (D, F) plants	87

Chapitre 3:

Figure 3-1: Evolution de la teneur azotée des feuilles en 2008	104
Figure 3-2: Surface malade et sénescence apicale au dernier point valide en 2008	105
Figure 3-3: Paramètres obtenus par ajustements exponentiels de la surface malade (à gauche) et de la sénescence apicale (à droite) en 2008	106
Figure 3-4: Corrélation entre le taux de croissance de la surface malade mR et celui de la sénescence apicale aR en 2008	107
Figure 3-5: Surface malade et sénescence apicale au dernier point valide en 2009	109
Figure 3-6: Paramètres obtenus par ajustements exponentiels de la surface malade (à gauche) et de la sénescence apicale (à droite) en 2009	111
Figure 3-7: Sénescence totale (maladie + apicale) au dernier point valide sur les feuilles inoculées en 2009	112
Figure 3-8: Temps au dernier point valide sur les feuilles inoculées en 2009 en dJA à gauche et en dJI à droite	113
Figure 3-9: Surface malade et sénescence apicale au dernier point valide en 2009	113
Figure 3-10: Paramètres obtenus par ajustements de la surface malade (en haut) et de la sénescence apicale (en bas) après inoculation en 2009	115
Figure 3-11: Corrélation entre la maladie et le taux exponentiel de la sénescence apicale aR après inoculation en 2009	117

Chapitre 4:

Figure 4-1: Evolution des surfaces vertes, en cm ² /brin, chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B)	129
Figure 4-2: Corrélation entre chlorophylle et surface verte en 2008	131
Figure 4-3: Evolution de la MS des parties aériennes (A, B) et des grains (C, D) en fonction du temps thermique chez Soissons selon l'ITK traité (A, C) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B, D)	132
Figure 4-4: Evolution de la MS des parties aériennes en fonction du rayonnement intercepté chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B)	133
Figure 4-5: Evolution de l'azote total des parties aériennes chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B)	134
Figure 4-6: Evolution de l'azote total des parties végétatives chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B)	135
Figure 4-7: Evolution de l'azote total des grains chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B)	136
Figure 4-8: Evolution de l'azote total dans les différents organes des parties végétatives chez Soissons sous 2008.3 selon le traitement fongicide: limbes des feuilles (A), gaines des feuilles (B), tige (C) et balle de l'épi (D)	138

Figure 4-9: Evolution de l'azote total dans les limbes des feuilles chez Soissons sous 2008.3 selon le traitement fongicide: feuilles de rang 1(A), 2 (B), et 3 (C) 139

Figure 4-10: Relation entre contenu en azote des feuilles et indicateurs métaboliques fortement corrélés: chlorophylle (A), protéines Bradford (B), activité GS (C), et GDHd pendant les périodes 1 (en bleu), 2 (en rose) et 3 (en vert) 142

Figure 4-11: Relation entre contenu en azote des feuilles et indicateurs métaboliques peu ou pas corrélés: GDH aminante (A), endoprotéases (B) et NR (C) 142

Figure 4-12: Relation entre azote absorbé pendant le remplissage et intégration des activités enzymatiques NR (A), GDH dé-aminante (B) et GDH aminante (C) 143

Figure 4-13: Relation entre azote remobilisé depuis les feuilles et intégration des activités enzymatiques GS (A), GDH dé-aminante (B) endoprotéases (C), et GDH aminante (D) 144

Liste des tableaux

Chapitre 1

Table 1-1. Multiple ANOVA for Chlorophyll AUPC after 121 °Cd	61
Table 1-2. Effect of blade treatments throughout the grain filling as extracted from multiple ANOVA on DM in the various organs	64
Table 1-3. Effect of blade treatments throughout the grain filling as extracted from multiple ANOVA on N in the various organs	65
Table 1-4. Paired sample comparisons to control for the various nitrogen-related metabolite contents and enzyme activities	67

Chapitre 2

Table 2-1: Classification of isolates virulence on the cultivars	79
---	----

Chapitre 3

Tableau 3-1: Caractéristiques des feuilles inoculées en 2009	101
Tableau 3-2: ANOVA des effets des conduites agricoles (ITK) et des traitements fongicides (Fon) sur les paramètres des peuplements obtenus en 2008 à l'anthèse	103
Tableau 3-3: Ajustement des surfaces sénescentes en 2008	105
Tableau 3-4: ANOVA multifactorielle des effets de l'étage foliaire (Str), des conduites agricoles (ITK) et des traitements fongicides (Fon) sur les ajustements exponentiels des sénescences en 2008	107
Tableau 3-5: ANOVA des effets des conduites agricoles (ITK) et des traitements fongicides (Fon) sur les paramètres des peuplements obtenus en 2009 à l'anthèse	108
Tableau 3-6: Ajustement des surfaces sénescentes en 2009	109
Tableau 3-7: ANOVA multifactorielle des effets de l'étage foliaire (Str), des conduites agricoles (ITK) et des traitements fongicides (Fon) sur les ajustements exponentiels des sénescences en 2009	111
Tableau 3-8: Pente des relations constatées entre surface malade et sénescence apicale à différents moments après l'inoculation	114
Tableau 3-9: Ajustement des surfaces sénescentes après inoculation en 2009	114
Tableau 3-10: ANOVA multifactorielle des effets de l'étage foliaire (Str), des conduites agricoles (ITK) et du mode d'inoculation (Inoc) sur les ajustements de la maladie et de la sénescence apicale après inoculation en 2009	116

Chapitre 4

Tableau 4-1: Caractéristiques des variétés Soissons et Bastide	124
Tableau 4-2: Désignation des modalités expérimentales	125
Tableau 4-3: NGE moyen (moyenne \pm écart type) par modalité expérimentale	127
Tableau 4-4: INN à l'épiaison (moyenne \pm écart type) par modalité expérimentale	128
Tableau 4-5: ANOVA multifactorielle des effets de la variété (Cv), des conduites agricoles (ITK) et des fongicides (Fon) sur les paramètres obtenus ajustements logistique de la surface verte par brin	129
Tableau 4-6: Point d'inflexion (djA) des trois feuilles supérieures	130
Tableau 4-7: Vitesse de croissance en MS ($\text{mg}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$) des parties aériennes et des grains pendant la phase linéaire par modalité expérimentale	133
Tableau 4-8: Vitesse d'absorption d'azote ($\mu\text{g}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$) par les parties aériennes selon la période pour chaque modalité expérimentale	135

Tableau 4-9: Azote remobilisé entre 0 et 800 djA depuis les parties végétatives en mg/ brin et en % de l'azote présent à la floraison selon les modalités expérimentales	136
Tableau 4-10: Vitesse de remplissage des grains en azote entre 200 et 400 djA, puis vitesse entre 600 et 800 djA en % de la précédente selon les modalités expérimentales	137
Tableau 4-11: ANOVA multifactorielle des effets de la date de prélèvement (Pt), de la variété (Cv), des conduites agricoles (ITK), des fongicides (Fon) et de l'étage foliaire (Str) sur les contenus en chlorophylle, protéines et nitrates (mg/feuille) et les activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme de l'azote (NR, GDHd, GDHa, GS, EndoP) au cours du remplissage du grain	140
Tableau 4-12: Analyse des différences entre brins traités ou non par comparaison d'échantillons appariés selon la période et l'étage foliaire (F1, F2 et F3)	141
Tableau 4-13: Comparaison des variations par rapport au témoin des éléments déterminant les flux de carbone et d'azote dans les grands processus (absorption, remobilisation, remplissage), ainsi que des marqueurs du métabolisme azoté au cours des expériences de 2007 et 2008	146

Liste des annexes

ANNEXE I: Acte de colloque: Regulation of Grain N Accumulation in Wheat	161
ANNEXE II: Poster 1: Regulation of Grain N Filling in Wheat	172
ANNEXE III: Poster 2: Impact of septoria disease on apical senescence in wheat	173
ANNEXE IV: Dosage des acides aminés par le TNBS en microplaque	174
ANNEXE V: Protocole de dosage des chlorophylles en microplaques	175
ANNEXE VI: Protocole de dosage des nitrates en microplaque	176
ANNEXE VII: Protocole de dosage des protéines en microplaque	177
ANNEXE VIII: Dosage de l'activité NR en microplaque	178
ANNEXE IX: Protocole de dosage de l'activité GS en microplaque	179
ANNEXE X: Protocole de dosage de l'activité GDH aminante en microplaque	180
ANNEXE XI: Protocole de dosage de l'activité GDH dé-aminante en microplaque	181
ANNEXE XII: Protocole de dosage des activités endoprotéases neutres en microplaque ...	182
ANNEXE XIII: Moyenne et écart-types obtenus par les ajustements logistique de la surface verte (cm ² /brin) selon les différentes modalités expérimentales de l'expérimentation de 2008 au champ	183
ANNEXE XIV: Valeurs moyennes et écarts-types (en italique) des contenus en azote des feuilles 1, 2 et 3 pour chaque modalité (variété x traitement azoté x traitement fongicide) depuis la floraison jusqu'à maturité physiologique.....	184

Introduction générale

Introduction générale

Le contexte agro-environnemental actuel des cultures de blé se caractérise par une double contrainte: la réduction de l'utilisation des pesticides et l'amélioration de la teneur en protéines des grains.

L'utilisation des pesticides devrait être réduite en raison des risques de pollution des eaux et des sols, de la résistance induite des pathogènes et du coût de la lutte chimique pour les agriculteurs. Dans cette ligne, la loi de programmation relative au Grenelle de l'environnement a fixé l'objectif de réduire de moitié les usages des produits phytopharmaceutiques d'ici 2018 (Anonyme, 2007). Cependant, le raisonnement de la lutte chimique devrait être déployé avec d'autres éléments de lutte: variétés résistantes, raisonnement des pratiques agronomiques: conduite azotée des parcelles, choix des dates et densités de semis (Gouache *et al.*, 2009; Ney *et al.*, 1998)...

D'autre part, la teneur en protéines du blé tendre, qui constitue un critère de base pour se positionner sur les marchés intérieurs français et internationaux, est relativement faible en France; elle varie aux alentours de 11% (11.1% en 2000, 10.8% en 2001, 11.3% en 2009) (Anonyme, 2009). Or pour être commercialisable à l'international, les blés doivent avoir une teneur en protéines supérieure à 11.5%. Pour augmenter la teneur en protéines, les seules possibilités d'action de l'agriculteur restent le choix variétal et la fertilisation azotée. Il est possible d'améliorer la nutrition azotée en jouant sur la dose et le fractionnement des apports azotés. Concernant la dose, le calcul des bilans prévisionnels s'impose, ainsi que le fractionnement de la dose totale en trois apports. Le premier apport au moment du tallage est allégé et un dernier apport est conseillé autour du gonflement. Cet apport tardif permet d'augmenter la teneur protéique des grains mais il joue aussi sur celle des feuilles ce qui pourrait favoriser l'apparition de maladies de fin de cycle tel que la septoriose du blé (*Mycosphaerella graminicola*) (Leitch et Jenkins, 1995).

Finalement, la réduction de l'utilisation des pesticides ou l'amélioration de la teneur en protéines des grains nécessitent des critères de diagnostic et une prédiction fiable de la nuisibilité des agents pathogènes. La conception de méthodes de diagnostic et d'évaluation de la nuisibilité repose sur la connaissance et la modélisation de l'action des agents pathogènes sur le fonctionnement de la culture (Ney *et al.*, 1998).

Dans un souci de comprendre et de modéliser les interactions entre les métabolismes carboné et azoté et les maladies foliaires du blé, l'équipe plante (UMR Environnement et Grandes Cultures) a construit un modèle conceptuel des interactions hôte×pathogène (figure ci-contre). Ce modèle aborde l'effet de la maladie sur la plante, l'effet de l'environnement du pathogène généré par l'état des feuilles et l'architecture du couvert, la mise en place de la structure du couvert, et les relations avec l'environnement physique du pathogène. Mon travail de thèse s'intègre dans le premier axe qui vise à évaluer la nuisibilité quantitative (perte de rendement) et qualitative (effet sur le remplissage du grain en N) des maladies foliaires du blé. Si les pertes de rendement en matière sèche sont bien modélisées à ce jour, la formation du rendement en N est encore mal comprise. D'où l'intérêt de ma thèse qui servira à alimenter le modèle des flux d'N dans les plantes malades. Mon projet porte principalement sur les déterminants du remplissage du grain en N dans les plantes malades notamment dans le cas de la septoriose foliaire (*Mycosphaerella graminicola*), l'une des maladies les plus fréquentes et les plus pénalisantes pour le blé en France.

Ce travail s'organise autour de quatre chapitres de résultats: un premier chapitre qui a pour objectif de clarifier le déterminisme de la remobilisation et du remplissage N des grains chez

le blé en conditions de variations de disponibilité d'azote par manipulations des sources (emballage et ablation de feuilles).

Deux chapitres sont consacrés pour répondre à l'hypothèse de la sénescence apicale accélérée par la septoriose. Dans le chapitre II, des inoculations localisées ont été réalisées sur les feuilles drapeau en conditions contrôlées en serre, tout en croisant la variabilité génétique des plantes et celle des isolats de champignon. Quant au chapitre III, il tente d'aborder le sujet en conditions naturelles, en impliquant des conduites de fertilisation azotée différentes et en comparant la sensibilité des feuilles 1 et 2. Le dernier chapitre caractérise les effets de la septoriose sur le métabolisme azoté de la feuille en lien avec la baisse de surface verte et ses répercussions sur le remplissage des grains en azote sous des conduites agricoles contrastées, tout en essayant d'extrapoler les résultats du chapitre I.

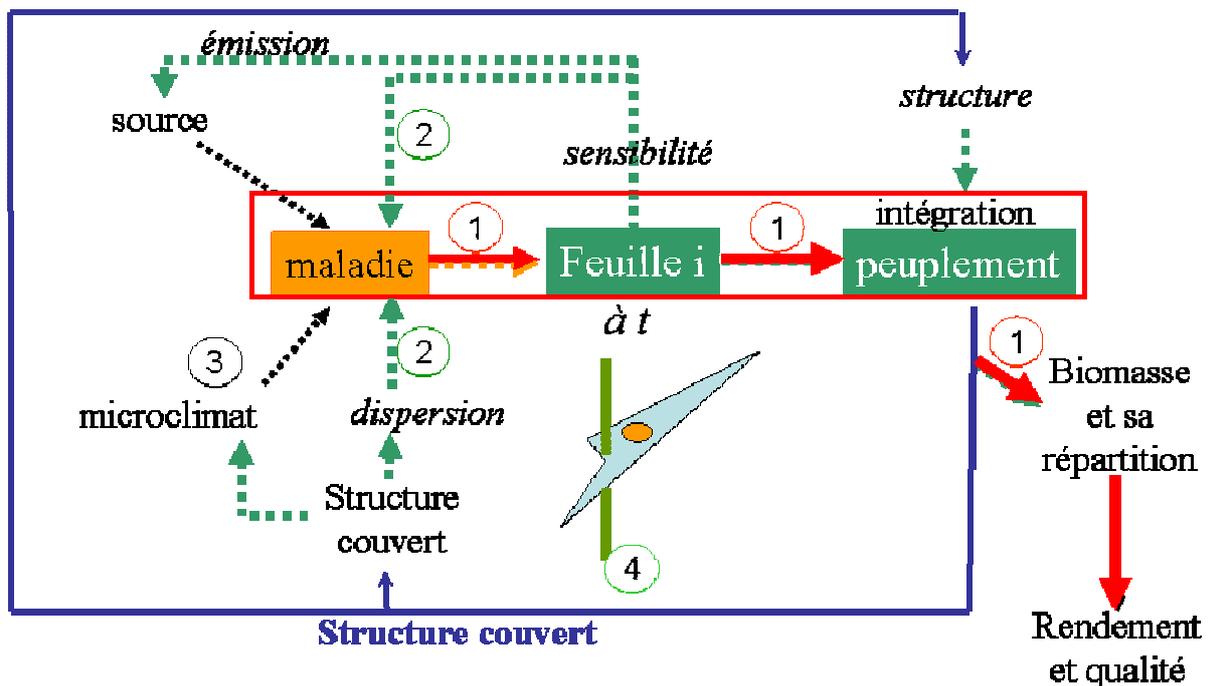


Figure 0: *Modèle conceptuel des relations entre plante-hôte et agents pathogènes*

Les chiffres 1, 2, 3 et 4 désignent les axes de recherche de l'équipe Plante:

Axe 1: Effet de la maladie sur la plante

Axe 2: Effet de l'environnement du pathogène généré par l'état des feuilles et l'architecture du couvert

Axe 3: La mise en place de la structure du couvert

Axe 4: Les relations avec l'environnement physique du pathogène

Références bibliographiques:

Anonyme (2007). Relevé de la troisième partie de la table ronde 6- Programmes « Agriculture écologique et productive et valorisation durable de la ressource forestière » in: Rapports des tables rondes finales du « Grenelle Environnement »

http://www.legrenelle-environnement.fr/IMG/pdf/Fiche_6.pdf

Anonyme (2009). Grandes cultures céréalières. Ile de France: Chiffres clés 2008/09. Prévisions 2009/10.

http://www.franceagrimer.fr/informations/publications/F-GC-ble/plaq_reg_09/Ile-de-France2009.pdf

Gouache D, Andrieu B, Bancal MO, Bancal P, Chelle M, Fournier C, Gate P, Robert C, Ney B (2009). Modélisation des interactions épidémie-couvert végétal: de la recherche à la mise au point d'outils opérationnels pour la protection intégrée des cultures. In: AFPP (eds), 9ème conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours.

Leitch MH, Jenkins PD (1995). Influence of nitrogen on the development of *Septoria* epidemics in winter wheat. *Journal of Agricultural Science*, **124**: 361-368.

Ney B, Tivoli B, Bancal MO (1998). Effets des agents pathogènes sur le fonctionnement de la plante et des populations cultivées. Modélisation de leur nuisibilité. In: INRA-Editions, Les colloques (eds), Fonctionnement des peuplements végétaux sous contraintes environnementales. Paris, pp 481-496

*Analyse
bibliographique*

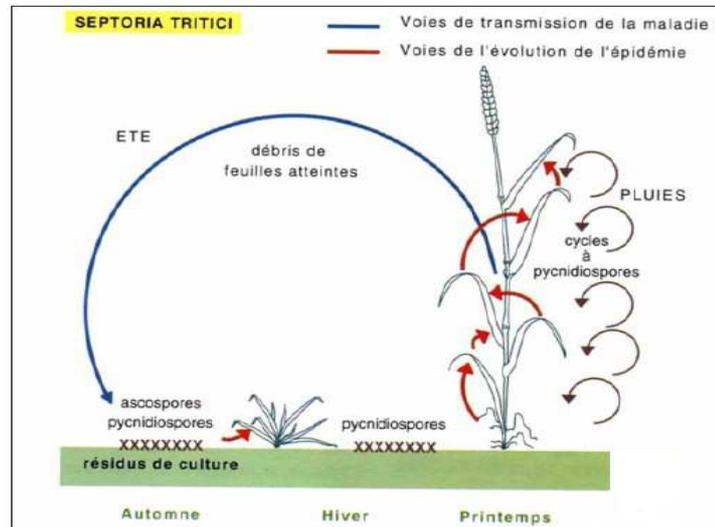


Figure 1: Représentation schématique du développement polycyclique de *M. graminicola* (d'après Caron, 2000).

Au printemps, plusieurs cycles à pycnidiospores ont lieu sur les feuilles d'une plante de blé permettant la propagation de bas en haut de la maladie jusqu'à la feuille drapeau. C'est grâce aux éclaboussures de pluie que cette propagation a lieu sur les étages foliaires. En été, les débris de feuilles atteintes seraient le siège de formation des fructifications sexuées. Celles-ci ainsi que les pycnidiospores qui résident dans les résidus de récolte vont inoculer de nouveaux plants de blé en automne et en hiver.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans la première partie introductive, je présenterai les principales caractéristiques de la septoriose, son cycle biologique, ainsi que le cycle biologique de la plante-hôte, le blé tendre afin de caractériser les phases de la culture de blé les plus sensibles à la maladie, ce qui va se répercuter sur le rendement et la qualité des grains. Je décrirai ensuite le métabolisme azoté pendant le remplissage chez les plantes saines ainsi que sa régulation aux différentes échelles: organes, plantes, couvert. Dans une troisième partie, j'aborderai la sénescence foliaire pour en préciser également les processus, et les modes de sa régulation aux différentes échelles. Puis, une quatrième partie sera consacrée aux modifications du fonctionnement azoté entraînées par les maladies foliaires. La dernière partie traitera de la sénescence induite par les maladies et de sa cinétique, dans le cas de réactions 'compatibles' et 'incompatibles', ainsi que sa régulation selon la nature du pathogène.

I- Pathosystème étudié

1. La septoriose foliaire

a. Importance

On distingue deux principales formes de septorioses, maladies fongiques du blé. En France, la septoriose des épis est surtout présente dans les zones continentales alors que celle des feuilles l'est principalement dans le nord-ouest et sur les bordures maritimes où le champignon trouve des conditions climatiques favorables à son développement (Caron, 2000). Bien que la septoriose des épis ait été l'espèce prédominante en France jusqu'aux années 80, la septoriose foliaire l'a remplacée depuis, en Europe et notamment en France et en Angleterre, sans doute pour des raisons écologiques (Bearchell *et al.*, 2005). Les septorioses, champignons ascomycètes, ont d'abord été décrites sous leur forme anamorphe (filaments mycéliens permettant la reproduction asexuée). Puis quand leur cycle a été mieux défini, on les a associées à des formes parfaites. C'est ainsi que la septoriose des épis correspond à *Phaeosphaeria nodorum* (Müller) Hedjaroude [anamorphe: *Stagonospora nodorum* (Berk.) Castellani et Germano], tandis que la septoriose foliaire est *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schröter [anamorphe: *Septoria tritici* Roberge].

L'importance économique de la septoriose foliaire découle des pertes de rendement importantes qu'elle occasionne sur le blé, quand les trois dernières feuilles sous l'épi qui participent majoritairement au remplissage du grain, sont sévèrement touchées à partir de la fin de montaison.

b. Cycle biologique

Mycosphaerella graminicola, est un champignon hémibiotrophe, car après une première phase biotrophe où l'infection se déroule sans détérioration des tissus hôtes, survient la phase nécrotrophe pendant laquelle les tissus colonisés commencent à mourir.

Le cycle du champignon est assez complexe (figure 1): Les infections primaires sont causées par les ascospores, libérées dans l'air à l'automne à partir des périthèces formées sur les résidus de culture (Shaw et Royle, 1989). Au printemps, plusieurs cycles à pycnidiospores ont lieu sur les feuilles d'une plante de blé. Les pycnidiospores sont adaptées à la dissémination à courte distance, typiquement d'une feuille âgée en bas de la plante vers une feuille jeune du haut de la même plante ou d'une plante voisine. La maladie progresse ainsi par infections

successives jusqu'à la feuille drapeau, d'où la qualification de la septoriose de maladie à gradient, et de maladie polycyclique. Les pycnidiospores libérées en présence d'humidité constituent donc le moteur de l'épidémie. Plus loin dans ce texte, on les appellera 'spores' par facilité.

- **La germination des spores:** La germination des spores a lieu si les conditions environnementales sont favorables, notamment en présence d'eau libre sur les feuilles, de températures élevées (entre 10 et 25°C avec un optimum aux alentours de 20°C) et d'humidité relative à saturation de 15 à 20 heures (Magboul *et al.*, 1992). Le tube germinatif pénètre dans l'épiderme de la feuille, le plus souvent, à travers les stomates (Kema *et al.*, 1996b). L'infection commence quand le pathogène s'installe dans les tissus colonisés.
- **La période de latence:** Il existe une polémique sur la définition de la période de latence, si elle s'étend depuis la germination des spores jusqu'à l'apparition des chloroses, des nécroses ou des premières structures sporulantes (Lovell *et al.*, 2004), apparitions qui sont décalées de quelques jours. Une estimation standard de cette période ne peut de toute façon pas être établie à cause de la non standardisation des conditions expérimentales utilisées dans les diverses études (choix des variétés de blé et degré de sensibilité; étude en serre ou au champ; techniques d'inoculation; méthodes de mesure) et de la diversité des souches pathogènes testées (Shaw, 1990; Lovell *et al.*, 2004). Ce qu'on cherche à caractériser, c'est la phase biotrophe du développement du champignon, où la progression mycélienne s'effectue plutôt lentement et de façon peu destructrice dans les espaces intercellulaires. La durée de la phase de latence donne le rythme des épidémies: dans le cas de la septoriose des feuilles, elle est longue, de 200 à 400 dj base zéro depuis la contamination (Lovell *et al.*, 2004). Dans le cas du blé, cette durée correspond à peu près au temps entre l'émission de la dernière feuille et la floraison.
- **La sporulation:** La fin de la latence correspond à l'entrée en phase nécrotrophe. Le développement du champignon s'intensifie et conduit à la destruction des parois cellulaires (Keon *et al.*, 2007). Elle conduit rapidement à la phase de sporulation, qui correspond à l'émission de pycnidiospores, des spores filiformes de 50 - 80 μm de long et de moins de 5 μm de diamètre. Ces dernières, produites dans les pycnides, sont exsudées sous forme d'un amas mucilagineux nommé 'cirrhe' qui les protège des conditions climatiques défavorables (Eyal *et al.*, 1987).
- **La dispersion:** Les pycnidiospores représentent la forme majoritairement responsable de la dispersion de la maladie pendant la saison de culture. Les cirrhes, quoique protégeant les pycnidiospores, les alourdissent et ne leur permettent pas d'être transportés en suspension dans l'air. Ce sont les éclaboussures de pluies qui les projettent vers les étages foliaires supérieurs du blé (Eyal *et al.*, 1987), assurant ainsi de nouveaux cycles de la maladie. Cette dispersion est une deuxième phase clé dans le développement épidémique de cette maladie et va fortement dépendre de la fréquence et de l'intensité des pluies de printemps. Des caractéristiques liées au couvert végétal (densité de feuilles, distances entre organes et vitesse d'émission des feuilles) permettent de minimiser ou maximiser les probabilités de contact entre couvert et inoculum (Lovell *et al.*, 1997; Savary *et al.*, 1995).

c. Symptômes et nuisibilité

Les symptômes provoqués par *M. graminicola* apparaissent successivement sous forme de chloroses, taches de couleur vert clair, avant d'évoluer en taches brunâtres appelées nécroses. Ces nécroses finissent par se fondre les unes dans les autres (coalescence). Ensuite, apparaissent sur ces nécroses les pycnides, fructifications noires à peine visibles à l'œil nu. La nuisibilité de la septoriose en terme de pertes de photosynthèse, croissance ou rendement a été

étudiée par plusieurs équipes de recherche (Shtienberg *et al.*, 1990; Shtienberg, 1992; Robert *et al.*, 2006) et convergent pour dire que la baisse de production à chacune de ces échelles est quasi proportionnelle à la baisse de surface verte des tissus malades. On peut aussi définir une nuisibilité qualitative, exprimant l'impact de la maladie sur la teneur en protéines des grains récoltés. Comme l'impact des maladies n'est pas identique pour le carbone et l'azote, celles-ci peuvent aboutir à des diminutions, constances voire augmentations de cette teneur (Bancal *et al.*, 2008). A cause de l'importance économique de la teneur protéique des grains, la nuisibilité qualitative de la septoriose nécessite d'être approfondie car, comme pour la plupart des maladies ou ravageurs, elle est bien moins étudiée (Savary *et al.*, 2006).

2. Cycle biologique du blé tendre

Selon Gate (1995) le cycle de développement du blé peut être divisé en quatre phases principales (figure 2):

- **Levée:** elle se déroule à l'automne, à partir du semis, et correspond aux étapes suivantes: germination, élongation du coléoptile puis croissance de la première feuille. Le brin maître (celui qui est issu du grain) poursuit sa croissance jusqu'au stade 2-3 feuilles.
- **Tallage:** il se déroule principalement de la fin de l'automne à la fin de l'hiver. La première talle (= ramification) apparaît à l'aisselle du maître-brin quand celui-ci possède 3 à 4 feuilles. D'autres talles primaires (sur le maître brin) ou secondaires (sur une talle) vont se développer par la suite. Toutes les talles ont toutes le même rythme d'émission des feuilles, le phyllotherme, qui est de l'ordre de 100 dj base zéro. Pendant le tallage, le blé ne semble posséder que des feuilles. Cependant au niveau de son apex a lieu l'initiation florale, sous la dépendance de trois types de gènes chez le blé: des gènes de précocité intrinsèque, des gènes de vernalisation déterminant les besoins en froid pour l'aptitude à fleurir, et des gènes de réponse à la photopériode, le blé étant une plante de jours courts.
- **Montaison:** la tige principale commence à s'allonger ce qui correspond au stade épi 1 cm (fin Mars). L'émission des talles s'arrête généralement, tandis que les tiges des talles les plus âgées s'allongent avec une probabilité fonction de l'accès aux ressources (lumière et azote) du milieu. Les autres talles, notamment les plus jeunes, vont régresser puis mourir. Au début de Mai, la méiose pollinique, puis le stade gonflement précèdent l'épiaison, qui correspond à la sortie de l'épi hors de la gaine de la dernière feuille (feuille drapeau). La montaison s'achève fin Mai à début Juin avec la floraison (ou anthèse), moment où a lieu la fécondation. C'est à ce moment que le nombre d'épis par m² est fixé.
- **Remplissage des grains:** les grains se forment puis mûrissent suivant trois étapes dont la fin est marquée par:
 - **le stade grain laiteux** (200-300 dj après floraison) marque la fin des multiplications et différenciations cellulaires au sein du grain, fixant le poids potentiel, car le nombre maximal de cellules est atteint. Les grains entrent alors dans une phase de croissance linéaire;
 - **le stade grain pâteux** (500-600 dj après floraison) correspond à la fin de la croissance des cellules de l'enveloppe et du remplissage des amyloplastés par des sucres, essentiellement sous forme d'amidon. La croissance en matière sèche du grain ralentit, et celui-ci se dessèche lentement. C'est à partir de ce stade que les feuilles jaunissent et cessent de fonctionner;
 - **la maturité physiologique** (700-1000 dj après floraison) est atteinte quand toute migration vers le grain a cessé. Dans nos conditions agricoles, le maximum d'azote par grain est fréquemment observé une semaine (150 dj) après la fin visible du remplissage en matière sèche. Une phase rapide de dessiccation se met alors en place, aboutissant à la « maturité récolte », lorsque le grain est devenu suffisamment sec et dur pour pouvoir être récolté.

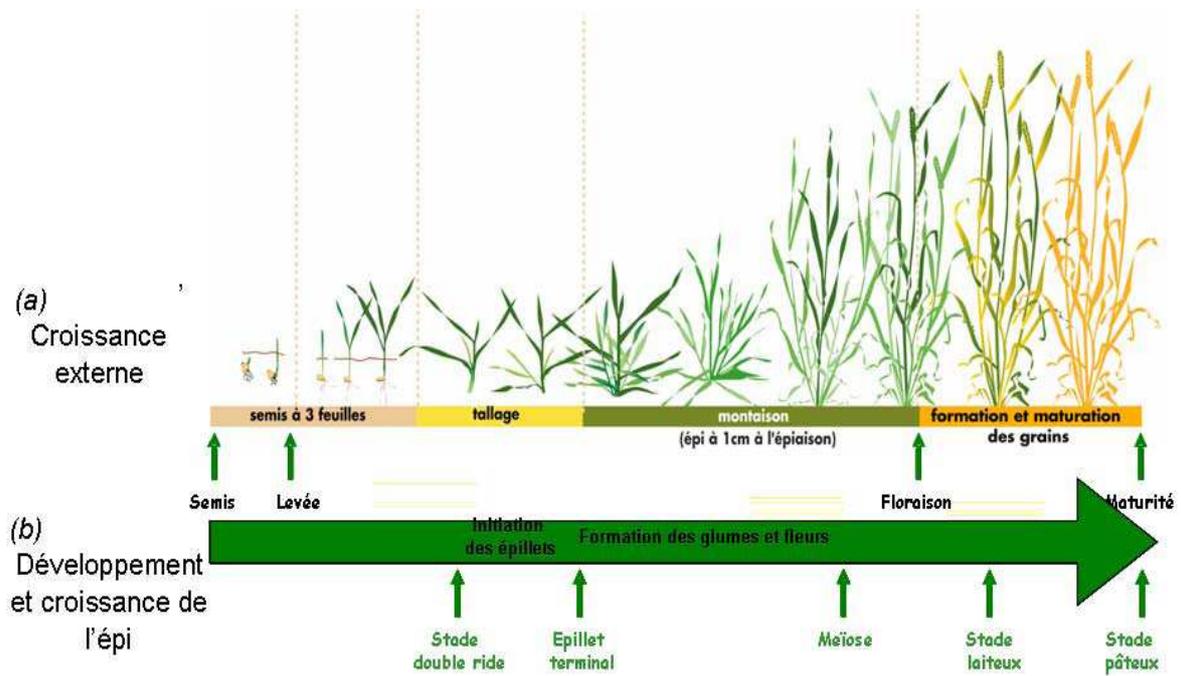


Figure 2: Phases de développement d'une plante de blé

Le remplissage des grains va être assuré par le fonctionnement d'organes végétatifs, dont la mise en place est achevée la floraison. Il n'y a donc plus de possibilité de récupération et toute atteinte à l'appareil végétatif se traduira par une baisse du potentiel de récolte. Ainsi, la surface photosynthétique pour le remplissage en carbone des grains est fixée; de la même manière, la croissance racinaire est terminée (Gomez-MacPherson *et al.*, 1998). En conséquence, c'est le fonctionnement de ces capteurs de lumière et d'azote, ainsi que les réserves sur pied en carbone et en azote, qui vont permettre le remplissage des grains en fonction des aléas climatiques. Notons seulement que l'origine du carbone et de l'azote des grains est très différente. Le carbone des grains provient pour près de 80% de la photosynthèse des trois dernières feuilles au cours du remplissage. Quand le blé pousse dans de bonnes conditions, la contribution des réserves carbonées présentes dans les tiges à la floraison est faible (Gebbing *et al.*, 1998). Par contre l'azote des grains provient pour la plus grosse part de la remobilisation l'azote stocké sur pied dans les parties végétatives à la floraison. L'absorption de l'azote par la plante après la floraison, a une contribution faible à l'azote des grains (Hirel *et al.*, 2007).

3. Fonctionnement du pathosystème

Du fait de sa longue période de latence et malgré une présence dès le semis sur les jeunes plantules, la septoriose diminue la croissance et le rendement du blé principalement en phase de remplissage des grains. En effet, si une contamination intervient pendant la croissance végétative, le blé a le temps d'émettre deux à quatre nouvelles feuilles avant que les symptômes n'apparaissent sur la feuille contaminée. En conséquence la feuille qui se nécrose est une feuille ombrée de peu d'importance dans le bilan de carbone de la plante. A ces stades précoces, la croissance des plantes est peu affectée par la maladie, mais la proximité des feuilles au stade tallage rend la dispersion du champignon particulièrement efficace (Lovell *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 2008). A l'inverse, la montaison éloigne les organes les uns des autres et rend les occurrences de contamination plus rares. Cependant la durée de vie de ces feuilles peut être bien plus longue que celles des précédentes (plus de 1000 dj), ce qui donne à la maladie le temps de s'exprimer. Or les trois dernières feuilles ne seront plus remplacées, et les dommages liés à la baisse de leur surface verte se traduiront en termes de baisse de carbone et d'azote des grains (Gooding *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2004; Bancal *et al.*, 2007, 2008). C'est pourquoi dans ma thèse, je m'intéresse plus particulièrement à la phase de post-floraison qui correspond au remplissage du grain, car c'est pendant cette phase que les maladies foliaires de fin de cycle comme la septoriose sont les plus pénalisantes aussi bien pour le rendement que pour la qualité des grains.

Je vais maintenant décrire le métabolisme azoté pendant le remplissage chez les plantes saines ainsi que sa régulation aux différentes échelles: organes, plantes, couvert. Dans une deuxième partie, j'aborderai la sénescence foliaire pour en préciser également les processus, et les modes de sa régulation aux différentes échelles. Puis, une troisième partie sera consacrée aux modifications du fonctionnement azoté entraînées par les maladies foliaires. La dernière partie traitera de la sénescence induite par les maladies et de sa cinétique, dans le cas de réactions 'compatibles' et 'incompatibles', ainsi que sa régulation selon la nature du pathogène.

II- Métabolisme azoté d'une plante saine

Au cours du remplissage du grain, il existe deux sources d'azote: l'absorption post-floraison et la remobilisation. La remobilisation de l'azote est le processus qui permet le recyclage des protéines des organes végétatifs, *via* leur dégradation en acides aminés, et leur transfert vers les organes en croissance (les grains en post-floraison). Les contributions respectives de ces deux sources au remplissage varient selon les espèces (Hirel *et al.*, 2007) en fonction de la

taille de leur appareil végétatif et de leur capacité à maintenir une absorption importante pendant la floraison. Chez le blé, la remobilisation assure à elle seule entre 60 et 90% de l'azote du grain alors que l'absorption de post-floraison en fournit une moindre partie (Hirel *et al.*, 2007; Kichey *et al.*, 2007).

A- Métabolisme azoté dans les plantes en cours de remplissage

1. Absorption et assimilation de l'azote inorganique

a. Absorption

L'azote est principalement absorbé par les racines sous forme de nitrates (NO_3^-). La forme ammonium (NH_4^+) est surtout importante dans des conditions environnementales défavorables d'anoxie ou d'excès d'eau, peu fréquentes à ce stade. L'absorption est un processus actif qui fait intervenir des transporteurs spécifiques situés dans la membrane plasmique des cellules racinaires. La membrane étant en partie perméable, il existe un efflux naturel qui redirige une partie des nitrates vers l'apoplasme (voir la revue de Touraine *et al.*, 2001). L'absorption qui nous intéresse est donc la résultante de deux flux contraires: l'efflux d'une part, et d'autre part un influx vers l'intérieur des cellules, sous la dépendance de nombreux transporteurs, certains constitutifs et d'autres inductibles, actifs à forte affinité pour le nitrate ou facilités à faible affinité. L'ensemble constitue un réseau qui permet aux plantes de moduler leur absorption en fonction de la disponibilité du milieu en azote. Une fois absorbé, le nitrate est réduit en nitrite (NO_2^-) puis en ammonium (NH_4^+). La première réaction est catalysée par la nitrate réductase (NR), dans le cytoplasme des cellules des racines et/ou des feuilles. La réduction du nitrite en ammonium est ensuite assurée par la nitrite réductase (NiR) dans les chloroplastes des tissus photosynthétiques ainsi que dans les plastes des racines et des tissus non photosynthétiques (Meyer et Stitt, 2001). Cette étape a un coût énergétique élevé (15-16 ATP /mole de NO_3^-) quand elle a lieu dans les racines. Cependant Justes (1993) a estimé dans une large gamme de milieux que la réduction racinaire n'atteint au maximum que 30% de la réduction totale des nitrates en période printanière chez le blé. Kichey *et al.* (2006, 2007) ont montré en post floraison que l'activité de la NR des feuilles est fortement corrélée à l'absorption, ce qui suggère que cette enzyme contribue significativement à l'absorption d'azote après la floraison chez le blé.

b. Assimilation

L'ammonium est ensuite intégré dans une molécule organique grâce au couple d'enzymes glutamine synthétase (GS) /glutamate synthase (GOGAT). Les acides aminés glutamine et glutamate sont ainsi formés; c'est d'eux que sont dérivés les autres acides aminés, utilisés par la suite pour la formation de macromolécules comme les protéines (Masclaux *et al.*, 2001). La GS existe sous deux formes: cytosolique (GS1) et chloroplastique (GS2). L'importance et l'implication de ces deux isoenzymes dans l'assimilation de l'azote dépendent aussi bien de l'espèce végétale considérée que du stade du développement de la plante. Chez les plantes de type C3 comme le blé, la forme chloroplastique (GS2) est la plus importante. Elle intervient majoritairement dans l'assimilation primaire de l'ammonium dans les feuilles jeunes et dans le recyclage de l'ammonium photorespiratoire, alors que la forme cytosolique (GS1) est plutôt impliquée dans la remobilisation de l'azote des organes sources vers les organes puits (Dubois *et al.*, 1996; Masclaux *et al.*, 2000, Mifflin et Habash, 2001). Ces deux isoformes de la GS ont la même activité. Elles ne peuvent être séparées *in vitro* que par chromatographie des protéines, et *in vivo* par l'emploi de sondes moléculaires.

Une troisième activité enzymatique a un rôle controversé dans l'assimilation de l'ammonium chez les plantes. Il s'agit de la glutamate déshydrogénase (GDH), localisée dans les mitochondries des cellules compagnes du phloème et/ou induite dans le cytosol de ces

cellules sénescents (Dubois *et al.*, 2003). Cette enzyme a une activité réversible, et l'activité d'assimilation de l'ammonium (activité aminante: GDHa) utilisant une molécule d' α -cétoglutarate pour synthétiser du glutamate est toujours plus forte que l'activité dé-aminante (GDHd) *in vitro*. Mais des expériences de marquage avec l'azote ^{15}N (Aubert *et al.*, 2001) montrent que la GDH intervient surtout *in vivo* dans la désamination du glutamate (GDHd). Le rapport GDHa/GDHd augmente *in vitro* dans les extraits de tissus stressés et/ou sénescents, ce qui suggère un rôle accru de cette activité dans ces cas-là (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006), mais des confirmations *in vivo* restent nécessaires. Kichey *et al.* (2006, 2007) n'ont pas trouvé de corrélation de l'activité de la GDH avec d'autres marqueurs métaboliques, et certaines hypothèses affirment que cette enzyme ne jouerait pas de rôle direct pendant l'assimilation et la remobilisation chez le blé (Kichey *et al.*, 2006) ni chez le maïs (Hirel *et al.*, 2005). Le rôle de la GDH semble donc assez complexe et tributaire de l'espèce étudiée. Labboun *et al.* (2009) vont jusqu'à faire l'hypothèse que la GDH participerait à un cycle futile visant à maintenir les concentrations cytoplasmiques en ammonium à des niveaux physiologiquement viables avant son utilisation pour la synthèse de glutamine ou de substrats pour la photorespiration

Conclusion: De nombreux travaux de génétiques sur blé comme sur maïs suggèrent que l'absorption d'azote est une étape limitante car les variations d'absorption d'azote sont à l'origine des améliorations d'efficacité d'utilisation des engrais azotés c'est-à-dire du rapport entre azote apportés et grains récoltés. Au niveau cellulaire, l'assimilation de l'azote inorganique met en œuvre une cascade de réactions enzymatiques pour aboutir à la synthèse protéique. Différents compartiments cellulaires sont impliqués: le cytoplasme, le chloroplaste et les mitochondries. Par ailleurs, cette assimilation est coûteuse en énergie et est étroitement dépendante de la fourniture d'ATP et/ou de pouvoir réducteur issus de la photosynthèse: métabolisme carbonés et azotés sont donc étroitement liés.

2. Remobilisation de l'azote

La remobilisation proprement dite ne peut être estimée que par des marquages ^{15}N d'emploi assez délicat. On considère souvent la remobilisation apparente qui est le bilan de deux flux opposés dans les organes des parties végétatives: un flux entrant, alimenté par le flux d'absorption et d'assimilation, et un flux sortant, qui résulte du turn-over protéique et assure la redistribution à l'ensemble de la plante des acides aminés nécessaires à leur croissance. Ces deux flux sont permanents dans la plante végétative, mais la sénescence monocarpique après la floraison conduit à l'arrêt de l'absorption tandis que la remobilisation vide complètement les organes au profit du grain.

a. Métabolisme azoté et recyclage pendant la sénescence foliaire

La remobilisation azotée et la sénescence sont deux processus fortement liés (*cf partie suivante*). La sénescence n'est pas seulement un phénomène dégénératif, mais aussi un processus de recyclage permettant l'exportation des nutriments des feuilles sénescents vers les organes en cours de formation (Gan et Amasino, 1997). En effet, la remobilisation de l'azote et la sénescence foliaire partagent certaines voies métaboliques. On peut notamment citer les différentes protéases (endo-, exo-protéases, système ubiquitine/protéasome, les protéases à aspartate et les protéases à cystéine qui prédominent dans les feuilles sénescents (Hortensteiner et Feller, 2002; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Celles-ci sont ensuite relayées par les enzymes de synthèse des acides aminés: la GS1, la GDH, les transaminases et les asparagine-synthétases, puis par des transporteurs qui chargent le phloème.

La GS1 est la plus étudiée pour son rôle majeur dans la remobilisation de l'azote. Son importance dans le recyclage de l'azote et le remplissage du grain a été démontrée *via* des approches de QTL et de génomique fonctionnelle, notamment chez le riz et le maïs (citées par

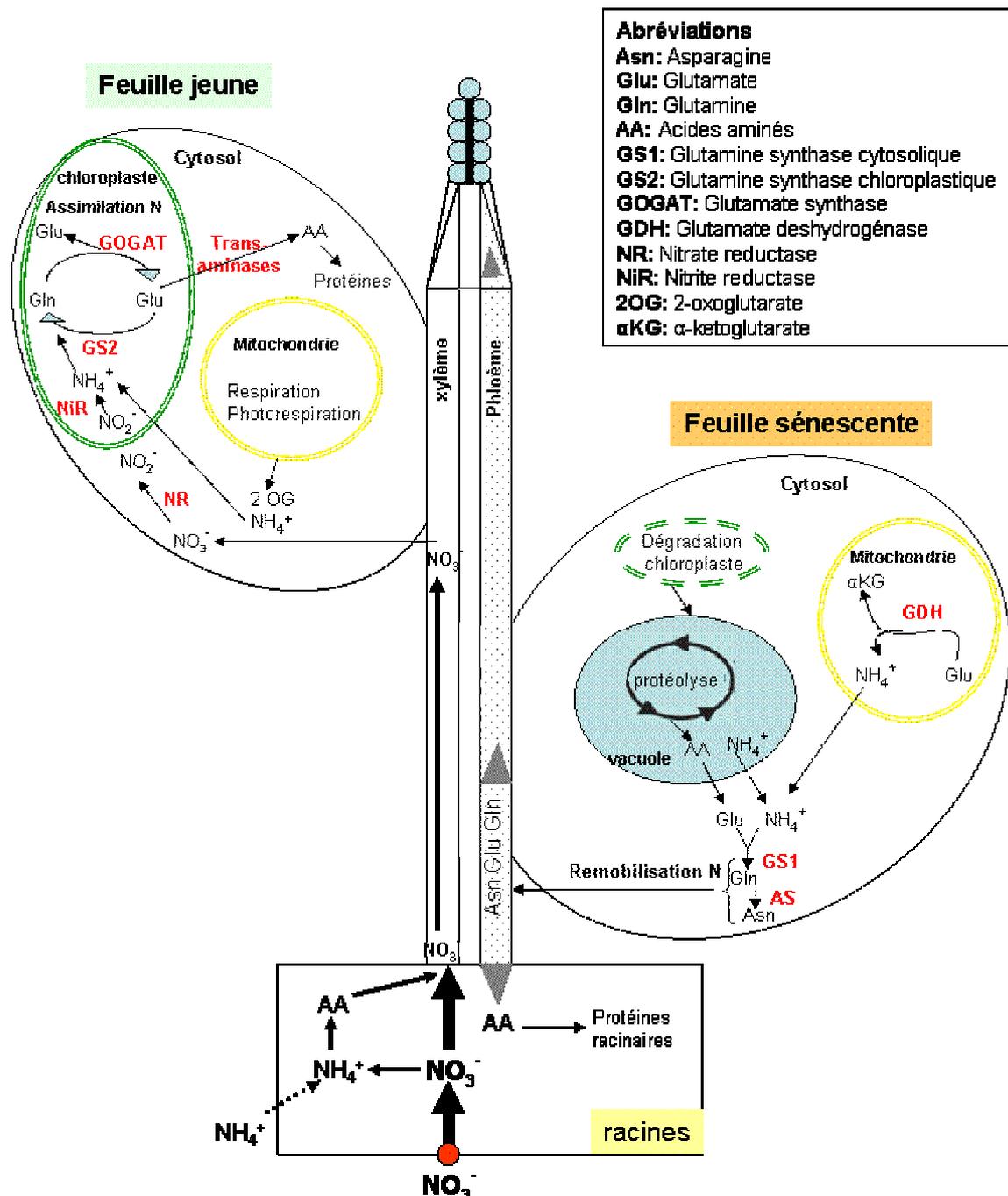


Figure 3: Schéma du métabolisme azoté dans une plante de blé (processus par compartiment cellulaire dans les feuilles jeunes et les feuilles sénescentes).

Chez une plante saine, après l'absorption du nitrate, celui-ci est réduit en nitrite par la nitrate réductase (NR) puis le nitrite en ammonium par la nitrite réductase (NiR) principalement dans les feuilles jeunes. L'ion ammonium est incorporé au glutamate par la glutamine synthétase (GS) pour synthétiser la glutamine. La glutamate synthase (GOGAT) contribue au transfert d'un groupement amide de la glutamine vers un acide cétonique l' α -cétoglutarate pour former 2 molécules de glutamate dont l'une sert comme substrat pour la GS pour former la glutamine et l'autre comme source d'N organique pour les réactions de transamination aboutissant la synthèse de l'ensemble des AA. La phase de sénescence commence par la dégradation des chloroplastes dont les protéines sont transférées vers la vacuole où a lieu la protéolyse. Le recyclage des AA a lieu dans les mitochondries et le cytosol des cellules du mésophylle et les cellules compagnes. La glutamate déshydrogénase (GDH), la glutamine synthétase (GS1) et l'asparagine synthétase (AS) sont les enzymes majeures de synthèse de la glutamine, glutamate et asparagine.

Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008), qui ne seront pas abordées ici. Selon Kichey *et al.* (2006, 2007) l'activité GS chez le blé est fortement corrélée avec la remobilisation de l'azote vers le grain indépendamment des variétés ou du niveau de fertilisation azotée utilisés. Masclaux *et al.* (2001, 2008) ont proposé un schéma simplifié expliquant les modifications métaboliques ayant lieu pendant la sénescence (figure 3). L'entrée en sénescence correspond à une réorientation du métabolisme N depuis l'anabolisme vers le catabolisme. Le démantèlement progressif des chloroplastes fait ainsi intervenir successivement les protéases, la GDHd et la GS1. Les acides aminés libérés par la protéolyse des protéines chloroplastiques subissent une série de réactions de transaminations, ce qui augmente le pool de glutamate pouvant servir de substrat à la GDH. La GDHd permet la dégradation du glutamate en α -cétoglutarate et en ammonium (Oaks, 1995; Miflin et Habash, 2002). Elle procure aux feuilles âgées des squelettes carbonés à respirer alors que la photosynthèse décline (Masclaux *et al.*, 2006) et libère de l'ammonium. Cet ammonium est ré-assimilé par la GS1 et produit la glutamine, forme riche en azote, qui sera exportée vers les grains par le phloème. C'est donc tout le métabolisme N qui est réorienté (voir la synthèse en figure 10). Masclaux *et al.* (2002) ont remarqué sur des feuilles en début de sénescence que le gène codant pour la NR est actif de jour, tandis que celui de la GDH est nocturne, ce qui suggère que les voies d'assimilation et de remobilisation sont régulées de façon antiparallèle.

b. Contribution quantitative des différents organes à la remobilisation vers le grain

D'après Foulkes *et al.* (2009), l'azote de la plante à la floraison est réparti majoritairement dans les limbes foliaires (35%), puis dans les tiges (30%), l'épi (20%) et enfin les gaines (15%). Nos propres estimations suggèrent une contribution moindre des tiges et plus importante de l'épi (voir Chapitre IV). Simpson *et al.* (1983) ont estimé la contribution des organes végétatifs dans l'accumulation journalière de l'N du grain à mi-remplissage. Selon leurs calculs, les feuilles, glumes, tiges et racines contribuent au remplissage pour 40, 23, 23 et 16%, respectivement. Sur de larges gammes de géotypes et de conduite agricole Barbottin *et al.* (2005) et Bancal (2009) ont montré qu'environ 75% à 80% de l'azote présent dans les parties végétatives à la floraison est finalement transféré vers les grains. Cette fraction varie légèrement selon l'organe considéré: Kichey *et al.* (2007) ont estimé par des marquages au ^{15}N que le recyclage de l'azote des limbes atteint 81% contre 76% pour le reste des parties végétatives. Les agronomes ont ainsi remarqué qu'une fertilisation précoce, en augmentant la densité de tiges et d'épis du couvert, est moins bien valorisée par le grain qu'une fertilisation tardive. D'un autre côté, si les feuilles sont remobilisées plus efficacement, elles sont aussi irremplaçables pour le remplissage carboné du grain. L'amélioration des plantes cherche donc à augmenter la durée de vie des feuilles. Foulkes *et al.* (2009) proposent d'examiner la variabilité génétique pour augmenter la capacité de stockage et de remobilisation des tiges afin de retarder la remobilisation des feuilles. Ils espèrent ainsi combiner la concentration en protéines des grains avec leur remplissage en matière sèche.

<p>Conclusion: La remobilisation de l'azote organique stocké dans les parties végétatives vers le grain représente la part majoritaire de l'azote des grains de blé à la récolte. Son déterminisme génétique et physiologique est mal connu, et en particulier la contribution des différents organes végétatifs et leur compensation potentielle dans le remplissage du grain en azote.</p>

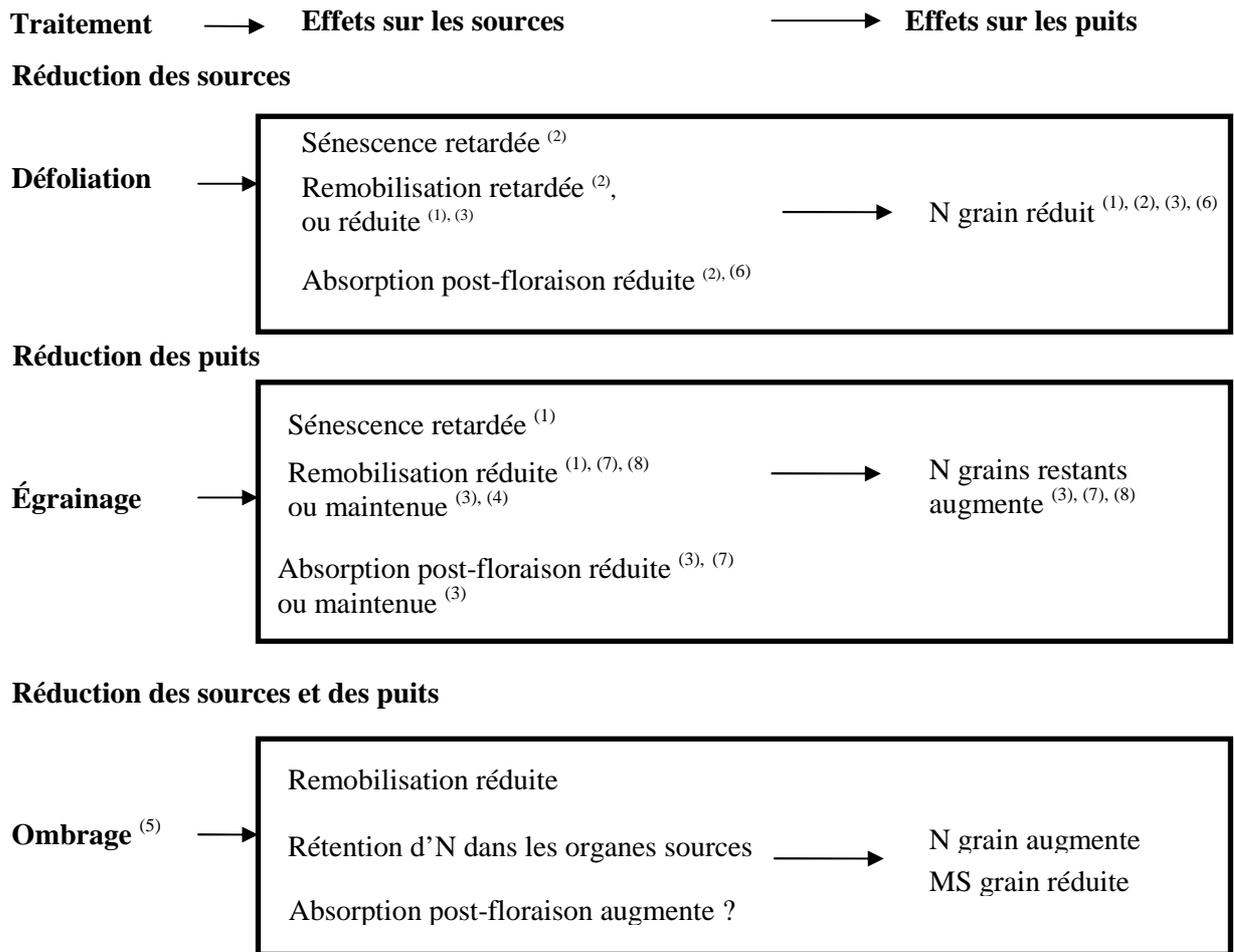


Figure 4: Récapitulation sur la régulation des relations source/puits pendant le remplissage du grain suite à des manipulations artificielles des sources (défoliation), des puits (égrainage), des sources et des puits (ombrage).

Numéro	Référence
1	Feller, 1979
2	Guitman <i>et al.</i> , 1991
3	Ma <i>et al.</i> , 1996
4	MacKown <i>et al.</i> , 1992
5	Martinez-Carasco et Thorne, 1979
6	Neals <i>et al.</i> , 1963
7	Pérez <i>et al.</i> , 1989
8	Thorne, 1981

B- Régulation des flux d'azote au cours du remplissage

1. Flux d'azote à l'échelle de la plante

a. Régulation par les sources ou par les puits du remplissage du grain

De nombreuses manipulations expérimentales des sources (défoliation totale ou partielle) et du puits (réduction du nombre de grains) ont été publiées pour éclaircir le déterminisme source /puits du remplissage N des grains. Ceux-ci ont fini par déboucher sur des modèles évaluant par simulation différentes hypothèses. La figure 4 récapitule la régulation des relations source/puits pendant le remplissage du grain.

La défoliation aboutit souvent à un retard de sénescence des feuilles restantes (Guitman *et al.*, 1991). La remobilisation d'azote des balles est diminuée (Ma *et al.*, 1996) ou retardée (Feller, 1979; Guitman *et al.*, 1991). Enfin l'absorption post-floraison est également réduite (Neals *et al.*, 1963; Guitman *et al.*, 1991). Par conséquent, l'azote du grain se trouve réduit (Feller, 1979; Guitman *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1996; Neals *et al.*, 1963). Ainsi, la défoliation suggère une régulation par les sources du remplissage du grain en N.

La réduction de la taille du puits par ablation de 30% à 100% des grains retarde la sénescence (Feller, 1979, MacKown *et al.*, 1992), et également la remobilisation d'azote (Martinez-Carasco et Thorne, 1979; Thorne, 1981). L'absorption post-floraison est généralement réduite (Mi *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 1989), mais selon Ma *et al.* (1996) elle ne diminue que dans le cas de petits épis. Dans les variétés à gros épis, le nombre de grains restant après la manipulation suffit à maintenir l'absorption. MacKown et van Sanford (1988), retirent l'épi du maître brin mais pas des talles, puis observent par marquage au ^{15}N (1) une diminution d'absorption de la plante correspondant à l'absorption du maître brin chez les témoins et (2) un transfert massif des deux tiers de l'azote du maître brin vers les talles. Ces résultats suggèrent que l'absorption d'azote est régulée par la taille du puits à l'échelle du brin, mais probablement pas la remobilisation. Toutes ces expériences d'ablation aboutissent à une augmentation considérable de l'azote dans les grains restants (Ma *et al.*, 1996; Martre *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 1989; Thorne, 1981). En effet, la réduction de la force de puits ne réduit pas en proportion les sources d'azote (remobilisation et absorption de post-floraison).

L'approche de modélisation (Jamieson et Semenov, 2000; Martre *et al.*, 2003) suggère que la sensibilité source/puits du remplissage du grain en N dépend de la fraction azotée considérée. Les albumines et globulines du grain, protéines 'métaboliques' qui apparaissent précocement, seraient régulées par les puits. Les gliadines, gluténines et globulines, protéines de réserve qui s'accumulent plus tard, ne dépendraient que des sources. Ce modèle recoupe les résultats de MacKown *et al.* (1992): après réduction de l'épi à la floraison, l'azote par grain n'est pas modifié par rapport au témoin pendant dix jours, et ce n'est qu'ensuite qu'une différence s'installe.

b. Régulation hormonale de l'absorption et de la remobilisation

L'absorption des nitrates peut être inhibée par des ajouts exogènes d'acides aminés et d'ammonium (Glass *et al.*, 2002). Par ailleurs, les pools d'acides aminés intrinsèques peuvent indiquer l'état azoté de la plante en régulant l'absorption des nitrates (Miller *et al.*, 2007). Les cytokinines semblent aussi jouer un rôle dans la signalisation de l'état azoté de la plante. En effet leur concentration varie avec la disponibilité en azote dans la plante, et d'ailleurs leur synthèse est induite par les nitrates (Takei *et al.*, 2002).

Dans une revue de synthèse, Barneix (2007) propose un modèle sur le passage irréversible d'un métabolisme construit sur l'absorption d'azote vers une remobilisation généralisée (figure 5). Selon son hypothèse, dès que l'absorption ne peut plus satisfaire la demande de la plante, il y aurait une baisse de la concentration de cytokinines, hormone anti-sénescence ce

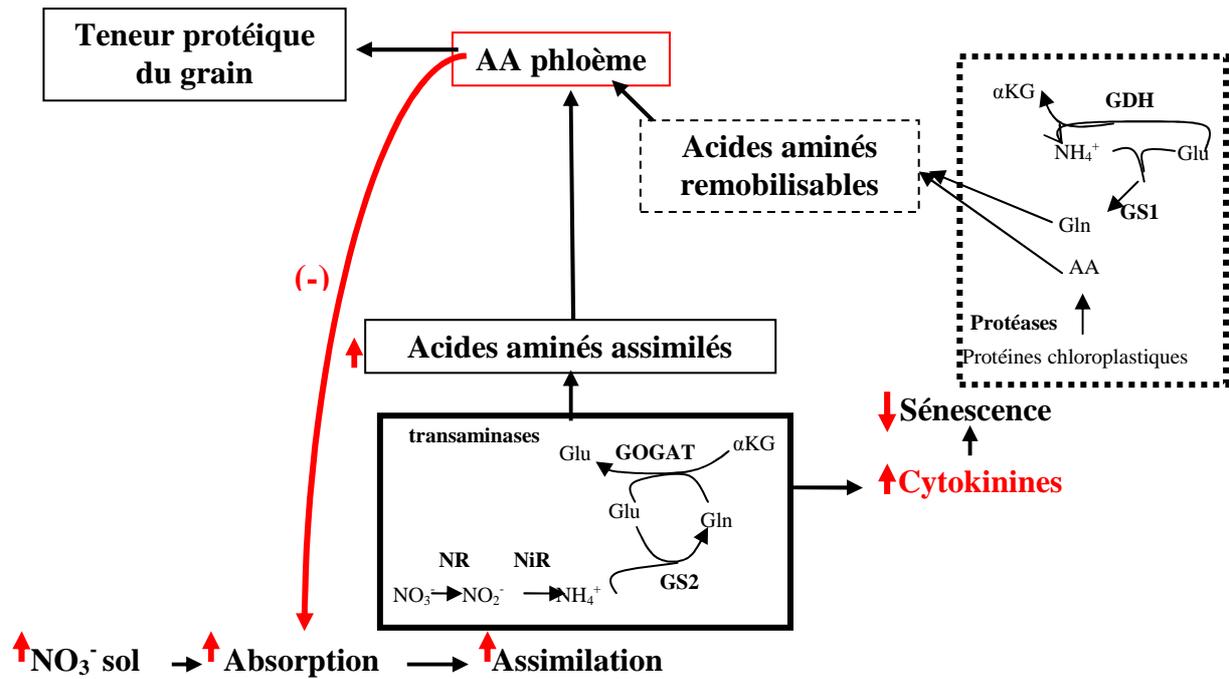


Figure 5A: Hypothèse sur la régulation de la relation entre l'absorption et la remobilisation d'N en conditions de satiété (d'après Barneix, 2007)

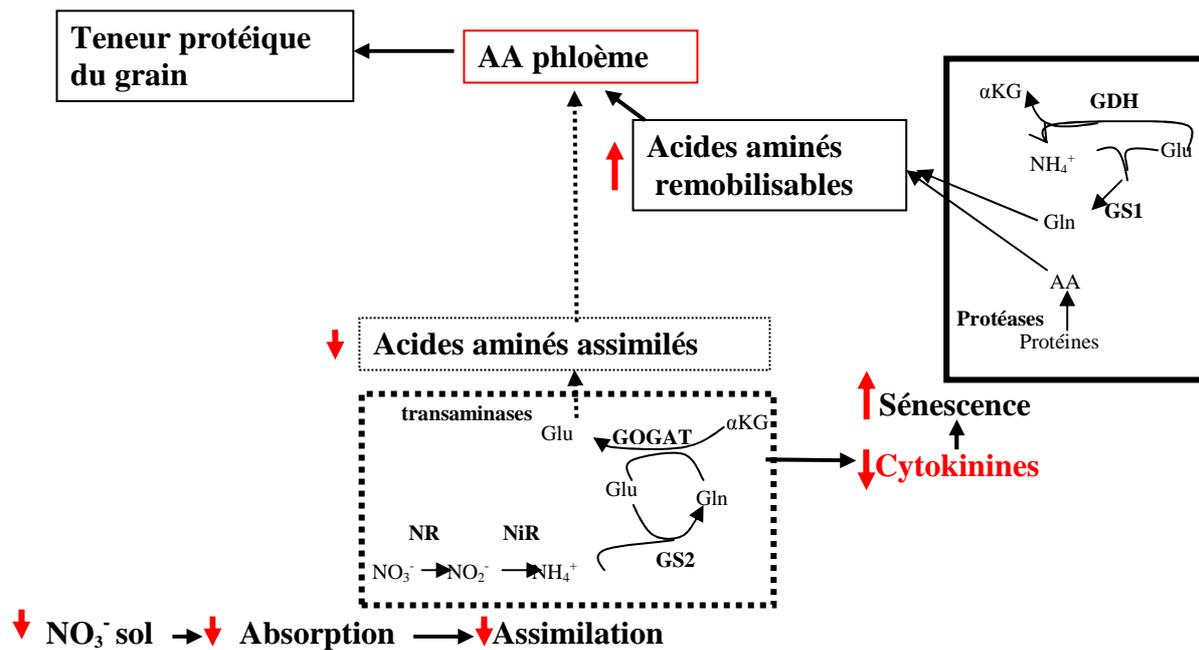


Figure 5B: Hypothèse sur la régulation de la relation entre l'absorption et la remobilisation d'N en conditions de carence en N (d'après Barneix, 2007)

Dans une plante saine, l'élaboration de la teneur protéique du grain est régulée par l'absorption et la remobilisation de l'N, qui représentent 2 sources d'N antagonistes fournissant au grain 2 pools d'acides aminés (AA): des AA provenant de l'assimilation azotée et des AA issus de la remobilisation N. Cet antagonisme est illustré à travers 2 situations: l'enrichissement du sol en N et la carence N.

Dans le cas d'une augmentation de la teneur en N dans le sol, la teneur protéique des grains augmente puis se sature malgré la disponibilité de l'N dans le sol. Les AA du phloème sont fournis par la voie de l'absorption et de l'assimilation N, alors que les voies de la sénescence et de la remobilisation sont plutôt réduites en raison de l'augmentation du taux de cytokinines hormone d'anti-sénescence. D'autre part, la teneur élevée des AA du phloème va inhiber l'absorption racinaire des nitrates, ce qui explique que la teneur en N du grain n'augmente plus en dépit d'une forte teneur dans le sol. Dans le cas d'une carence azotée dans le sol, les AA du phloème sont fournis principalement par la voie de la sénescence et de la remobilisation N, suite à la baisse du taux de cytokinines alors que la voie de l'absorption et de l'assimilation est plutôt réprimée.

qui déclencherait irréversiblement la dégradation des protéines foliaires et donc la remobilisation. Seul le maintien d'un niveau élevé de disponibilité en azote dans la plante assurerait un niveau élevé de cytokinines évitant que les protéines chloroplastiques et particulièrement la Rubisco ne soient dégradées. Ainsi les cytokinines qui régulent la remobilisation azotée et la sénescence seraient aussi régulées par le niveau azoté de la plante.

2. Flux d'azote à l'échelle du couvert

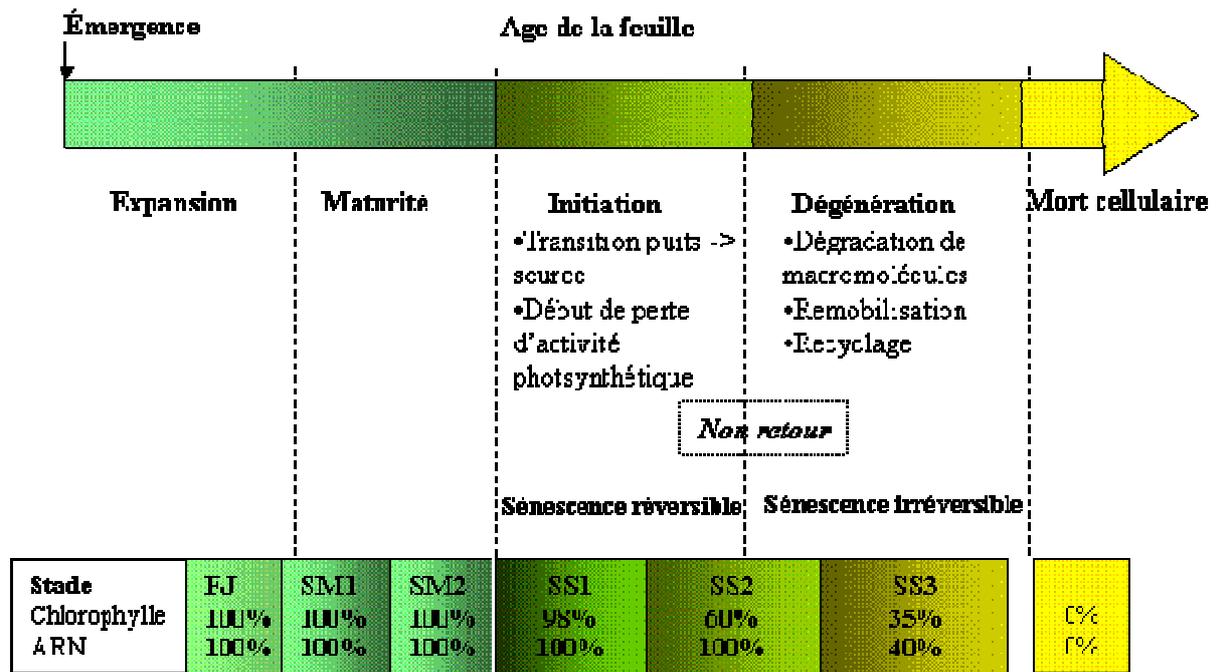
A l'échelle du couvert, plusieurs variables microclimatiques diminuent du sommet vers la base, telles que la vitesse du vent, la température foliaire, la quantité et la qualité de la lumière (rouge clair/rouge sombre). Dans une revue de synthèse, Hikosaka (2005) a montré que dans un couvert, la remobilisation de l'azote est accélérée à partir des feuilles ombrées. Par conséquent, un gradient de remobilisation croissante est observé du sommet vers le bas du couvert (figure 10).

Rousseaux *et al.* (1999) concluent que la qualité de la lumière intervienne dans la formation du gradient vertical d'azote après un suivi de la dynamique de la lumière interceptée par les feuilles basales dans un couvert de tournesol depuis la fin de leur expansion jusqu'à leur sénescence. L'azote foliaire surfacique (SLN) de ces feuilles montre en effet une bonne corrélation positive avec l'éclairement journalier, et plus encore avec le ratio rouge clair/rouge sombre. Selon Ono *et al.* (2001), le gradient quantitatif de lumière semble prépondérant sur celui de sa qualité dans la formation des gradients d'azote verticaux dans les couverts. D'une façon générale, en passant du sommet vers la base d'un couvert, l'éclairement devient de plus en plus limitant, limitant de plus en plus le potentiel des feuilles inférieures. Gastal et Lemaire (2002) ont proposé que les gradients d'azote foliaire observés dans le couvert représentent une manière d'optimiser l'assimilation du carbone au niveau de la plante entière.

Selon Sadras *et al.* (1993) la distribution d'azote dans les différentes feuilles suit celle de la lumière pendant la phase végétative chez le tournesol, mais plus pendant le remplissage des grains. L'azote est remobilisé à partir de toutes les feuilles, mais le taux de variation du SLN est plus élevé dans les feuilles supérieures, là où la concentration d'azote est la plus élevée. Selon Bertheloot *et al.* (2008) au contraire, la distribution verticale des SLN resterait parallèle avec celle de la lumière pendant tout le remplissage du grain de blé.

Synthèse. *La régulation du remplissage du grain en azote est encore mal connue d'un point de vue agro-physiologique en dépit des nombreux travaux menés dessus. Les résultats penchent plutôt vers un déterminisme source du remplissage. Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour mieux éclairer la régulation par les sources, leur synergie et les compensations éventuelles entre elles pour assurer le remplissage du grain.*

D'autre part, la remobilisation est estimée le plus souvent par la méthode du bilan entre la floraison et la maturité des grains. Toutefois, cette méthode estompe les variations au cours du temps. Une façon d'y remédier est de suivre des cinétiques pour l'azote total, les protéines, ou des marqueurs (enzymes et métabolites) caractéristiques de la remobilisation et de l'assimilation d'azote.



Classes des gènes *SAG*

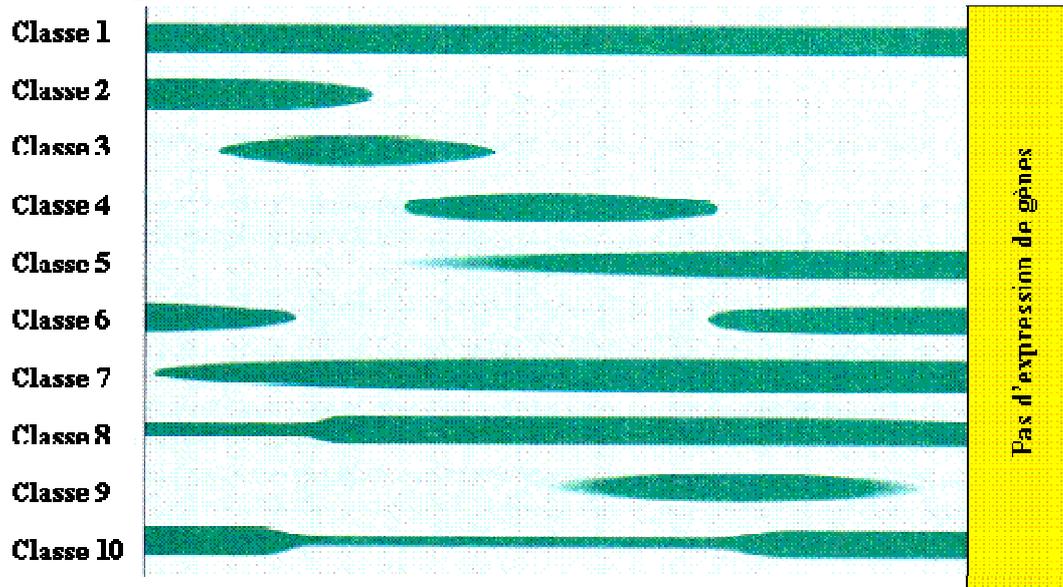


Figure 6: Progression de la sénescence au niveau d'une feuille, avec les différentes classes des gènes *SAG* (*Senescence Associated Genes*) (d'après Buchanan-Wollaston, 1997).

L'échelle de développement foliaire et de sénescence est basée sur les contenus en chlorophylle et en ARN. Les feuilles jeunes (FJ) présentent des contenus en chlorophylle et en ARN optimum. Deux stades de maturité sont distingués: SM1 et SM2, ainsi que trois stades de sénescence successifs (SS1, SS2, SS3). La classe 5 regroupe les gènes *SAG* précoces alors que la classe 6 regroupe les gènes tardifs. La classe 9 est intermédiaire

III-Sénescence foliaire chez les plantes saines

A- Généralités

1. Types de sénescence

Trois types majeurs de sénescence peuvent être distingués. La sénescence monocarpique en relation causale avec la mise en place des organes reproducteurs existe chez les plantes annuelles dont les céréales (Nooden *et al.*, 1997; Feller et Fischer, 1994). La sénescence séquentielle, indépendante de la reproduction, a lieu au cours du développement quand de nouveaux organes végétatifs, notamment des feuilles, sont émis (Hikosaka, 2005). Ce type de sénescence est observé chez des herbacées au stade végétatif (Nooden *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2007), et notamment pendant la montaison chez le blé. Le troisième type de sénescence est défini pour les arbres à feuilles caduques, où elle aboutit à la chute automnale des feuilles et a un rôle dans la résistance au gel et au froid (Feller et Fischer, 1994; Hikosaka, 2005). Dans cette analyse, seules les sénescences monocarpique et séquentielle seront discutées.

2. Phases de sénescence

Les définitions respectives de la sénescence d'une part et de la mort cellulaire programmée (PCD) d'autre part, sont très discutées dans la littérature. Je vais définir ces deux termes en essayant de clarifier au mieux leur lien avec la mort de la cellule, du tissu, de l'organe et même de l'individu.

- D'après Feller et Fischer (1994), la sénescence est le dernier stade du développement de la feuille avant sa mort. Il s'agit d'un processus hautement régulé où des changements ordonnés ont lieu aux différentes échelles: moléculaire, cellulaire, de l'organe, et de la plante, même dans les conditions environnementales les plus favorables (Gan et Amasino, 1997).
- La PCD est généralement reliée à l'apoptose, processus fréquent dans les cellules animales. D'un point de vue cytologique, l'apoptose animale est caractérisée par la condensation de la chromatine, le bourgeonnement du noyau en petites vésicules qui seront phagocytées, (Danon *et al.*, 2000; Nooden *et al.*, 1997). Chez les plantes, il est plus judicieux de parler de phénomène d'*apoptose-like* à cause de l'absence de l'émission des corps apoptiques et de la phagocytose. Une voie d'autolyse est plutôt impliquée (Danon *et al.*, 2000). Ces auteurs ajoutent qu'à l'échelle moléculaire, l'un des points communs entre la PCD chez les animaux et les végétaux est la fragmentation de l'ADN.

Yoshida (2003) définit trois phases de la sénescence: une phase d'initiation, une phase de dégénération et une phase terminale qui correspond à la mort cellulaire (figure 6). L'hypothèse la plus acceptée est qu'avant la phase terminale la feuille peut encore récupérer ses capacités photosynthétiques: la sénescence est réversible. Ce n'est qu'au-delà que commence l'apoptose (Nooden *et al.*, 1997). La description des mécanismes à l'échelle cellulaire, dans la section suivante, permettra de voir plus clair la séquence des évènements conduisant à la mort cellulaire.

3. Mécanismes de sénescence

a. Echelle moléculaire

Buchanan-Wollaston (1997) distinguent ainsi un processus en sept étapes depuis l'émission d'un organe jusqu'à sa mort. Ils subdivisent la sénescence réversible en trois étapes: la sénescence commence dès que la chlorophylle descend à 98% de son niveau initial, les étapes suivantes sont 60% et 35% de chlorophylle. C'est à l'entrée de ce dernier stade que la quantité d'ARNm décroît. Avant même l'entrée en sénescence, ils constatent un changement de l'expression des gènes, et suggèrent ainsi une classification des gènes selon le moment où ils

sont induits ou réprimés. Les gènes qui sont induits et appelés communément *SAGs* (*Senescence Associated Genes*) concernent notamment des facteurs de transcription (WRKY, NAC), la dégradation protéique, la remobilisation azotée, les voies de signalisation, les antioxydants, la biosynthèse d'hormones (acide jasmonique, éthylène) ainsi que des gènes de défense (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). L'induction de ces gènes suggère le dialogue de diverses voies métaboliques, mais aussi de signalisation avec le processus de sénescence.

b. Echelles cellulaire et tissulaire

La dégradation de la chlorophylle, dont le processus a été largement décrit par Hortensteiner et Feller (2002), représente le premier symptôme de la sénescence foliaire. La diminution de l'activité photosynthétique est mesurée suivie par la dégradation ordonnée des constituants cellulaires (Wingler *et al.*, 2004). Les chloroplastes qui contiennent près de 70% des protéines foliaires, sont les premiers organites dégradés (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003). La dégradation des protéines foliaires au cours de la remobilisation de l'azote est catalysée par un système complexe de protéases représenté par les composants du système ubiquitine /protéasome, par les protéases à aspartate et par les protéases à cystéine qui prédominent dans les feuilles sénescences (Hortensteiner et Feller, 2002; Gepstein *et al.*, 2003).

Dans les feuilles sénescences, les activités métaboliques sont maintenues jusqu'à la fin du processus, afin d'assurer la dégradation des protéines et l'exportation consécutive des produits dégradés vers le phloème (Gregersen *et al.*, 2008). Les mitochondries restent fonctionnelles (Crafts-Brandner *et al.*, 1998; Hortensteiner et Feller, 2002), et assurent ainsi les activités liées au recyclage de l'azote dans la plante évoquées plus haut.

Au cours de la phase réversible, les feuilles sénescences se caractérisent par une diminution de leur concentration chlorophylle lente d'abord (le passage à 98% de chlorophylle est difficile à repérer), puis s'accéléralant. La couleur jaune n'apparaît que dans des tissus pratiquement vides de chlorophylle: la sénescence est alors irréversible, et les tissus deviennent nécrotiques quand la perte de l'intégrité de la membrane marque le passage à la mort cellulaire (Hortensteiner et Feller, 2002). Chez les céréales, on observe une zone nécrotique qui progresse de la pointe vers la base des limbes, ce qui focalise les études autour de cette sénescence 'apicale' (Gregersen *et al.*, 2008).

c. Echelle de la plante

A l'échelle de la plante, on a vu qu'un gradient ontogénique vertical s'observe en phase végétative: la sénescence évolue de bas en haut. Après la floraison, tous les organes végétatifs vont progressivement entrer en sénescence au profit du remplissage N des grains. Cette sénescence monocarpique ne touche pas tous les tissus en même temps: les limbes meurent en premier, en commençant par le bas. Le rôle tardif des glumes quand la feuille drapeau meurt a été montré par Lopes *et al.* (2006). Au champ, on observe souvent que les nœuds sont les dernières parties vertes, suggérant que la plante maintient le plus longtemps possible son système de transfert vers le grain, notamment la connexion xylème/phloème qui existerait à ce niveau (Bancal, comm. pers.)

La figure 10 récapitule l'ensemble de ces gradients en plus d'autres gradients qui vont apparaître dans les sections suivantes.

B- Facteurs influençant la sénescence

1. Rôle des sucres, invertases et cytokinines

Certaines études suggèrent que des niveaux élevés de sucre peuvent induire la sénescence alors que d'autres stipulent que ce sont plutôt les niveaux faibles qui la causent. Dans le premier cas, des traitements d'interruption de phloème chez des plantes de blé (Feller et

Fischer, 1994) ou d'orge (Parrott *et al.*, 2005) entraînent une accumulation de sucres et une sénescence précoce. Dans le deuxième cas, l'incubation de feuilles coupées dans l'obscurité résultant en une carence de sucres entraîne la sénescence (Noh et Amasino, 1999). Par conséquent, différentes voies de signalisation par les sucres existent. Selon Masclaux-Daubresse *et al.*, (2005), les SAG précoces (induites dès 98% de chlorophylle) et la GS1 seraient plutôt induits par l'excès de sucres, tandis que les SAG tardifs (induites vers 60% de chlorophylle) et la GDH seraient réprimés.

Quelques hypothèses sont posées par différents auteurs pour expliciter les apparentes contradictions entre les résultats: (1) le ratio hexoses/saccharose pourrait être un meilleur indicateur d'entrée en sénescence que leurs concentrations prises isolément, ce qui expliquerait l'importance des invertases dans les processus de sénescence (Wingler et Roitsch, 2008); (2) un métabolisme différent dans les sources et les puits (Balibrea Lara *et al.*, 2004); (3) l'interaction entre métabolisme des sucres et de l'azote, rendant le ratio C/N des tissus plus pertinent dans la régulation de la sénescence (Wingler *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les invertases font partie de la voie de signalisation des cytokinines (Balibrea Lara *et al.*, 2004), hormones anti-sénescence (Gan et Amasino, 1997; Jordi *et al.*, 2000), alors que l'éthylène (Grbic et Bleecker, 1995), l'acide jasmonique (He *et al.*, 2002; Wasternack, 2007) et l'acide salicylique (Morris *et al.*, 2000) sont connus pour leur effet inducteur de sénescence. Dans des plantes transgéniques de tabac exprimant un gène de biosynthèse de cytokinine fusionné à un promoteur de sénescence, la dégradation de la chlorophylle et des protéines ainsi que la perte de l'activité photosynthétique sont retardés (Wingler *et al.*, 1998). Dans ces plantes transgéniques les cytokinines entraînent un gradient vertical inversé d'azote avec une accumulation préférentielle de l'azote dans les feuilles sénescentes par rapport aux feuilles jeunes (Jordi *et al.*, 2000). L'éthylène semble intervenir dans l'apparition de la sénescence, comme l'a montré le travail de Grbic et Bleecker, (1995) sur des mutants d'*Arabidopsis* insensibles à l'éthylène. Le retard de sénescence coïncide avec l'induction retardée des gènes SAG, mais également avec une forte expression des gènes de photosynthèse. Inversement, chez les plantes sauvages, une application exogène de cette hormone accélère l'induction de gènes SAG et diminue l'expression de gènes de photosynthèse. L'acide salicylique est impliqué dans la régulation de certains gènes SAG chez *Arabidopsis* tel que *SAG12*, gène de la protéase à cystéine (Morris *et al.*, 2000).

La figure 7 récapitule la régulation hormonale de la sénescence à l'échelle foliaire, en fonction de l'âge de la feuille.

2. Interaction de l'azote avec les voies de signalisation

La disponibilité en azote dans la plante représente l'un des facteurs dont dépendent l'initiation et la vitesse de la sénescence. Par exemple, Guitman *et al.* (1991) notent qu'un apport azoté à la floraison provoque un délai de dégradation des chlorophylles et de protéines solubles de la feuille drapeau. Crafts-Brandner *et al.* (1998) vérifient par immunologie que la carence azotée induit une diminution rapide du contenu en Rubisco, GS2 et GOGAT, alors que la GDH reste inchangée.

L'effet de la nutrition azotée sur la sénescence interagit avec la lumière, les sucres et les relations source/puits. Par exemple Ono *et al.* (1996) ont cultivé des plantules de tournesol sous deux niveaux de lumière et deux niveaux d'azote. La carence en azote induit moins vite la sénescence chez les plantes ombrées, où les sucres ne s'accumulent pas. Cela suggère que les sucres servent de signal pour déclencher la sénescence sous carence en azote (Wingler *et al.*, 2006). Pourteau *et al.* (2004) estiment qu'un rapport C/N élevé déclenche la sénescence foliaire. On rappellera d'autre part l'intrication du métabolisme de l'azote et des cytokinines, hormones anti-sénescence, selon le modèle de Barneix (2007). Signalons enfin un rôle direct de signal de certaines formes azotées. Masclaux *et al.* (2002) ont incubé des disques foliaires

de tabac en début de sénescence. Le niveau de GS2 était insensible à la présence d'acides aminés tels que la glutamine, le glutamate ou la proline. Par contre la GS1 répondait positivement à des niveaux croissant de glutamate et de proline. La synthèse de GDH, elle, était activée par toutes les formes d'acides aminés, ainsi que par les ions ammonium.

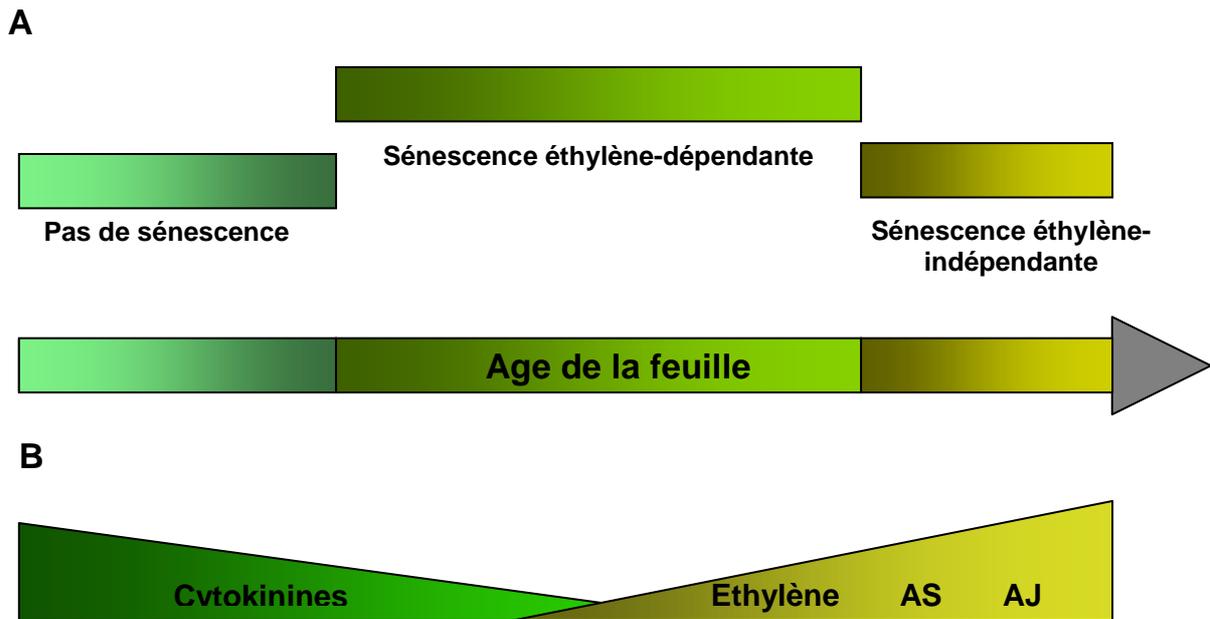


Figure 7: Régulation hormonale de la sénescence à l'échelle foliaire (d'après Schippers et al., 2007)

A: Effets de l'éthylène sur la sénescence: A partir d'un certain stade du développement, l'éthylène peut induire la sénescence foliaire, en fonction des conditions environnementales. Le développement subséquent de la feuille aboutit souvent à la sénescence, même en absence de l'éthylène.

B: Au cours de la sénescence, les effets des hormones anti-sénescence tel que les cytokinines diminuent alors que les effets des hormones inductrices de sénescence augmentent comme le montrent les 2 triangles respectivement.

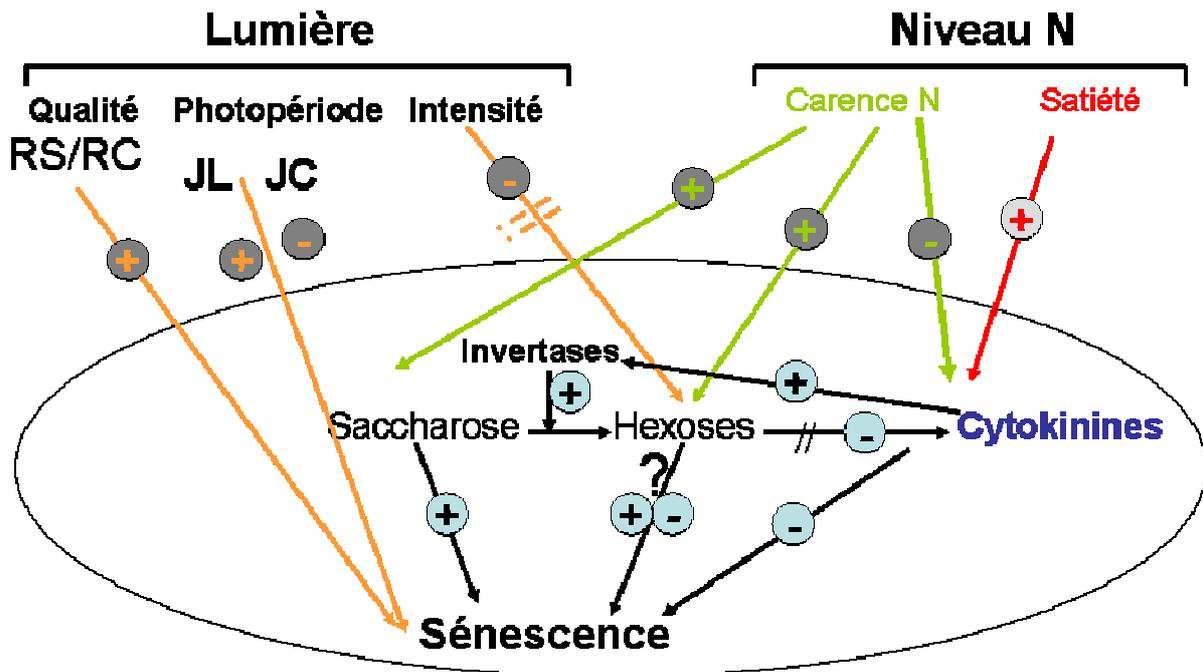
3. Interaction de la lumière avec les voies de signalisation

L'effet de la lumière sur la régulation de la sénescence dépend évidemment de son intensité, qui va jouer sur la quantité de sucres dans les tissus selon les rapports source/puits. Par exemple Weaver et Amasino (2001) ont montré que la sénescence peut être induite en plaçant des feuilles individuelles d'*Arabidopsis* à l'obscurité, alors qu'elle est plutôt retardée chez des plantes végétatives entières placées dans les mêmes conditions.

La qualité de la lumière intervient également: sur tournesol, la vie des feuilles est diminuée en réponse à une réduction du rapport rouge clair /rouge sombre par augmentation du rouge sombre (Rousseaux *et al.*, 1996); à l'inverse elle est augmentée pour des feuilles âgées lorsque du rouge clair est appliqué (Rousseaux *et al.*, 2000). La voie des phytochromes (senseurs de qualité de lumière) serait donc impliquée dans le déclenchement de la sénescence, du moins chez certaines espèces (Gan et Amasino, 1997; Ono *et al.*, 2001). En conditions naturelles, le phytochrome est sensible à la photopériode, mais aussi à la densité du couvert. Le rapport rouge clair /rouge sombre est en effet diminué par l'absorption préférentielle des photons rouges par la chlorophylle des étages foliaires supérieurs (Gan et Amasino, 1997). Par ailleurs, la qualité de la lumière peut influencer l'impact des sucres sur la sénescence. En effet, Wingler *et al.* (2006) rapportent que les sucres peuvent induire les mêmes effets que le rouge sombre sur l'expression des gènes. Ces interactions entre signalisation par les sucres et par le phytochrome peuvent déterminer la réponse des feuilles à la base du couvert qui sont sujettes à un ratio rouge clair /rouge sombre réduit (Wingler *et al.*, 2006).

Synthèse. *L'initiation et la vitesse de la sénescence sont régulées par des facteurs internes et des facteurs environnementaux qui interagissent entre eux (figure 8, figure 9). Les phytohormones telles que l'éthylène, les acides salicylique et jasmonique induisent la sénescence. Particulièrement, l'éthylène joue un rôle dans le temps d'apparition de la sénescence en interaction avec l'âge des feuilles. Les cytokinines inhibent la sénescence, elles agissent notamment sur la régulation des relations source/puits, entraînant un métabolisme puits, et tout en impliquant l'invertase dans sa voie d'action. La régulation par les sucres est encore controversée, induisant la sénescence à faible ou forte concentration. Parmi les facteurs externes régulant la sénescence, une carence azotée induit une sénescence précoce et interagit avec la voie des cytokinines, celle des sucres et de la lumière. La lumière peut agir sur la sénescence par la voie des sucres, et par la voie des relations source/puits. Son action dépend de son intensité, de la photopériode, et de la qualité de la lumière qui va conditionner son effet sur la sénescence d'une plante dans le couvert. Plus qu'à des concentrations élémentaires en métabolites, les ratios C/N et hexoses/saccharose résultant du fonctionnement intégré de la plante sont de bons candidats pour le déclenchement de la sénescence.*

Les facteurs qui ont pour rôle de promouvoir la sénescence agissent à travers des voies de transduction respectives qui mettent en action des facteurs de transcription tels que WRKY et NAC. Ces derniers auront pour effets d'activer l'expression des gènes SAGs qui mène à l'exécution de la sénescence: dégradation de macromolécules et recyclage de nutriments avant d'aboutir à la mort cellulaire.



RC/RS: rouge clair/ rouge sombre
 JL: jours longs; JC: jours courts
 // : blocage // : blocage partiel

Figure 8: Régulation de la sénescence à l'échelle foliaire: action et interaction des facteurs endogènes et exogènes majeurs

Les différentes voies sont représentées par des couleurs différentes

IV- Fonctionnement azoté des plantes malades

Les effets de la nutrition azotée sur la dynamique des épidémies fongiques sont largement abordés dans la littérature. Walters et Bingham (2007) espèrent utiliser la fertilisation azotée comme moyen de lutte agronomique. Solomon *et al.* (2003) étudient les voies d'alimentation du pathogène en azote *in planta* pour les mêmes raisons. Divon et Fluhr (2007) abordent les interactions plante \times pathogène au niveau métabolique en fonction de leurs stratégies invasives. Les travaux abordant l'effet inverse de l'action des champignons phytopathogènes sur le métabolisme azoté de la plante sont plus rares, bien que cette action soit directement liée à la baisse de surface verte, la cause directe de la nuisibilité des maladies. Les maladies foliaires affectent le fonctionnement azoté des plantes aux niveaux de l'absorption, l'assimilation et la remobilisation. Les recherches sont souvent réalisées à l'échelle macroscopique de l'organe, la plante, voire du couvert, moins fréquemment à l'échelle biochimique et moléculaire.

1. Effet des maladies foliaires sur l'absorption post-floraison

Chez le blé, l'absorption après la floraison représente de faibles quantités d'azote en comparaison avec la remobilisation. Cependant, les agriculteurs ne raisonnent pas comme les expérimentateurs. Ces derniers changent souvent de protocole pour maximiser la variabilité, alors que les agriculteurs ont tendance à définir une pratique optimale et à la répéter d'une année sur l'autre. A conduite agricole constante, la variabilité interannuelle de l'azote remobilisable est assez faible. La variabilité interannuelle du rendement azoté est alors très corrélée à celle de l'absorption post floraison aussi bien dans les peuplements sains que les malades (Bancal *et al.*, 2008; Gooding *et al.*, 2005). Les agronomes estiment la plupart du temps l'absorption post-floraison en effectuant des bilans de l'azote des parties aériennes depuis l'anthèse. Ainsi, Bancal *et al.* (2008) ont observé que l'accumulation d'azote dans les parties aériennes s'arrête plus tard dans des parcelles traitées aux fongicides que dans celles victimes d'une attaque par la rouille ou la septoriose. De façon assez générale, le bilan d'azote entre floraison et maturité montre que l'absorption de post-floraison est significativement réduite chez les plantes malades avec un effet significatif de l'année, donc de la sévérité des maladies et souvent aussi de la fertilisation azotée. Des études anciennes montrent que des champignons phytopathogènes biotrophes peuvent induire une diminution de l'absorption des nitrates (Murray et Ayres, 1986; Walters et Ayres, 1980). Verreet et Hoffman (1990) n'ont pas trouvé d'effet sur l'absorption après une inoculation tardive avec *P. nodorum*. Par contre Ruske *et al.* (2003) observent une réduction de l'absorption post-floraison dans le cas de blés septoriés. La diminution de l'absorption semble donc fonction de la précocité et de la sévérité de l'infection. Leitch et Jenkins (1995) ont observé une réduction de 11% de l'absorption post-floraison dans le cas d'une infestation par la septoriose foliaire, mais sans effet de la fertilisation azotée.

2. Effet des maladies foliaires sur l'assimilation de l'azote

L'absorption est suivie par l'assimilation qui est un processus coûteux en énergie. Cependant Bancal *et al.* (2008) n'ont pas pu relier simplement les bilans d'azote des cultures malades à des indicateurs de fonctionnement de la plante malade, comme par exemple, la durée de vie verte des feuilles ou encore le rayonnement intercepté, qui rendent bien compte de l'énergie disponible pour ce processus. A notre connaissance, aucun autre travail n'a été réalisé sur l'assimilation de l'azote par des céréales attaquées par des pathogènes nécrotrophes ou hémibiotrophes.

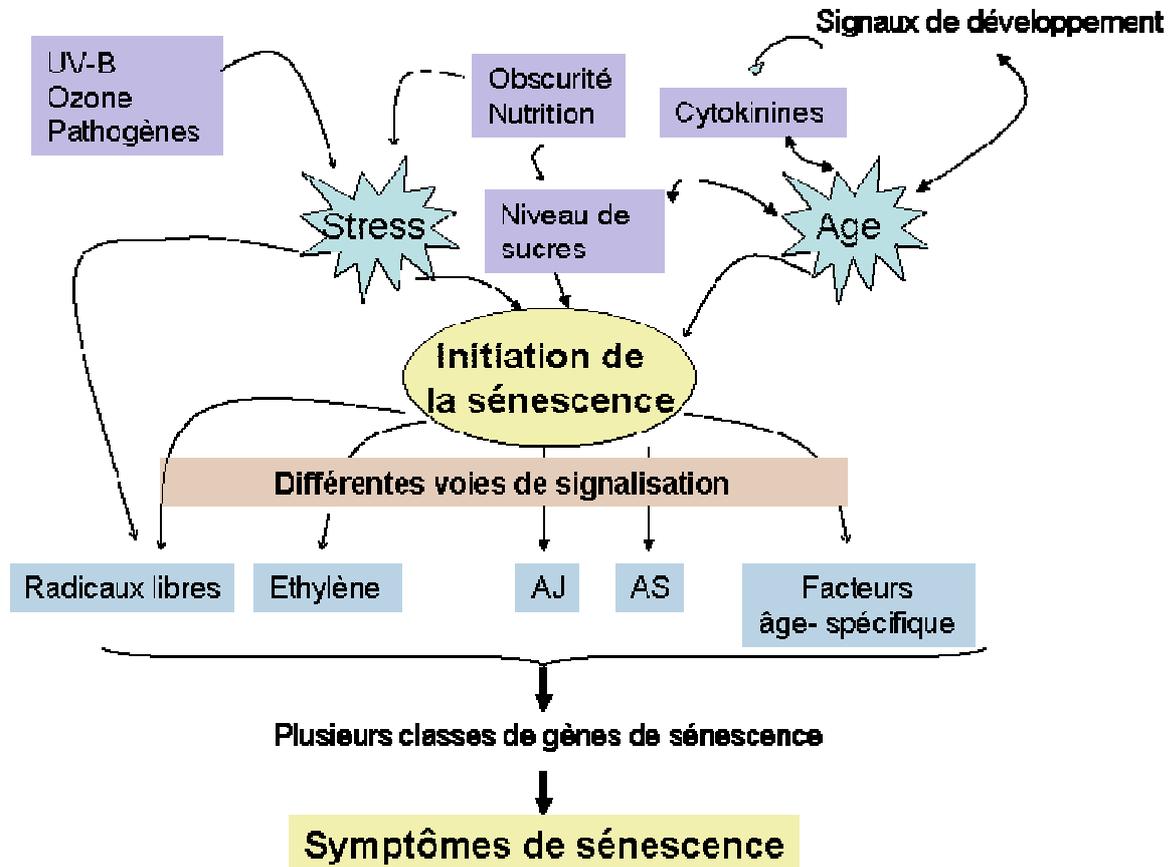


Figure 9: Schéma simplifié des voies nécessaires pour l'expression des gènes au cours de la sénescence (d'après Buchanan-Wallaston et al., 2003)

La sénescence peut être déclenchée par des signaux de développement en relation avec le stade de croissance et la position de la feuille dans la plante. Le niveau de sucres (saccharose, hexoses), et les changements des niveaux de cytokinines peuvent représenter aussi des signaux d'initiation de la sénescence. Parmi les stress qui peuvent induire une sénescence prématurée se trouvent: le stress oxydatif, causé par des facteurs de l'environnement tel que l'ozone, les radiations UV ou des stress de nutrition dus à des carences en azote par exemple. L'initiation de la sénescence résulte en l'induction de voies de signalisation de l'éthylène, l'acide salicylique (AS), l'acide jasmonique (AJ). Les niveaux de radicaux libres, de AS, de AJ, et d'éthylène augmentent au cours de la sénescence et l'expression de certains gènes de sénescence dépend d'un ou plusieurs de ces facteurs.

Les études disponibles se sont attachées à caractériser l'assimilation dans le cas d'une inoculation avec des pathogènes biotrophes (rouille /poireau: Roberts et Walters, 1988; oïdium /orge: Sadler et Scott, 1974; Walters et Ayres, 1980). D'après Sadler et Scott (1974), les concentrations de nitrate et de nitrite ne sont pas affectées dans les feuilles d'orge infectées par l'oïdium (*Erysiphe graminis*). Ils constatent une accumulation d'ammonium, sans modification de l'activité *in vitro* des enzymes de l'assimilation de ce métabolite (NR, NAD-GDH et NADH-GDH). Walters et Ayres (1980) ont également montré pour le même pathosystème une accumulation d'ammonium dans les racines et les feuilles malades conjointement à la conservation des activités NiR et NR. L'accumulation de l'ammonium proviendrait de la réduction de son assimilation par les voies de la GDH ou de la GS/GOGAT. De manière intéressante, Murray et Ayres (1986) constatent une inhibition de la réduction racinaire des nitrates, parallèle à celle de l'absorption, avant la sporulation. Lorsque la sporulation arrive, c'est l'assimilation foliaire qui est inhibée. Les auteurs considèrent que c'est parce que l'énergie nécessaire à la réduction des nitrates devient alors plus limitante. Enfin, Roberts et Walters (1988) obtiennent des résultats assez différents dans le cas de poireaux adultes infectés par la rouille. Douze jours après inoculation, ils observent une accumulation de nitrate et une diminution d'ammonium, la baisse de l'activité de NR, mais un faible effet sur la NiR et l'augmentation de la GS.

Il semble donc que les effets des maladies causées par des biotrophes ne peuvent être généralisés, car ils dépendent fortement du stade d'inoculation des plantes et du pathosystème considéré.

3. Effets sur la remobilisation azotée

La remobilisation azotée est toujours réduite suite à une attaque par des pathogènes foliaires. Cette réduction a été notée à l'échelle du couvert, de la plante entière et à l'échelle des organes; quoique ces différents niveaux d'études n'aient pas reçu la même attention.

a) Modifications métaboliques de la remobilisation chez les feuilles malades

La littérature, assez abondante, peut être comprise à la lumière des principes posés chez la plante saine (Masclaux *et al.*, 2008): l'infection conduit à une réorientation anticipée du métabolisme N de l'assimilation vers la remobilisation.

L'effet de divers stress dont des stress biotiques sur le métabolisme azoté (Pageau *et al.*, 2006) montre une grande convergence: une diminution des activités d'assimilation de l'azote (GS2, NR) et de l'expression des gènes associés, et une augmentation de l'activité des enzymes liées à la remobilisation précoce (GS1) et tardive (GDH) et l'expression des gènes associés. Solomon *et al.* (2003) notent également que la plupart des acides aminés s'accumulent lors d'une infection; en particulier les formes riches en azote assimilables par les champignons (GABA, glutamate, asparagine) sont présents à des concentrations millimolaires. Ces auteurs soulignent que l'accumulation des ressources azotées dans l'apoplasme est liée à l'action conjointe des protéases de la plante et de celles des pathogènes. Dans leur synthèse, Divon et Fluhr (2007) citent même des cas où le pathogène induit ou modifie des activités protéases de la plante pour détourner le métabolisme azoté à son propre usage. Tavernier *et al.* (2007), en étudiant l'effet de *Colletotrichum lindemuthianum* chez le haricot, montrent que l'activité d'assimilation de l'azote spécifique des feuilles non sénescentes (GS2) chute plus rapidement que celle du témoin non inoculé. De plus, les mutants de *C. lindemuthianum* dont le développement est bloqué en phase de pénétration de la cuticule ou en phase biotrophe, ne montrent ni diminution de GS2, ni induction de GS1 et augmentation de glutamine associée. Les auteurs suggèrent que l'augmentation de la concentration en glutamine et le passage à la nécrotrophie sont en lien de cause à effet, coïncidence déjà notée par Rossato *et al.* (2001) dans le cas du pathosystème *Brassica napus* /*Leptosperia maculans*.

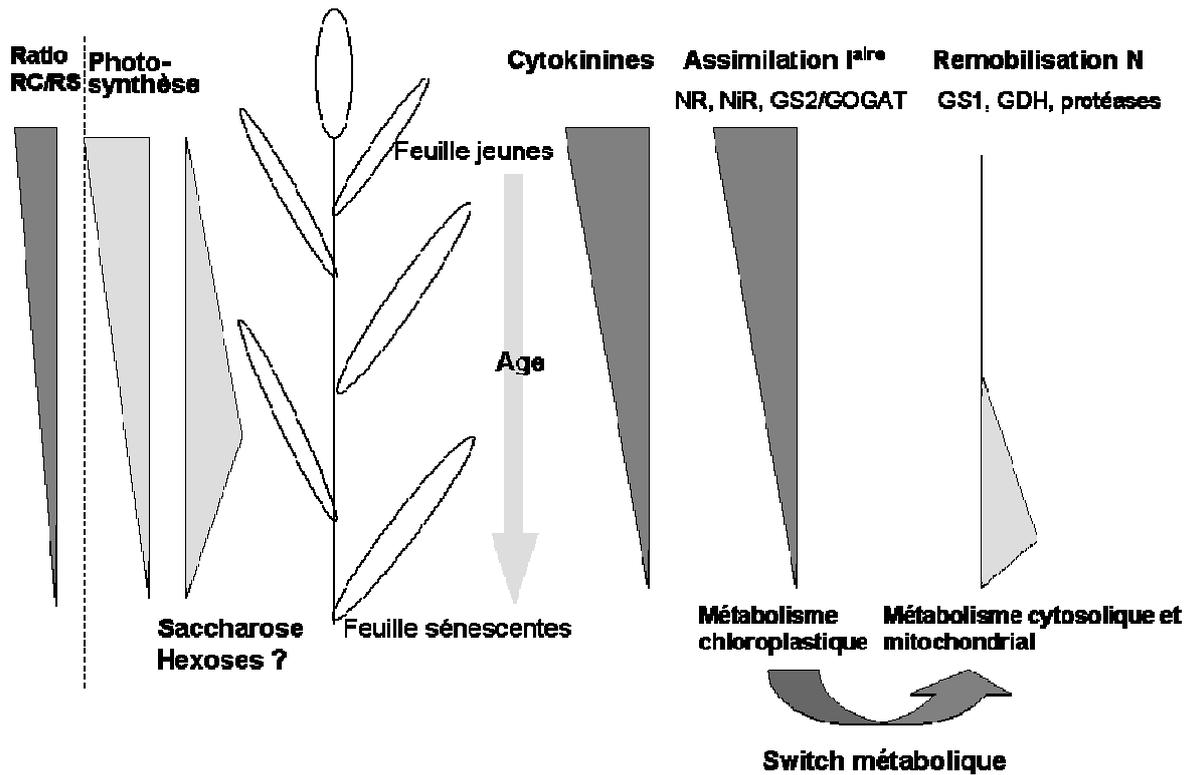


Figure 10: Récapitulation des différents gradients métaboliques, hormonal et de la lumière observés pendant la sénescence foliaire dans une plante dans le couvert (d'après Masclaux et al., 2000)

L'accumulation de la GS1 a été observée dans plusieurs pathosystèmes: *Pseudomonas syringae* chez la tomate (Perez-Garcia *et al.*, 1998); *C. lindemuthianum* chez le haricot (Tavernier *et al.*, 2007); les virus CMV, TEV, PVY chez le tabac (Pageau *et al.*, 2006). Stephenson *et al.* (1997) ont repéré une augmentation d'expression *in planta* de la GS dès les stades précoces de l'infection par *Colletotrichum gloeosporioides*. Dans le cas de l'infection de la tomate par *P. syringae*, une nouvelle isoforme de la GS1 cytosolique est induite et localisée dans les cellules du mésophylle. Perez-Garcia *et al.* (1998) font d'ailleurs l'hypothèse que cette nouvelle GS1 assure dans le cytoplasme la synthèse de la glutamine, précurseur de l'asparagine, acide aminé très riche en azote et forme de transport dans les tissus infectés. Dans le cas de l'infection du haricot par une souche virulente champignon hémibiotrophe *C. lindemuthianum*, Tavernier *et al.* (2007) ont trouvé une accumulation progressive de la GS1, parallèle à celle de la glutamine dans les feuilles malades du haricot et qui débute au moment du passage de la phase biotrophe à nécrotrophe.

L'accumulation de forme d'azote libres est souvent observée au moment de la transition biotrophe /nécrotrophe. Or Snoeijers *et al.* (1999) ont obtenu l'induction de gènes de pathogénicité chez plusieurs champignons en les cultivant sur des milieux appauvris en azote. La disponibilité en azote pourrait donc être une cause directe de la transition biotrophe /nécrotrophe. C'est pourquoi Stephenson *et al.* (1997), quand ils montrent que l'expression de la GS de *C. gloeosporioides* est stimulée dans des cultures axéniques pauvres en azote, en concluent que la GS pourrait jouer un rôle dans le pouvoir pathogène.

Synthèse. Les attaques par des champignons phytopathogènes ont pour conséquence une profonde modification du métabolisme de la plante, qui augmente la disponibilité en azote dans les tissus infectés. L'induction de nouvelles enzymes (GS1) permettant l'assimilation des ions ammonium issus de la protéolyse, et la modification d'activités d'enzymes (protéases) de la plante semblent nécessaires à la pathogénicité. Des enzymes sont induites chez les champignons afin d'optimiser l'absorption des acides aminés ou métabolites ainsi libérés.

b) Remobilisation par les organes malades

Pour beaucoup de pathosystèmes foliaires (Bancal *et al.*, 2008; Bastiaans, 1993; Garry *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 2004; Verreet et Hoffman, 1990), la remobilisation à partir des feuilles malades est réduite et s'arrête plus tôt que chez les témoins, suggérant un blocage d'azote dans ces organes. Ce blocage est généralement proportionnel à la sévérité et à la précocité d'attaque de la maladie.

Robert *et al.* (2004) ont suivi l'évolution de l'azote spécifique (rapporté à la surface) des feuilles drapeau de blé infectées en conditions naturelles par le complexe parasitaire rouille brune + septoriose foliaire (*Puccinia tritici* + *M. graminicola*). La cinétique du SLN des feuilles malades diffère de celle des saines en deux temps. Tout d'abord, lors du développement des symptômes, leur SLN diminue plus vite. Cette perte d'azote par les feuilles malades a été interprétée soit par une remobilisation d'azote plus rapide, soit par une exportation d'azote par les spores riches en azote (Robert *et al.*, 2005). Dans un deuxième temps, avec la nécrose des tissus, le SLN reste bloqué alors que celui des témoins continue à descendre. Cette dynamique est retrouvée en épidémies naturelles quelle que soit la combinaison entre les sévérités respectives de la rouille brune et de la septoriose (Bancal *et al.*, 2008). La bonne relation trouvée entre la durée de vie verte et l'azote remobilisé des feuilles suggère que le blocage d'azote dans les tissus morts est la principale cause de la baisse de remobilisation.

Dans le cas de l'antracnose du pois (*Mycosphaerella pinodes*), les cinétiques des acides aminés libres et des protéines dans les feuilles et gousses malades ont été suivies par Garry *et*

al. (1996). A forte infestation, les protéines sont rapidement bloquées, alors que les acides aminés sont remobilisés plus longtemps au cours de l'infection. C'est tardivement que les acides aminés et protéines sont bloqués dans les tissus nécrosés. Les auteurs suggèrent que l'hydrolyse des protéines est inhibée dans les feuilles et gousses malades, et que le transport des acides aminés est lent à cause du stress hydrique provoqué par la maladie.

Dans le cas de la pyriculariose du riz (*Pyricularia oryzae*), Bastiaans *et al.* (1993) constatent que la teneur en azote est plus élevée dans les tissus verts des feuilles malades que chez les témoins, et ce d'autant plus que l'inoculation est précoce. Cela suggérerait que l'azote serait remobilisé des zones malades vers les zones saines des feuilles infectées contrairement au cas de *M. pinodes* × Pois. En termes de bilan global cependant, la pyriculariose réduit nettement la remobilisation à partir des tiges et des feuilles inoculées, suggérant quand même un blocage d'azote dans les tissus nécrosés.

Ces diverses approches montrent que les bilans azotés rendent mal compte de la perturbation des flux d'azote à partir des organes malades. D'autre part, la prise en compte des formes azotées présentes pourrait rendre compte de points de blocage dans les étapes de remobilisation. Enfin, une compartimentation des flux d'azote au sein de la feuille malade pourrait permettre de mieux appréhender les étapes de la cinétique de remobilisation vers le reste de la plante.

c. Remobilisation par les organes non atteints

Pour tous les pathosystèmes précédemment cités, l'accumulation d'azote dans les grains est réduite par les maladies foliaires. Cependant le critère majeur de qualité des récoltes chez le blé est plutôt la teneur protéique des grains, définie par le rapport entre leur azote et leur matière sèche. Or la teneur protéique ne varie de manière stable ni avec la sévérité et le type de maladie, ni avec le climat (Dimmock et Gooding, 2002). Gooding *et al.* (2005) aussi bien que Bancal *et al.* (2008) ont suggéré que la variabilité de la teneur protéique pourrait être liée à celle de la remobilisation, soit par l'année culturale, soit par un impact spécifique des maladies.

Les maladies foliaires telles que la septoriose et la rouille induisent généralement une baisse de remobilisation à l'échelle de la plante moyenne (Bancal *et al.*, 2008; Ruske *et al.*, 2003) voire un arrêt de remobilisation plus tôt que chez les témoins (Gooding *et al.*, 2005). Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux effets des maladies foliaires sur la remobilisation à partir des organes sains d'une plante malade, alors que ces organes jouent un rôle non négligeable dans l'azote remobilisé vers le grain. Par exemple les limbes ne représentent qu'un tiers de l'azote remobilisé chez le blé. Ces organes sont généralement regroupés partiellement (Verreet et Hoffmann, 1990) ou totalement (Bancal *et al.*, 2008) quand on étudie leur contribution. Selon Bancal *et al.* (2008), la remobilisation à partir de l'ensemble des organes non atteints n'est pas affectée par une attaque par la rouille et septoriose. Une étude plus fine à l'échelle de chaque type d'organe serait nécessaire pour s'assurer de l'absence de compensations entre organes végétatifs pendant le remplissage du grain.

Synthèse. *Le métabolisme azoté des organes malades est profondément modifié lors de l'attaque par les pathogènes; des enzymes clé impliquées dans la remobilisation d'azote sont exprimées ou synthétisées de novo. L'origine végétale (défense) ou fongique (pathogénicité) n'en est parfois pas certaine. L'expression des symptômes aboutit à un blocage d'azote dans les tissus nécrosés. Il en résulte que la cinétique de remobilisation des organes malades est profondément modifiée et in fine, l'azote remobilisé vers les grains diminué. La réponse des autres organes sources d'azote pour la plante est mal connue et demanderait à être approfondie pour la modélisation des flux d'azote dans la plante malade.*

Un schéma de synthèse (figure 11) présente l'état des connaissances sur le fonctionnement azoté dans une plante atteinte par une maladie foliaire et souligne les points manquants.

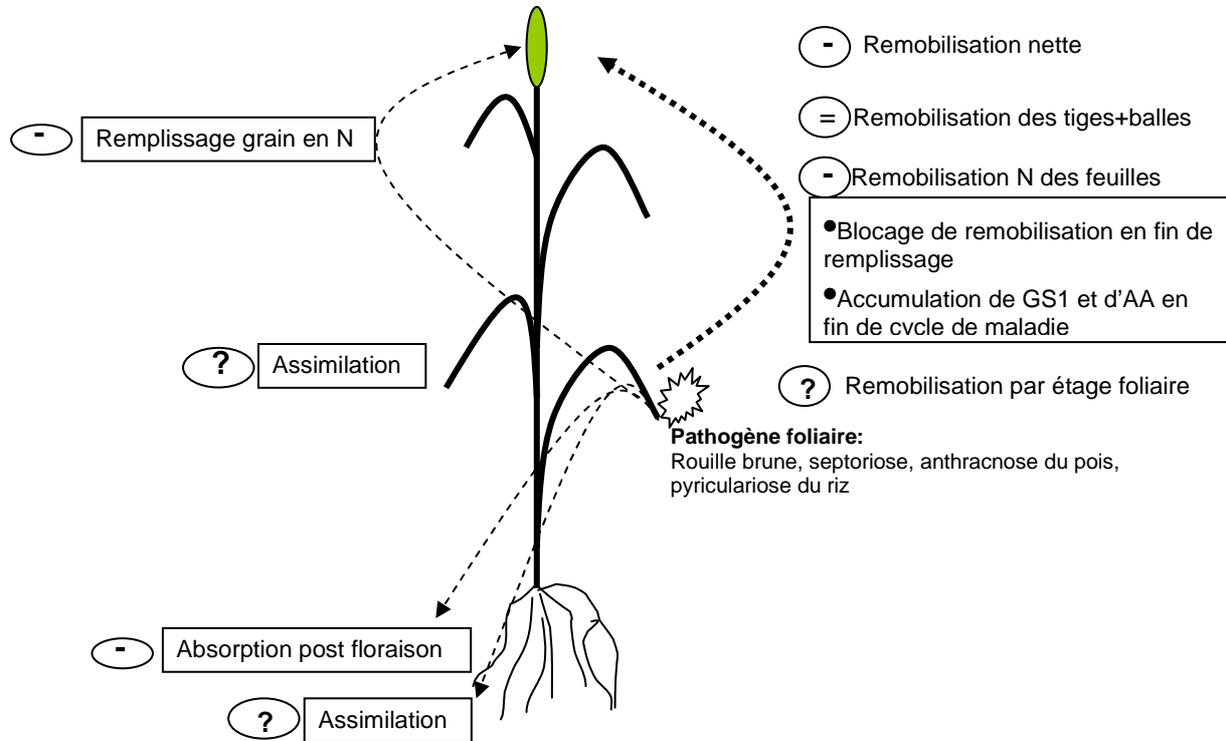


Figure11: État de l'art de l'impact d'une maladie foliaire sur le métabolisme N chez une graminée pendant le remplissage du grain

Le fonctionnement azoté d'une céréale est perturbé sous l'effet d'une maladie foliaire à plusieurs niveaux: la remobilisation N est bloquée en fin de remplissage, la remobilisation nette est réduite. Si la remobilisation à partir des feuilles malades est bien cernée, celle à partir des autres organes sources l'est beaucoup moins. L'absorption de post-floraison est réduite. Le remplissage en N du grain se trouve alors réduit. Des points d'interrogation demeurent toujours concernant l'effet sur l'assimilation.

V- Effets des maladies foliaires sur la sénescence

L'attaque parasitaire peut provoquer soit une **réaction compatible**: la plante n'oppose pas de résistance spécifique au pathogène et ne parvient pas à stopper l'infection et le développement du parasite; soit une **réaction incompatible** qui aboutit à la résistance de la plante. Cette dernière est accompagnée par une **réponse hypersensible** (HR), qui s'exprime sous la forme de zones nécrotiques au site primaire d'infection.

A. Réactions incompatibles

Des similitudes entre la sénescence naturelle et la réaction hypersensible ont été mises en évidence à l'échelle moléculaire. Ainsi Butt *et al.* (1998) ont visualisé la réaction HR par l'expression du gène rapporteur GUS pour un pathogène biotrophe et un autre nécrotrophe. Dans les deux cas, c'est le promoteur du gène de la métallothionéine, une protéine associée à la sénescence, qui s'exprime au niveau du site de HR et aussi dans les tissus aux alentours. De la même manière, la corrélation dans des feuilles saines entre l'initiation de la sénescence (chute du contenu en chlorophylle) et l'accumulation des transcrits de gènes de défense suggère l'existence de voies de signalisation communes entre ces deux processus (Obregon *et al.*, 2001). Par ailleurs, lors d'une interaction incompatible entre l'oïdium (*Blumeria graminis*) et l'orge, l'augmentation rapide de l'activité des invertases dans la zone infectée induit une accumulation d'hexoses dans les zones des feuilles montrant des réponses de résistance (Swarbrick *et al.*, 2006).

Certaines hormones sont impliquées à la fois dans la régulation de la sénescence naturelle et dans celle de la HR (voir la revue de Bari et Jones, 2009). Barth *et al.* (2004) remarquent que des mutants d'*A. thaliana* exhibant des teneurs élevées en acide salicylique montrent une faible croissance de la bactérie hémibiotrophe *P. syringae*. De plus, l'augmentation d'expression des *SAGs* spécifiquement induits par l'acide salicylique (*SAG27*) et l'ABA/éthylène (*SAG15* et *SAG13*) ont pour conséquence l'apparition précoce de sénescence chez le mutant. L'éthylène et l'acide jasmonique sont également impliqués dans la résistance aux nécrotrophes (Glazebrook, 2005; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Thaler *et al.* (2004) semblent même montrer qu'il existe un continuum entre biotrophes et nécrotrophes. Ils notent que les mutants ne synthétisant pas d'acide jasmonique ont une sensibilité accrue à une large gamme de pathogènes et la restauration de la résistance par apport exogène d'acide jasmonique permet de classer les pathogènes selon leur degré de biotrophie.

Les différences entre la HR et la sénescence naturelle sont dues notamment aux différences de distribution spatiale des réponses, de leurs cinétiques et conséquences. Alors que la progression de la sénescence naturelle est relativement lente, permettant la remobilisation des nutriments, la HR est plus rapide et génère une barrière physique qui limite la propagation des pathogènes (Lers, 2007). D'autre part, Obregon *et al.* (2001) ont montré que la distribution spatiale de l'expression des gènes varie entre les réactions compatibles et incompatibles. Dans les réactions incompatibles, l'expression des gènes est confinée aux alentours des lésions HR, alors qu'elle s'étend à toute la zone inoculée dans les réactions compatibles.

B. Réactions compatibles

1. Cinétique de sénescence induite par les maladies

Dans le cas du tournesol infecté par l'hémibiotrophe *Verticillium dahlia*, Sadras *et al.* (2000) n'ont pas remarqué de modification de la vitesse de sénescence après la floraison. Toutefois, ce résultat n'est pas étayé par des données quantitatives ce qui ne permet pas d'aller plus loin dans les interprétations. Dans le cas général, on constate généralement une disparition des

surfaces vertes plus précoce que chez le témoin. A partir du moment où l'on rapproche la sénescence des malades de celles des sains, on peut distinguer ce qui relève de l'accélération (la sénescence progresse plus vite) et/ou de l'anticipation (la sénescence est déclenchée plus tôt). La distinction peut paraître un peu théorique au niveau moléculaire où l'on a tendance à considérer la sénescence comme un continuum mis en place dès l'émission des organes (Buchanan-Wollaston, 1997). Dans le cas de pathogènes hémibiotrophes cependant, la transition nécrotrophe suggère fortement qu'une induction est à l'œuvre (Tavernier *et al.*, 2007). C'est dans une perspective de modélisation du développement de la maladie que la distinction devient pertinente. Or les cinétiques observées sont généralement exponentielles ou sigmoïdes, et un décalage temporel (anticipation) peut facilement passer pour une accélération. De plus une certaine imprécision existe dans la littérature. Le terme LAD (*Leaf Area Duration*) désigne tantôt l'aire sous la courbe des surfaces vertes, et tantôt leur point d'inflexion.

2. Différentes sénescences dans une feuille malade

La plupart des études considèrent la sénescence de la feuille uniquement à travers sa perte de surface verte, sans distinction entre symptômes (surface portant des pycnides dans le cas de la septoriose) et zones sénescentes asymptomatiques. Il y a donc confusion dans la définition de la sénescence induite. Dans une optique de modélisation, il est important de séparer les symptômes de la sénescence proprement dite. On pourrait même décomposer cette dernière en une sénescence 'naturelle' et en une sénescence locale se développant autour des symptômes.

a) Cinétique de sénescence locale

Dans le cas de la septoriose, on constate généralement que la zone nécrotique n'est pas entièrement fructifère. On pourrait comparer cette sénescence induite locale à la sénescence souvent observée autour des lésions HR dans les réactions incompatibles (Butt *et al.*, 1998; Pontier *et al.*, 1999). Magboul *et al.* (1992) ont suivi la cinétique de la sénescence locale des symptômes de la septoriose. Selon eux, la vitesse de développement de cette sénescence est fortement et linéairement reliée à la vitesse de la sévérité d'attaque. Malheureusement les auteurs n'explicitent pas clairement comment ils séparent la zone contenant les pycnides du reste, ce qui pose le problème de la reproductibilité de leurs résultats. D'autre part, Kema *et al.* (1996a) estiment à partir d'une large gamme de variétés et de pathotypes, que le déterminisme génétique de l'apparition et l'extension de symptômes sporulants diffère de celui des zones asymptomatiques avoisinantes. Ces auteurs utilisent même ces deux paramètres pour caractériser les interactions entre la résistance de l'hôte et virulence de la souche. Dans les cas de surface nécrosée importante mais avec peu de pycnides (configuration fréquemment retrouvée au champ), le champignon semblerait ne coloniser que faiblement les tissus. Cela suggère selon eux un contrôle des zones nécrotiques par le champignon, mais impliquant plutôt l'avirulence que la virulence.

En conclusion, même au niveau local, la sénescence induite par l'infection d'un pathogène peut être analysée comme résultant de l'action combinée du pathogène et de la plante, ce qui ne facilite pas sa compréhension.

b) Cinétique de sénescence apicale

Chez les graminées, la sénescence des feuilles saines progresse à partir de leur pointe. On peut donc considérer la sénescence apicale hors de la zone infectée comme caractéristique de la gestion par la plante seule de sa propre sénescence. Il n'est cependant pas impossible d'imaginer que la maladie, en perturbant les équilibres trophiques et hormonaux des feuilles malades altère indirectement sa sénescence en dehors de toute action directe du champignon. Les effets de la septoriose sur la sénescence apicale ont été quantifiés par Robert (2003) dans le cas d'une inoculation à la maladie à une forte dose de 10^8 spores /mL en conditions

contrôlées. La sénescence apicale dans les feuilles malades augmentait exponentiellement avec la sévérité d'attaque. Selon l'auteur, le rapport entre sénescence des malades et des sains devient supérieur à 1 pour des sévérités supérieures à 12% de la surface foliaire. Toutefois cette relation a été construite en mélangeant aspect cinétique et variation interindividuelle de réussite de l'inoculation. Sans distinction des courbes individuelles, la vitesse de la sénescence apicale n'a pas été quantifiée. Il n'est donc pas vraiment possible de parler d'accélération de sénescence apicale. Les fortes sévérités correspondaient à un jaunissement brutal en réponse à une dose d'inoculum excédant largement ce qui est observé dans la nature (Lovell *et al.*, 1997).

Synthèse. Il ressort de cette analyse la nécessité, dans un objectif de modélisation de l'effet d'une épidémie sur la perte de surface verte, de séparer les composantes de la sénescence induite. La sénescence locale autour des lésions sporulantes et la sénescence apicale sont deux processus différents. Actuellement, très peu d'études sont disponibles sur les cinétiques de ces deux formes de sénescence. Toutefois, en raison de la simplicité relative du suivi de la progression la sénescence apicale chez les céréales en comparaison avec la sénescence locale, l'une des priorités est de se pencher sur la cinétique de la sénescence apicale de feuilles de blé dans le cas d'une attaque par la septoriose.

3. Perturbation des facteurs internes (sucres, hormones, azote)

Le métabolisme des sucres est très perturbé dans le cas des biotrophes (figure 12, figure 13). Dans le cas du pathosystème oïdium (*Erysiphe graminis*) /blé, l'activité de l'invertase double entre 2 et 7 jours après l'inoculation. Selon Wright *et al.* (1995) cette augmentation d'activité serait consécutive à un signal émis par le champignon plutôt que liée à la taille de puits supplémentaire représentée par le champignon biotrophe. Dans le cas d'une attaque d'*Arabidopsis* par *Albugo candida* (Chou *et al.*, 2000), l'activité des invertases augmente dans les régions de la feuille attaquées par le mycélium. Alors que l'augmentation de l'activité de l'invertase apoplastique est d'origine végétale, l'augmentation de l'activité de l'invertase soluble est d'origine fongique (nouvelle isoforme détectée dans la région attaquée). D'après Roitsch *et al.* (2003), c'est l'induction de l'invertase qui entraîne une accumulation de sucres dans les feuilles malades qu'ils justifient par l'activation d'une cascade de réactions de défense qui nécessite une énergie supplémentaire. L'accroissement de la teneur en sucres pourrait aussi être lié à une perturbation de l'exportation. Elle génère un signal métabolique qui inhibe la photosynthèse et induit l'expression de gènes de défense en plus de signaux dérivés des pathogènes. Ces auteurs estiment que l'invertase extracellulaire n'est pas seulement une enzyme métabolique mais qu'elle peut être considérée comme une protéine PR (pathogenesis related). Dans le cas des nécrotrophes (figure 14), la voie des sucres semble également impliquée (Berger *et al.*, 2004), en dépit de la rareté des études qui la traitent.

La perturbation de la sénescence par le métabolisme azoté est documentée dans le cas des biotrophes. Dans le cas du pathosystème *Puccinia coronata*/*Holcus lanatus*, van den Berg *et al.* (2008) supposent que c'est le pompage de l'azote par le pathogène qui déclenche l'apparition anticipée de la sénescence. Van den Berg *et al.* (2007) ont même modélisé la relation entre la dynamique du pathogène biotrophe *Puccinia triticina* et la sénescence apicale du blé. Dans leur modèle, la durée de la sénescence apicale est déterminée par la demande d'azote par les puits et par la vitesse de conversion de l'azote indirectement utilisable. La durée de sénescence apicale est réduite avec l'accroissement de la demande des puits.

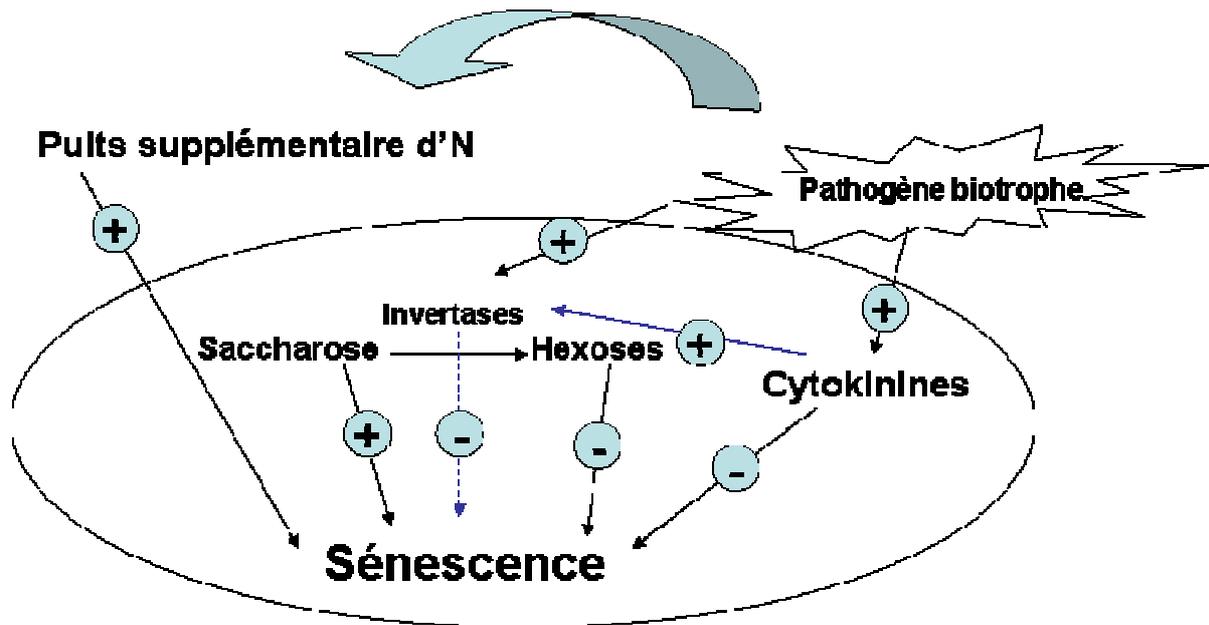


Figure 12: Régulation de la sénescence foliaire dans le cas d'un pathogène biotrophe

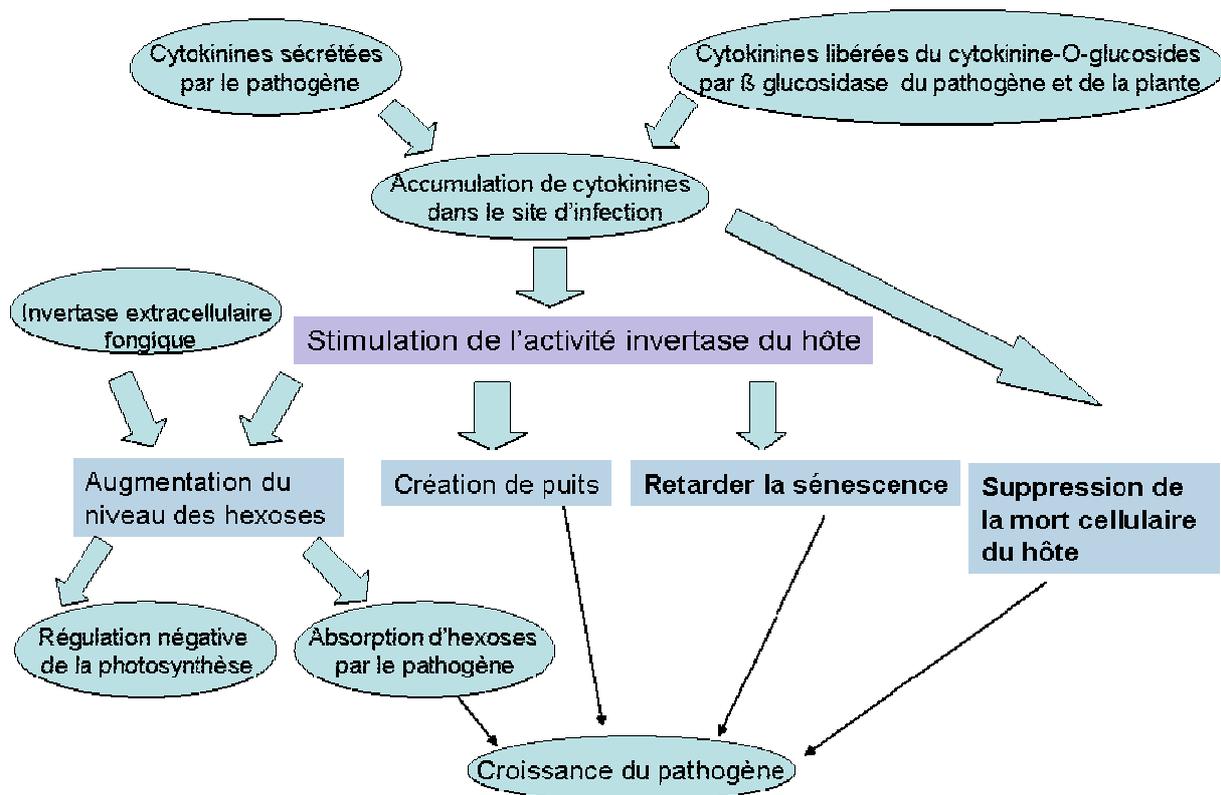


Figure 13: Schéma hypothétique du mode d'action d'un pathogène biotrophe sur la sénescence par la voie des sucres (d'après Walters et McRoberts, 2006)

La régulation hormonale est perturbée par les biotrophes qui semblent utiliser les cytokinines, pour retarder la sénescence dans les réactions compatibles, et permettre une meilleure croissance du pathogène (Walters et McRoberts, 2006). Ce phénomène serait à l'origine de la formation des 'îlots verts', anneaux où la sénescence est très retardée juste autour des sites d'infection. Chez les nécrotrophes, les cytokinines ne seraient pas impliquées (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Des informations contrastées existent concernant le rôle de l'éthylène dans les interactions plantes-pathogènes. En effet, cette hormone peut agir en tant que facteur de virulence de *Botrytis cinerea*, comme elle peut intervenir dans les voies de défense contre les nécrotrophes (van Loon *et al.*, 2006). Ces auteurs proposent que ce soit le moment d'application de l'éthylène qui explique l'effet induit.

Enfin, chez les nécrotrophes, la sénescence et la mort cellulaire peuvent être induites par des toxines. Par exemple, *Botrytis elliptica* induit la PCD chez le lis (van Baarlen *et al.*, 2004).

Des effets similaires ont été observés lors de traitement de feuilles de tomates sensibles à la toxine d'*Alternaria alternata* (Wang *et al.*, 1996). L'application de filtrats de *Magnaporthe grisea* carencé en azote (donc susceptible de déclencher l'induction de gènes de pathogénicité) sur des feuilles de riz, entraîne leur sénescence 48 heures après le traitement (Talbot *et al.*, 1997). Dans le cas de la septoriose aucune toxine n'a pour l'instant été identifiée, bien que Kema (comm.pers.) affirme en avoir détecté une qui agirait en interaction avec la lumière.

Synthèse. *Les pathogènes biotrophes et nécrotrophes modifient profondément et différemment les métabolismes du carbone et de l'azote, ce qui va en cascade avoir des conséquences sur la régulation de la sénescence foliaire. Alors que les biotrophes, en créant un nouveau puits pour la plante, sont associés à la voie des cytokinines, hormone antisénescence, les nécrotrophes empruntent la voie de l'éthylène lors de l'induction de nécroses; pour ces derniers, et dans certains cas seulement, la biosynthèse de toxines par le champignon est associée à la sénescence qu'ils induisent.*

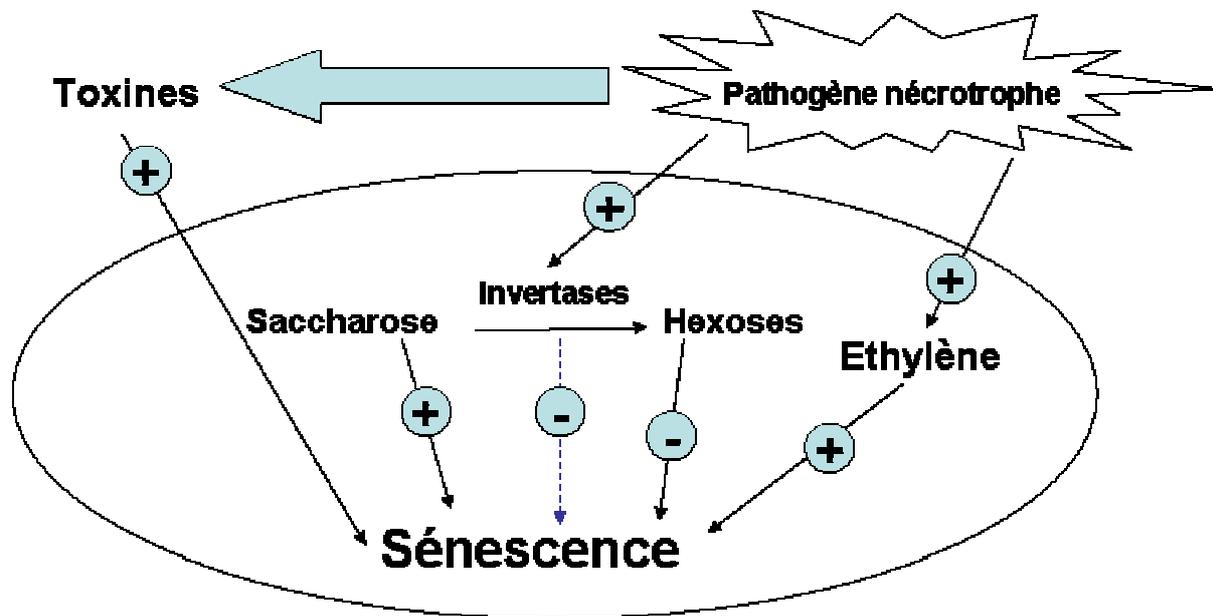


Figure14: Régulation de la sénescence foliaire dans le cas d'un pathogène nécrotrophe

Références bibliographiques:

- Aubert S, Bligny R, Douce R, Gout E, Ratcliffe RG, Roberts JKM** (2001). Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Journal of Experimental Botany* **52**(354): 37-45.
- Balibrea Lara ME, Garcia MCG, Fatima T, Ehness R, Lee T, Proels R, Tanner W, Roitsch T** (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell* **16**(5): 1276-1287.
- Bancal MO, Roche R, Bancal P** (2008). Late foliar diseases in wheat crops decrease nitrogen yield through N uptake rather than through variations in N remobilization. *Annals of Botany* **102**(4): 579-590.
- Bancal M-O, Robert C, Ney B** (2007). Modelling wheat growth and yield losses from late epidemics of foliar diseases using loss of green leaf area per layer and pre-anthesis reserves. *Annals of botany* **100**: 777-789.
- Bancal P** (2009). Decorrelating source and sink determinism of nitrogen remobilization during grain filling in wheat. *Annals of Botany* **103**: 1315-1324.
- Barbottin A, Lecomte C, Bouchard C, Jeuffroy M-H** (2005). Nitrogen remobilization during grain filling in wheat: genotypic and environmental effects. *Crop Science* **45**: 1141-1150.
- Bari R, Jones J** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**(4): 473-488.
- Barneix AJ** (2007). Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of Plant Physiology* **164**: 581-590.
- Barth C, Moeder W, Klessig DF, Conklin PL** (2004). The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant *vitamin c-1*. *Plant Physiology* **134**(4): 1784-1792.
- Bastiaans L** (1993). Effects of leaf blast on growth and production of a rice crop. I Determining the mechanism of yield reduction. *European Journal of Plant Pathology* **99**(4): 197-203
- Bearchell SJ, Fraaije BA, Shaw MW, Fitt BDL** (2005). Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution. *PNAS* **102**(15): 5438-5442.
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T** (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* **122**(4): 419-428.
- Bertheloot J, P. M, B. A** (2008). Dynamics of light and nitrogen distribution during grain filling within wheat canopy. *Plant Physiology* **148**: 1707-1720.
- Buchanan-Wollaston V** (1997). The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **48**(2): 181-199.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D** (2003). The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**(1): 3-22.
- Butt A, Mousley C, Morris K, Beynon J, Can C, Holub E, Greenberg JT, Buchanan-Wollaston V** (1998). Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* **16**(2): 209-221.
- Caron D** (2000). Maladies des blés et des orges. ITCF, (eds) 88 p
- Chou HM, Bundock N, Rolfe SA, Scholes JD** (2000). Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology* **1**(2): 99-113.
- Crafts-Brandner SJ, Holzer R, Feller U** (1998). Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **102**: 192-200.
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P** (2000). Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**(9): 647-655.
- Dimmock JPRE, Gooding MJ** (2002). The influence of foliar diseases, and their control by fungicides, on the protein concentration in wheat grain: a review. *The Journal of Agricultural Science* **138**(4): 349-366.

- Divon HH, Fluhr R** (2007). Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiology Letters* **266**(1): 65-74.
- Dubois F, Brugière N, Sangwan RS, Hirel B** (1996). Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Molecular Biology* **31**(4): 803-817.
- Dubois F, Terce-Laforgue T, Gonzalez-Moro MB, Estavillo JM, Sangwan R, Gallais A, Hirel B** (2003). Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiology and Biochemistry* **41**(6/7): 565-576.
- Eyal Z, Scharen AL, Prescott JM, Ginkel MV** (1987). The *Septoria* diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, (eds) Mexico D.F. 46 p
- Feller U** (1979). Effect of changed source / sink relation on proteolytic enzyme activities and on nitrogen mobilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Cell Physiology* **20**(8): 1577-1583.
- Feller U, Fischer A** (1994). Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**(3): 241-273.
- Foulkes MJ, Hawkesford MJ, Barraclough PB, Holdsworth MJ, Kerr S, Kightley S, Shewry PR** (2009). Identifying traits to improve the nitrogen economy of wheat: Recent advances and future prospects. *Field Crops Research* **114**(3): 329-342.
- Gan S, Amasino RM** (1997). Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* **113**(2): 313-319.
- Garry G, Tivoli B, Jeuffroy MH, Citharel J** (1996). Effects of Ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on the translocation of carbohydrates and nitrogenous compounds from the leaf and hull to the seed of dried-pea. *Plant Pathology* **45**(4): 769-777.
- Gastal F, Lemaire G** (2002). N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* **53**(370): 789-799.
- Gate P** (1995). Ecophysiology du blé. T Doc./Lavoisier, (eds) 423 p
- Gebbing T, Schnyder H, Kühbauch W** (1998). Carbon mobilization in shoot parts and roots of wheat during grain filling: assessment by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ steady-state labelling, growth analysis and balance sheets of reserves. *Plant, Cell and Environment* **21**(3): 301-313.
- Gepstein S, Sabehi G, Carp MJ, Hajouj T, Neshar MFO, Yariv I, Dor C, Bassani M** (2003). Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant Journal* **36**(5): 629-642.
- Glass ADM, Britto DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Anshuman K, Okamoto M, Suman R, Siddiqi MY, Unkles SE, Vidmar JJ** (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. (eds) *Journal of Experimental Botany*. **53**, pp 855-864.
- Glazebrook J** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205-227.
- Gomez-Macpherson H, Richards RA, Masle J** (1998). Growth of near-isogenic wheat lines differing in development-plants in a simulated canopy. *Annals of Botany* **82**(3): 323-330.
- Gooding MJ, Gregory PJ, Ford KE, Pepler S** (2005). Fungicide and cultivar affect post-anthesis patterns of nitrogen uptake, remobilization and utilization efficiency in wheat. *Journal of Agricultural Science* **143**: 503-518.
- Grbić V, Bleecker AB** (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **8**(4): 595-602.
- Gregersen PL, Holm PB, Krupinska K** (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* **10**(s1): 37-49.
- Guitman MR, Arnozis PA, Barneix AJ** (1991). Effect of source-sink relations and nitrogen nutrition on senescence and N remobilization in the flag leaf of wheat. *Physiologia Plantarum* **82**: 278-284.
- He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S** (2002). Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* **128**: 876-884.
- Hikosaka K** (2005). Leaf canopy as a dynamic system: ecophysiology and optimality in leaf turnover. *Annals of Botany* **95**: 521-533.
- Hirel B, Andrieu B, Valadier MH, Renard S, Quillere I, Chelle M, Pommel B, Fournier C, Drouet JL** (2005). Physiology of maize II: identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. *Physiologia Plantarum* **124**(2): 178-188.

- Hirel B, Gouis JI, Ney B, Gallais A** (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. (eds) *Journal of Experimental Botany*. **58**, pp 2369-2387.
- Hortensteiner S, Feller U** (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany* **53**(370): 927-937.
- Jamieson PD, Semenov MA** (2000). Modelling nitrogen uptake and redistribution in wheat. *Field Crops Research* **68**(1): 21-29.
- Jordi W, Schapendonk A, Davelaar E, Stoopen GM, Pot CS, Visser Rd, Rhijn JAv, Gan S, Amasino RM** (2000). Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant, Cell and Environment* **23**(3): 279-289.
- Justes E** (1993). Diagnostic de la nutrition azotée du blé à partir de la teneur en nitrates de la base de la tige. Application au raisonnement de la fertilisation. Thèse de doctorat. Paris. 227 p.
- Kema GHJ, Annone JG, Sayoud R, Silfhout CHV, Ginkel MV, Bree Jd** (1996a). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat *Mycosphaerella graminicola* pathosystem I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* **86**(2): 200-212.
- Kema GHJ, Yu DZ, Rijkenberg FHJ, Shah MW, Baayen RP** (1996b). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* **86** 777-786.
- Keon J, Antoniw J, Carzaniga R, Deller S, Ward JL, Baker JM, Beale MH, Hammond-Kosack K, Rudd JJ** (2007). Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(2): 178-193.
- Kichey T, Gouis JI, Sangwan B, Hirel B, Dubois F** (2005). Changes in the cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during flag leaf senescence in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Cell Physiology* **46**(6): 964-974.
- Kichey T, Heumez E, Pocholle D, Pageau K, Vanacker H, Dubois F, Gouis JI, Hirel B** (2006). Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat highlight a central role for glutamine synthetase. *New Phytologist* **169**(2): 265-278.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Gouis JI** (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* **102**(1): 22-32.
- Laboun S, Tercé-Laforgue T, Roscher A, Bedu M, Restivo FM, Velanis CN, Skopelitis DS, Moshou PN, Roubelakis-Angelakis KA, Suzuki A, Hirel B** (2009). Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. in vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments. *Plant and Cell Physiology* **50**(10): 1761-1773.
- Leitch MH, Jenkins PD** (1995). Influence of nitrogen on the development of *Septoria* epidemics in winter wheat. *Journal of Agricultural Science* **124**: 361-368.
- Lers A** (2007). Environmental regulation of leaf senescence. In: S Gan, (eds) Senescence processes in plants. Annual plant reviews **26**, pp 108-144.
- Lim P, Kim H, Nam H** (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 115-136.
- Lopes MS, Cortadellas N, Kichey T, Dubois F, Habash DZ, Araus JL** (2006). Wheat nitrogen metabolism during grain filling: comparative role of glumes and the flag leaf. *Planta* **225**: 165-181.
- Lovell DJ, Hunter T, Powers SJ, Parker SR, van den Bosch F** (2004). Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* **53**: 170-181.
- Lovell DJ, Parker SR, Hunter T, Royle DJ, Coker RR** (1997). Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* **46**: 126-138.
- Ma Y-Z, MacKown CT, van Sanford DA** (1996). Differential effects of partial spikelet removal and defoliation on kernel growth and assimilate partitioning among wheat cultivars. *Field crop research* **47**: 201-209.
- MacKown CT, van Sanford DA** (1988). Nitrogen allocation with altered sink demand in wheat. *Crop Science* **28**(1): 133-136.
- MacKown CT, van Sanford DA, Zhang N** (1992). Wheat vegetative nitrogen compositional changes in response to reduced reproductive sink strength. *Plant Physiology* **99**: 1469-1474.

- Magboul AM, Geng S, Gilchrist DG, Jackson LF** (1992). Environmental influence on the infection of wheat by *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **82**(12): 1407-1413.
- Martinez-Carrasco R, Thorne GN** (1979). Physiological factors limiting grain size in wheat. *Journal of Experimental Botany* **30**(117): 669-679.
- Martre P, Porter JR, Jamieson PD, Triboi E** (2003). Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink / source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology* **133**: 1959-1967.
- Masclaux C, Quilleré I, Gallais A, Hirel B** (2001). The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. *Annual Applied Biology* **138**: 69-81.
- Masclaux C, Valadier M-H, Brugière N, Morot-Gaudry J-F, Hirel B** (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**: 510-518.
- Masclaux-Daubresse C, Carrayol E, Valadier M-H** (2005). The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated *GSI* and *GDH* genes are controlled by C and N metabolites. *Planta* **221**(4): 580-588.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M** (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**(s1): 23-36.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier M-H, Feraud M, Jouglet T, Suzuki A** (2006). Glutamine synthetase-glutamate synthetase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiology* **140**: 444-456.
- Masclaux-Daubresse C, Valadier MH, Carrayol E, Reisdorf-Cren M, Hirel B** (2002). Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell and Environment* **25**(11): 1451-1462.
- Meyer C, Stitt M** (2001). Nitrate reduction and signalling. In: PJ Lea and JF Morot-Gaudry, (eds) *Plant Nitrogen*. pp 37-59.
- Miflin BJ, Habash DZ** (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* **53**: 979-987.
- Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ** (2007). Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany* **59**(1): 111-119.
- Morris K, Mackerness SAH, Page T, John CF, Murphy AM, Carr JP, Buchanan-Wollaston V** (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal* **23**(5): 677-685.
- Murray AJS, Ayres PG** (1986). Uptake and translocation of nitrogen by mildewed barley seedlings. *New Phytologist* **104**: 355-365.
- Neales TF, Anderson MJ, Wardlaw IF** (1963). The role of the leaves in the accumulation of nitrogen by wheat during ear development. *Australian Journal of Agricultural Research* **14**: 725-736.
- Noh YS, Amasino RM** (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of *SAG12*. *Plant Molecular Biology* **41**(2): 181-194.
- Nooden LD, Guamet JJ, John I** (1997). Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **101**(4): 746-753.
- Oaks A** (1995). Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. *Canadian Journal of Botany* **73**(7): 1116-1117.
- Obregon P, R. M, Sanz A, Castresana C** (2001). Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Molecular Biology* **46**: 67-77.
- Ono K, Nishi Y, Watanabe A, Terashima I** (2001). Possible mechanisms of adaptive leaf senescence. *Plant Biology* **3**(3): 234-243.
- Ono K, Terashima I, Watanabe A** (1996). Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. *Plant and Cell Physiology* **37**(8): 1083-1089.
- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry J-F, Masclaux-Daubresse C** (2006). The two senescence-related markers, *GSI* (cytosolic glutamine synthetase) and *GDH* (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack

- and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**(3): 547-557.
- Parrott D, Yang L, Shama L, Fischer AM** (2005). Senescence is accelerated, and several proteases are induced by carbon "feast" conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Planta* **222**(6): 989-1000.
- Pérez P, Martínez-Carrasco R, Del Molino MM, Rojo B, Ulloa M** (1989). Nitrogen uptake and accumulation in grains of three winter wheat varieties with altered source-sink ratios. *Journal of Experimental Botany* **40**(215): 707-710.
- Pérez-García A, Pereira S, Pissarra J, Gutiérrez AG, Cazorla FM, Salema R, de Vicente A** (1998). Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta* **206**: 426-434.
- Pontier D, Balague C, Roby D** (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie* **321**(9): 721-734.
- Pourtau N, Marès M, Purdy S, Quentin N, Ruël A, Wingler A** (2004). Interactions of abscisic acid and sugar signalling in the regulation of leaf senescence. *Planta* **219**(5): 765-772.
- Robert C** (2003). Etude et modélisation du fonctionnement d'un couvert de blé attaqué par le complexe parasitaire *Puccinia triticina- Mycosphaerella graminicola*. Thèse de doctorat. INAPG, Paris. 135 p.
- Robert C, Bancal M-O, Lannou C, Ney B** (2006). Quantification of the effects of *Septoria tritici* blotch on wheat gas exchange with respect to lesion age, leaf number, and leaf nitrogen status. *Journal of Experimental Botany* **57**(1): 225-234.
- Robert C, Bancal M-O, Ney B, Lannou C** (2005). Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytologist* **165**(1): 227-241.
- Robert C, Bancal M-O, Nicolas P, Lannou C, Ney B** (2004). Analysis and modelling of effects of leaf rust and *Septoria tritici* blotch on wheat growth. *Journal of Experimental Botany* **55**(399): 1-16.
- Robert C, Fournier C, Andrieu B, A Ney B** (2008). Coupling a 3D virtual wheat (*Triticum aestivum*) plant model with a *Septoria tritici* epidemic model (Septo3D): a new approach to investigate plant-pathogen interactions linked to canopy architecture. *Functional Plant Biology* **35**: 997-1013
- Roberts AM, Walters DR** (1988). Nitrogen assimilation and metabolism in rusted leek leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **32**(2): 229-235.
- Robert-Seilantza A, Navarroa L, Baria R, Jones JD** (2007). Pathological hormone imbalances *Current Opinion in Plant Biology* **10**(4): 372-379.
- Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK** (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* **54**(382): 513-524.
- Rossato L, Lainé P, Ourry A** (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany* **52**(361): 1655-1663.
- Rousseaux M, Hall A, Sanchez R** (1996). Far-red enrichment and photosynthetically active radiation level influence leaf senescence in field-grown sunflower. *Physiologia Plantarum* **96**: 217-224.
- Rousseaux MC, Hall AJ, Sanchez RA** (1999). Light environment, nitrogen content, and carbon balance of basal leaves of sunflower canopies. *Crop Science* **39**(4): 1093-1100.
- Rousseaux MC, Hall AJ, Sánchez RA** (2000). Basal leaf senescence in a sunflower (*Helianthus annuus*) canopy: responses to increased R/FR ratio. *Physiologia Plantarum* **110**(4): 477-482.
- Ruske RE, Gooding MJ, Jones SA** (2003). The effects of adding picoxystrobin, azoxystrobin and nitrogen to a triazole programme on disease control, flag leaf senescence, yield and grain quality of winter wheat. *Crop Protection* **22**: 975-987.
- Sadler R, Scott KJ** (1974). Nitrogen assimilation and metabolism in barley leaves infected with the powdery mildew fungus. *Physiological Plant Pathology* **4**(2): 235-247.
- Sadras VO, Hall AJ, Connor DJ** (1993). Light-associated nitrogen distribution profile in flowering canopies of sunflower (*Helianthus annuus* L.) altered during grain growth. *Oecologia* **95**(4): 488-494.
- Sadras VO, Quiroz F, Echarte L, Escande A, Pereyra VR** (2000). Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. *Annals of Botany* **86**(5): 1007-1015.

- Savary S, Castilla NP, Elazegui FA, McLaren CG, Ynalvez MA, Teng PS** (1995). Direct and indirect effects of nitrogen supply and disease source structure on rice sheath blight spread. *Phytopathology* **85**(9): 959-965.
- Savary S, Teng PS, Willocquet L, Nutter FW** (2006). Quantification and modeling of crop losses: A review of purposes. *Annual Review of Phytopathology* **44**(1): 89-112.
- Schippers JHM, Jing H-C, Hille J, Dijkwel PP** (2007). Developmental and Hormonal Control of Leaf Senescence In: S Gan, (eds) Senescence processes in plants. **26**, pp 145-170.
- Shaw MW** (1990). Effects of temperature, leaf wetness and cultivar on the latent period of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Plant Pathology* **39**(2): 255-268.
- Shaw MW, Royle DJ** (1989). Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. *Plant Pathology* **38**(1): 35-43.
- Shearer BL** (1978). Inoculum density-host response relationships of spring wheat cultivars to infection by *Septoria tritici*. *Netherlands Journal Plant Pathology* **84**: 1-12.
- Shtienberg D** (1992). Effects of foliar diseases on gas exchange processes: a comparative study. *Phytopathology* **82**(7): 760-765.
- Shtienberg D, Dinooor A, Marani A** (1990). Evaluation of the single tillers method for yield loss assessment in wheat under israeli conditions. *Journal of Phytopathology* **130**(4): 331-341.
- Simpson RJ, Lambers H, Dalling MJ** (1983). Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. *Plant Physiology* **71**: 7-14.
- Snoeijers SS, Vossen P, Goosen T, van den Broek HWJ, De Wit PJGM** (1999). Transcription of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by a GATA-type transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG* **261**(4): 653-659.
- Solomon PS, Tan K-C, Oliver RP** (2003). The nutrient supply of pathogenic fungi: a fertile field for study *Molecular Plant Pathology* **4**(3): 203-210.
- Stephenson S-A, Green JR, Manners JM, Maclean DJ** (1997). Cloning and characterisation of glutamine synthetase from *Colletotrichum gloeosporioides* and demonstration of elevated expression during pathogenesis on *Stylosanthes guianensis*. *Current Genetics* **31**(5): 447-454.
- Swarbrick PJ, Schulze-Lefert P, Scholes JD** (2006). Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell and Environment* **29**(6): 1061-1076.
- Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H** (2002). Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* **53**: 971-977.
- Talbot NJ, McCafferty HRK, Ma M, Moore K, Hamer JE** (1997). Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**(3): 179-195.
- Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Lauge R, Reisdorf-Cren M, Langin T, Masclaux-Daubresse C** (2007). The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of Experimental Botany* **58**(12): 3351-3360.
- Thaler JS, Owen B, Higgins VJ** (2004). The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology* **135**: 530-538.
- Thorne GN** (1981). Effects on dry weight and nitrogen content of grains of semi-dwarf and tall varieties of winter wheat caused by decreasing the number of grains per ear. *Annals of Applied Biology* **98**: 355-363.
- Touraine B, Daniel-Vedele F, Forde B** (2001). Nitrate uptake and its regulation. In: PJ Lea and J Morot-Gaudry, (eds) Plant Nitrogen. Springer-Verlag, Berlin, pp 1-36.
- van Baarlen P, Staats M, van Kan JAL** (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology* **5**(6): 559-574.
- van Den Berg F, Robert C, Shaw MW, van Den Bosch F** (2007). Apical leaf necrosis and leaf nitrogen dynamics in diseased leaves: a model study. *Plant Pathology* **56**(3): 424-436.

- van Den Berg F, van Den Bosch F, Powers SJ, Shaw MW** (2008). Apical leaf necrosis as a defence mechanism against pathogen attack: effects of high nutrient availability on onset and rate of necrosis. *Plant Pathology* **57**(6): 1009-1016.
- van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM** (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* **11**(4): 184-191.
- Verreet J, Hoffmann G** (1990). Effect of leaf and ear infection by *Septoria nodorum* at different growth stages of wheat on plant N content and amino acid composition. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **97**: 1-12.
- Walters DR, Ayres PG** (1980). Effects of powdery mildew on uptake and metabolism of nitrogen by roots of infected barley. *Physiological Plant Pathology* **17**: 369-379.
- Walters DR, Bingham IJ** (2007). Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Annals of Applied Biology* **151**(3): 307-324.
- Walters DR, McRoberts N** (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science* **11**(12): 581-586.
- Wang H, Li J, Bostock RM, Gilchrist DG** (1996). Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell* **8**(3): 375-391.
- Wasternack C** (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* **100**(4): 1-17.
- Weaver LM, Amasino RM** (2001). Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiology* **127**(3): 876-886.
- Wingler A, Mares M, Pourtau N** (2004). Spatial patterns and metabolic regulation of photosynthetic parameters during leaf senescence. *New Phytologist* **161**(3): 781-789.
- Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N** (2006). The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **57**(2): 391-399.
- Wingler A, Roitsch T** (2008). Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology* **10**(s1): 50-62.
- Wingler A, Schaewen Av, Leegood RC, Lea PJ, Quick WP** (1998). Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology* **116**(1): 329-335.
- Wright DP, Baldwin BC, Shephard MC, Scholes JD** (1995). Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **47**(4): 237-253.
- Yoshida S** (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **6**(1): 79-84.

Problématique

PROBLEMATIQUE

Ce travail de thèse vise à identifier les déterminants majeurs du remplissage en azote des grains de blé chez les plants de blé infectés par la septoriose, avec pour objectif à long terme de modéliser les flux d'azote entre les différents compartiments d'une plante malade.

Chez une plante saine, une forte relation de cause à effet relie la remobilisation à la sénescence foliaire car les protéines foliaires dégradées sont converties en acides aminés puis remobilisées vers le grain. Dans ce travail, notre hypothèse centrale est que les relations entre la sénescence foliaire et le métabolisme azoté sont les mêmes chez les plantes saines et les malades.

Au vu de la littérature précédemment citée, trois déficits majeurs de connaissance ont été identifiés, auxquels nous allons tenter de répondre:

1- Comment le remplissage en azote du grain est-il régulé quand les relations source/puits sont perturbées?

Chez une plante saine, en période post-floraison, l'azote du grain provient de deux sources essentielles: l'absorption N qui représente 10-30% et la remobilisation N qui présente 60-90% de l'azote grain. Toutefois, le déterminisme du remplissage du grain en N par les sources (absorption et remobilisation N) ou par les puits (grains et parties vertes) est encore mal connu. La littérature semble indiquer un déterminisme source, mais elle travaille en bilan sur tout le remplissage, ce qui ne permet pas de bien appréhender l'effet d'une perturbation dynamique comme les maladies. A partir de leur différence de sensibilité aux stress, nous poserons l'hypothèse d'une différence de déterminisme entre les deux sources d'azote: absorption post-floraison d'une part, et remobilisation de l'azote stocké dans les parties végétatives d'autre part. Afin de décortiquer le déterminisme de la remobilisation, on a appliqué des traitements à des peuplements n'ayant pas d'absorption d'azote post-floraison. Nous avons artificiellement mimé sur des plantes saines les effets extrêmes d'une maladie foliaire par une défoliation, qui supprime brutalement d'une source d'azote, ou un emballage, qui enclenche la sénescence brutale des feuilles concernées. Les flux d'azote dans les différents compartiments végétatifs et reproducteurs ainsi que les activités enzymatiques associées à la remobilisation de l'azote ont été mesurés et interprétés en termes de régulation de l'azote à l'échelle de l'organe et de la plante (Chapitre I)

2-Quel est le mode d'action de la septoriose sur la sénescence apicale des feuilles: accélération, anticipation ou conservation ?

La septoriose foliaire, maladie hémibiotrophe du blé, perturbe le flux de carbone et d'azote vers le grain en modifiant le ratio source/puits, notamment via la réduction de surface verte. Cette baisse de surface verte a plusieurs origines: une sénescence locale se développe autour des lésions sporulantes tandis que la sénescence apicale naturelle, qui progresse chez les plantes saines parallèlement à la remobilisation d'azote vers les grains pourrait être altérée par la maladie. Dans un objectif de modélisation de l'effet d'une épidémie sur la perte de surface verte, il est nécessaire de comprendre l'action de la septoriose sur chacun des deux types de sénescence. Actuellement, très peu d'études sont disponibles sur leurs cinétiques séparées. Les chapitres II et III ont pour objectif d'analyser la cinétique de réponse de la sénescence apicale à l'infection artificielle ou naturelle d'une feuille. Des variations de cinétiques de maladies et de sénescence apicale sont créées soit par des interactions compatibles variété × isolat connues pour leurs différences dans l'expression des symptômes (Chapitre II), soit par l'attaque artificielle ou naturelle de couverts de blé ayant des indices de nutrition azotée et des structures très différents (Chapitre III). Lorsque des inoculations ont été effectuées, on a

utilisé des doses moyennes d'inoculum, pour obtenir des cinétiques de maladie comparables à celles des épidémies naturelles. Les cinétiques de développement de la septoriose ont été mises en relation avec les dynamiques de sénescence apicale, suivies par photos numériques au cours du temps sur les mêmes feuilles. Cette étude permet donc de clarifier l'impact de la septoriose sur la sénescence naturelle, celle qui permet la remobilisation efficace de l'azote des feuilles pour le remplissage N des grains.

3- Comment est-régulé le remplissage du grain en N chez une plante affectée par la septoriose?

Dans une plante malade, les sources de remplissage N du grain (absorption de post-floraison et remobilisation N) sont réduites. Toutefois, la littérature disponible actuellement ne fournit d'informations qu'en termes de bilan et rarement en termes de cinétique. L'inconvénient de la méthode de bilan est qu'elle estompe les variations au cours du temps; d'où l'intérêt de quantifier l'effet de la septoriose sur ces deux processus en terme de cinétique d'azote total d'une part, et d'activités enzymatiques associées d'autre part pour une caractérisation plus fine du comportement des marqueurs métaboliques de l'absorption, assimilation et remobilisation. Par ailleurs, la réduction de la remobilisation d'azote résulte de sa rétention dans les organes sources, particulièrement dans les feuilles. Toutefois, dans les travaux précédents, celles-ci ont été traitées dans leur globalité, sans distinction entre étages foliaires. Or la sénescence foliaire naturelle et donc la remobilisation ne concerne pas toutes les feuilles de la même façon: les étages inférieurs meurent avant les supérieurs. C'est pourquoi une caractérisation plus fine de la remobilisation N par étage foliaire est nécessaire pour détecter et analyser les compensations éventuelles entre organes et donc pour caractériser la remobilisation foliaire à l'échelle de la plante. En outre, la rareté des études sur l'effet des maladies sur la remobilisation d'N à partir des tiges et balles nécessite aussi des études supplémentaires dans ce sens, aussi bien en termes de bilan que de cinétiques.

Enfin, cette partie permet de comparer les effets de la septoriose sur le flux d'azote vers le grain, avec ceux des traitements chirurgicaux extrêmes du chapitre I. On testera finalement si une plante atteinte par la septoriose est l'équivalent d'une plante saine avec moins de surface verte.

Chapitre 1

LA VITESSE DE REMOBILISATION AZOTEE EST REGULEE PAR LE HAUT LORSQUE LA DISPONIBILITE EN AZOTE VARIE PENDANT LE REMPLISSAGE

Article soumis à Annals of Botany

Contexte et objectifs

C'est un défi majeur pour l'agriculture moderne de limiter l'utilisation excessive de produits chimiques tout en améliorant la qualité des grains mais sans affecter le rendement. Une attention particulière doit pour cela être apportée à la régulation de la remobilisation azotée (N) depuis les organes végétatifs vers les grains après la floraison.

Méthodes

On a cultivé du blé sous fertilisation azotée faible, conduisant à une absorption N négligeable en post floraison. Dix jours après l'anthèse, les limbes des 2^{ème} et 3^{ème} feuilles supérieures ont été soit coupés au niveau de la ligule soit emballés dans du papier aluminium. L'évolution de la chlorophylle, la surface verte, la matière sèche et l'azote a été étudiée dans tous les organes jusqu'à la maturité. Différents métabolites (protéines, acides aminés, nitrates) et activités enzymatiques (glutamine synthétase, glutamate déshydrogénase, nitrate réductase, endoprotéase) liés à l'azote ont également été suivis dans les limbes.

Principaux résultats

L'azote manipulé des 2^{ème} et 3^{ème} limbes représentait de 15% du N final des grains pour les témoins. Le remplissage N ralentit immédiatement après la défoliation dans une proportion correspondant à la vitesse de remobilisation N des limbes coupés (fig. 1-3). Aucune modification du métabolisme N ou de la sénescence n'a été repérée dans les autres parties végétatives (tab.1-3). En revanche, tous les critères du métabolisme N ont montré une forte accélération de la sénescence des limbes emballés (tab 1.4). L'azote de ces organes a été complètement libéré dans les deux semaines, ce qui a nettement augmenté la disponibilité N pour le reste de la plante. Pourtant, aucune différence dans l'azote des grains n'a été observée entre les plantes à feuilles emballées et les témoins. Ce sont les tiges et les gaines qui ont temporairement stocké l'azote supplémentaire libéré par les limbes emballés. Le métabolisme N était à peine affecté dans les autres feuilles et dans la balle.

Conclusions

Les grains ne sont pas impliqués dans la régulation au jour le jour de leur vitesse de remplissage par l'azote remobilisé. Par contre, la vitesse de remplissage N est régulée de manière asymétrique par les tiges ou les gaines. L'abaissement de la disponibilité N entraîne un ralentissement immédiat du remplissage N des grains, tandis qu'une disponibilité N croissante N ne change pas la vitesse de remplissage, à cause du stockage temporaire.

**NITROGEN REMOBILISATION RATE IS UP REGULATED
WHILE VARYING NITROGEN AVAILABILITY
DURING GRAIN FILLING IN WHEAT**

Ben Slimane R¹, Bancal P^{1*}, Bancal M-O¹

¹ INRA, UMR 1091 INRA/INAPG Environnement et Grandes Cultures, F-78850 Thiverval Grignon, France

* Contact: bancal@grignon.inra.fr

ABSTRACT

Background and Aims

A major challenge of modern agriculture is to limit the excessive use of chemicals and at the same time to improve grain quality without affecting yield. Attention should thus be paid to regulation of N remobilization from vegetative organs to grains during the post-anthesis period.

Methods

Wheat crops were grown under low N fertilization, thus without N absorption post anthesis. Ten days after anthesis, 2nd and 3rd leaf blades under the flag leaf were either cut at the ligule or wrapped in aluminium foil. Evolution of chlorophyll, green area, dry matter and N was studied in all organs from anthesis to maturity. N related metabolites (proteins, amino acids, nitrate, ammonium) and enzymatic activities (glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase, nitrate reductase, endoprotease) were also assessed in blades.

Key Results

Nitrogen manipulated in 2nd and 3rd leaf blades was 15% of final grain N in controls. The rate for grain N filling immediately decreased following cutting treatment and to the same extent as N lost in cut blades, while no modification of senescence or N metabolism occurred in other vegetative parts. In contrast, all indices for N metabolism indicated that wrapped blades exhibited strongly accelerated senescence. N then was completely released from these organs within two weeks, thus markedly increasing N availability for the rest of the plant. However, no difference in grain N was observed between subjects of the leaf wrapping treatment and controls. N metabolism was hardly affected in other leaves or in the chaff, whereas stems and sheaths temporarily stored the extra-N released by wrapped blades.

Conclusions

Grains were not involved in current regulation of their filling rate by remobilized N. Instead, N released by leaf senescence seemed to be delivered to grains with up-regulation by stems or sheaths. Lowering the N availability immediately resulted in a lower grain filling rate, whereas increasing N availability did not change grain filling rate, due to temporary storage.

Key words: wheat, grain filling, nitrogen flux, remobilisation, leaf wrapping, defoliation

Introduction

Wheat (*Triticum aestivum*) is an annual crop, which means that grains are produced at the end of the life cycle. Nitrogen (N) remobilization is the process by which nutrients are translocated from vegetative organs to grains during the post-anthesis period. In intensive wheat crops, up to two third of grain nitrogen is provided by N remobilization during grain filling, while a lesser fraction comes from post-anthesis N absorption (Hirel et al., 2007; Kichey et al., 2007). By opposition, carbon and consequently dry mass (DM) is mostly acquired by photosynthesis during grain filling with DM remobilization only around 10% (Austin et al., 1980). The contradiction between sustained photosynthesis, which means N remains in leaves, and senescence linked to N remobilization suggests the latter is tightly regulated. Over the past decades, the increasing use of nitrogen fertilizer afforded high gains in grain yield without the need to account for regulation pathways. Now the rising cost of fertilizer, the effects of climate change and the decrease in pesticide use because of environmental protection imply that crops will face different stresses during their life cycle. Foliar diseases, by altering both N and DM processes lead to unpredictable grain protein concentration, while the latter is a major pricing factor on the market. A major challenge of modern agriculture is to limit the excessive use of chemicals and at the same time improve grain quality without affecting yield (Masclaux-Daubresse et al., 2008).

The literature identifies one main sink (grain filling) and two main N sources (N remobilization and post-anthesis N uptake) for N partitioning during grain filling in wheat. Numerous alterations of the source/sink ratio have been obtained by means of defoliation, shading or ear trimming. Following defoliation, N remobilization is reduced (Ma et al., 1996) or delayed (Guitman et al., 1991). Similar results are found in the case of shading, where N accumulates either in stems at maturity (Martinez-Carasco and Thorne, 1979) or in straws (Barneix et al., 1992). On the other hand, N remobilization is generally slightly reduced by ear trimming (Feller, 1979; Ma et al., 1996; MacKown, 1992; Perez et al., 1989), but when trimming is added to defoliation, remobilization is the same as with defoliation alone (Guitman et al., 1991). Clearly there is a substantial difference between the regulations of the two N sources. Plant's ability to absorb N in the soil rapidly declines after anthesis, thus limiting the extent of post-anthesis N uptake (Pan et al., 2006). Barneix (2007) even postulated that N remobilization and post-anthesis N uptake are antagonistic in that when one of them is up-regulated, the other one is down-regulated and vice-versa. From an ear trimming experiment, MacKown and van Sanford (1988), suggest that contrary to N absorption, which is probably regulated by sink strength, N remobilization is regulated by sources. Sinks are not easily defined, as according to Simpson et al. (1983) less than one half of N exported from leaves on the 15th day in grain filling is translocated directly to the grain. This observation suggests that vegetative parts, despite their negative N balance, might also act as additional sinks competing with grains. Furthermore, the grain number, which commonly characterizes sink strength, is very highly correlated to N amount at anthesis, determining source size (Demotes and Jeuffroy, 2001). Bancal (2009) broke down this correlation by ear trimming, which led to sink limitation in one out of two genotypes. Trimming ears thus strongly modifies the regulation of N fluxes, whereas in intact plants the correlation between grain number and N remobilisation permits to accurately model grain N filling without regard to grain N demand (Jamieson and Semenov, 2000; Martre et al., 2003). Hence, on the one hand N remobilization and post-anthesis N uptake are not equivalent sources, and, on the other the response curve relating sink and source activities is non linear (Jenner et al., 1991). The source/sink ratio could therefore be a misleading index which is difficult to relate to plant functioning. Moreover, N fluxes regulation is clearly not a simple trophic balance linked to the overall processes of senescence and eventually ending in plant

death even under an overwhelming supply of N. Ironically, reducing sinks (Feller, 1979; Mackown et al., 1992) or sources (Feller, 1979; Guitman et al., 1991) both might delay senescence. The various sinks and sources should thus be manipulated independently. Therefore the experiment in this paper was carried out in N deprived crops, thus minimizing post anthesis N uptake, and consequently its ability to vary due to treatments. N remobilization was manipulated in two contrasting ways by wrapping or cutting leaf blades 2 and 3 during grain filling. N metabolism was then observed in all organs till full grain maturity to clarify the relative roles of vegetative organs as source or temporary sinks for nitrogen derived from senescing tissues. Further information on the regulation of vegetative N fluxes during grain filling is expected. Leaf defoliation and wrapping moreover could give a new insight into epidemic effects on yield and yield quality.

Indeed, late foliar diseases primarily induce early green surface inactivation as does our cutting treatment, and perhaps also an accelerated senescence of surrounding tissues similar to that provoked by our wrapping treatment. The experiment thus mimicked certain fungus-induced disorders, although in an accelerated way and with no purely pathogenic effects such as plant defense reactions or assimilate diversion for fungal growth.

Materials and Methods

1. Field experiment

The experiment was conducted at the INRA station in Thiverval-Grignon, France (48°50' N; 1°57' E). Two plots of the winter wheat cultivar Caphorn (*Triticum aestivum* L.) were sown in a silt loam, a typical Eutrochrept soil (according to soil taxonomy), at a density of 250 seeds m⁻². Either no N fertilisation was added, or 15 g m⁻² of ammonium nitrate was provided at the beginning of stem elongation, thus leading to a nitrogen nutrition index (NNI; Justes *et al.*, 1994) of 0.5 and 0.8 respectively around heading.

Plants were sampled weekly from late heading on May 10th, 2007 corresponding to 79 degree days before anthesis (-79 °Cd), to full grain maturity (July 11th, 2007; 949 °Cd). At the two first sampling dates, in each plot, three 0.35 m² samples were harvested at ground level, each of them yielding about 100 plants. Main shoots were separated from tillers, which were discarded. The average fresh mass per main shoot was then determined for each sample, and 15 main shoots were selected in a ± 0.5 g window around this average fresh mass. At maturity, the same sampling procedure was used for control plants.

From the first two sampling dates, the ear length of the average main stem was determined. 300 shoots were then tagged in each plot in a ± 5 mm window around this target. The tagged plants stood isolated in the unchanged crop. On May, 23rd, 2007 (121 °Cd), one third of the tagged shoots were saved as controls while on the other shoots the 2nd and 3rd leaf blades, downward numbering, were either cut at the ligule or wrapped in aluminium foil. Six kinds of plants were thus studied using a fully cross-factor experimental setup designed to analyse both individual effects of fertilization or the leaf blade treatment and interactions.

2. Sample proceeding

At each sampling date, 30 labelled main shoots were harvested per treatment, from which 15 were saved on the basis of their mean fresh weight and divided into three replicates from which organs were dissected from the leaf blades, stems, with surrounding sheaths and ears. The leaf blades, when still green, were scanned and then recuperated. For one replicate, the leaf blades were then sliced into 1 cm² pieces, and about 300 mg was weighed then frozen in liquid nitrogen for assays of enzymes related to N metabolism. The remaining part of the sample was weighed then lyophilized. For the other replicates, the whole leaf blades were lyophilized. The ears were lyophilized whereas the stems were oven dried at 80 °C. All

organs were dry weighed. Grains were separated from chaff and the grain number was determined. All dry samples were then ground to a fine powder for subsequent analyses. Total and green areas of scanned leaf blades were measured per leaf layer by image analysis using the APS Assess program (University of Manitoba, Winnipeg, Canada). Radiation interception by the canopy was then calculated according to Bancal et al. (2007). The total N content of each organ was determined, using the Dumas combustion method. Nitrates and chlorophyll content were estimated from all organs, while soluble protein and amino acid were obtained from the lyophilized organs (leaf blades and chaff). Nitrates and soluble proteins were estimated in water extracts using respectively a modified Griess method (Miranda et al., 2001) and a commercial dye using Comassie blue (Bradford, 1976). Chlorophyll was estimated after extraction in water: acetone 4:1 according to Arnon (1949), and total amino acid using the picryl sulfonic acid method (Brown, 1968) on ethanol extracts. Afterwards, all presented results were normalized using the grain number per ear recorded for each treatment or sampling date. The mean grain number per ear over the whole experiment was 49 ± 3 in the 0.5 NNI plot and 54 ± 7 in the 0.8 NNI plot. Both treatment and fertilization effect and treatment \times fertilization interaction were tested by a two way analysis of variance for each organ and each sampling date using the *Statgraphics Plus* program ((Manugistics, Inc., Maryland, USA). Significant differences between linear regressions for the different treatments were tested when necessary. Significance of differences between parameter values in different treatments were tested with an overall error rate of $\alpha = 0.05$ using the Student-Neuman-Keuls test for pair comparisons when data fulfil the requirements of normality as evaluated by Skewness and Kurtosis tests. Alternatively, rank and sign tests were used.

3. Blade enzymatic activities

Nitrate reductase (NR), endoprotease, Glutamine synthetase (GS) and both NADH- and NAD-dependent Glutamate dehydrogenase (GDH) activities were measured in blade extracts using methods adapted from Masclaux et al. (2000). Frost blade samples were ground under liquid nitrogen with 80 mg poly vinyl pyrrolidone (PVP), then stored at -80°C until extraction. Samples were then thawed in 2.5 mL pH 7.6 buffer containing MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid) at 25 mM, β -mercaptoethanol at 3 mM and EDTA at 1 mM. After centrifugation for 10 min at 2000 g, 0.5 mL of supernatant was added to 0.25 mL of T1 buffer, 0.25 mL of T2 buffer, or 50 μL of T3 buffer on azocasein.

a) GS and GDH activities: They were obtained from thawed extract mixed with T1 buffer (MOPS 25 mM, β -mercaptoethanol 21 mM, MgCl_2 3 mM and EDTA 1 mM; pH 7.6). For GS assay, samples were mixed with a reaction buffer and incubated for 30 min at 30°C at pH 7.6 in MOPS 100 mM + Hydroxylamine 20 mM + MgCl_2 20 mM + ATP 20 mM + EDTA 4 mM + β -mercaptoethanol 3 mM. Blanks were obtained by incubating samples in extraction buffer. The reaction was then stopped and activity was calculated according to O'Neal and Joy (1973). From the same samples GDH activities were obtained by modification of the Chafei et al. (2006) procedure. NADH-dependent GDH was obtained by incubating samples for 30 min at 30°C at pH 7.5 in MOPS 100 mM + NH_4Cl_2 75 mM + oxoglutaric acid 10 mM + β -mercaptoethanol 3 mM + CaCl_2 1 mM + NADH 0,5 mM. NAD-dependent GDH was obtained by incubating samples for 30 min at 30°C at pH 8.0 in Triethanolamine 100 mM + glutamic acid 200 mM + β -mercaptoethanol 3 mM + CaCl_2 1 mM + NAD 1 mM. Absorbance at 340 nm was read against a blank lacking one substrate (either oxoglutaric acid or glutamine acid).

b) Nitrate reductase: measurement of NR activity in thawed extract mixed with T2 buffer (MOPS 100 mM + NaF 15 mM + EDTA 4 mM + FAD 30 μM + Na_2MoO_4 3 μM ; pH 7.6) was adapted from Ferrario-Mery et al. (1998). Samples were then mixed with a reaction buffer and incubated for 30 min at 30°C at pH 7.6 in MOPS 50 mM + KNO_3 9 mM + NaF 5

mM + EDTA 5 mM + β -mercaptoethanol 1 mM + NADH 0,375 mM + FAD 10 μ M + Na_2MoO_4 1 μ M. The reaction was stopped by adding acid sulphanilamide either alone (blank) or with NNEDD (N-(1-naphthyl) ethylendiamin) for assays. Coloring was allowed to develop for at least 1 h at room temperature, then the absorbance at 520 nm was read using Na NO_2 in the same buffer as the external standard.

c) Endoprotease: Endoproteolytic activity was measured from extract mixed with T3 buffer (MOPS 300 mM; pH 6.65). The substrate consisted of 10 mg of commercial azocasein (Megazyme T-PRAK, Ireland) swelled overnight at 5°C in 50 μ L T3 buffer. Preliminary assays indicated that when 500 μ L thawed extract was added, assays indicated that to T3, the obtained pH was 7.0, which is the target for measurement of proteolytic activity. Samples were incubated for 3 h at 30°C, before being centrifuged 10 min at 2000 g. Thereafter, 150 μ L of the supernatant were used to read the absorbance at 595 nm. According to the manufacturer's warning, the substrate response was highly dependent on the measured activity. Commercial trypsin (Sigma T4799) was then used to prepare the standard curve. In this paper 1 Arbitrary Unit (AU) is defined as giving the same response as 1 BAEE of trypsin.

Results

From -79 °Cd till 949 °Cd post-anthesis, two-way analysis of variance was calculated for each organ and each sampling date to discriminate the effect of leaf-treatments from that of fertilization and to highlight possible interaction between these factors. The two-way ANOVA indicated that the extent of N shortage did not qualitatively change the results. However, as 0.8 NNI crops could remobilize more N than 0.5 NNI crops, the trends in data were clearer in the first case. Plants were initially homogeneous within plots, therefore no significant differences between leaf treatments were observed before they were applied at 121 °Cd. From that point on, statistical analyses are generally not shown for the effect of fertilization as it is not the scope of this paper and was moreover quite obvious.

1. Green area evolution

a) Chlorophyll

Table 1-1: Multiple ANOVA for Chlorophyll AUPC after 121 °Cd

Factors	Blade 1	Blade 2†	Blade 3†	Blade 4	Blades 1+4	Chaff	Stem +sheaths	Above ground
NNI	***	***	***	**	***	***	***	***
0.5	70 a	117 a	57 a	11 a	81 a	39 a	118 a	298 a
0.8	191 b	255 b	129 b	31 b	222 b	71 b	285 b	706 b
Treatment	NS	nd	nd	*	NS	*	**	***
Control	132 a	186	93	16 a	148 a	51a	180 a	658 c
Wrapping	138 a	nd	nd	26 b	165 a	60 b	236 b	461 b
Cutting	122 a	nd	nd	21 ab	142 a	55 a	190 a	387 a
Interaction	NS	nd	nd	NS	NS	-	**	NS

Multiple factor ANOVA was carried out at each sampling date fully crossing crop NNI and blade treatment effects. First order interaction between factors was examined. A probability lower than 1% denotes a significant effect of a treatment or an interaction, with *: 0.1% < p < 1%; **: 0.01% < p < 0.1%; ***: p < 0.01%; NS denotes non significant effects (p > 0.05). nd refers to data not available (chlorophyll in wrapped or cut blades). † For blades 2 and 3 the reported mean values referred to controls only.

At anthesis, total chlorophyll was 1.6 ± 0.3 mg-culm⁻¹ in the NNI 0.5 plot vs. 3.6 ± 0.6 mg-culm⁻¹ in the NNI 0.8 plot, from which blades 2+3 amounted one half in both cases. Analysis of variance with treatment classification is shown only for chlorophyll AUPC after

treatments were applied (Table 1-1). Figure 1A shows the evolution of the chlorophyll in blades 2+3 in the case of the NNI 0.8 plot. At 138 °Cd, one day after treatment started, the wrapped blades did not differ from the control blades. One week later chlorophyll had declined by two thirds in the wrapped blades, to stabilize from 337 °Cd at a constant value of $0.20 \pm 0.02 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$. Such darkened chlorophyll was however inefficient, and the AUPC in blades 2+3 shown in table 1 can be considered as nil. It reached $384 \pm 18 \text{ mg}\cdot\text{°Cd}\cdot\text{culm}^{-1}$ in controls, where the chlorophyll of blades 2+3 declined at a constantly lower rate until it reached zero at 599 °Cd.

In the other leaf blades (flag leaf and lower leaves), chlorophyll declined linearly over time (Figure 1-1B), with no significant differences between treatments ($P > 0.05$): the AUPC of chlorophyll in these blades was $225 \pm 25 \text{ mg}\cdot\text{°Cd}\cdot\text{culm}^{-1}$. Chlorophyll in non-blade organs (chaff, stem and sheaths; Figure 1-1C) increased slightly up to 227 °Cd in controls and cutting treatment subjects and up to 337 °Cd after blade wrapping. It declined only thereafter. In the case of the NNI 0.8 plot, chlorophyll was thus very significantly higher ($P < 0.001$) after wrapping than in controls and cutting treatment subjects with AUPC reaching $424 \pm 35 \text{ mg}\cdot\text{°Cd}\cdot\text{culm}^{-1}$ vs. $323 \pm 29 \text{ mg}\cdot\text{°Cd}\cdot\text{culm}^{-1}$. The trend was the same in the NNI 0.5 plot, although the difference was not significant, as indicated by significant interaction ($P < 0.001$) in table 1. At the whole plant level, the chlorophyll AUPC was clearly reduced by the treatments ($P < 0.0001$), but significantly less by wrapping (76% of controls) than by cutting (63% of controls). Chlorophyll AUPC of non-blade organs was one third of whole plant in controls vs. two thirds after blade treatments.

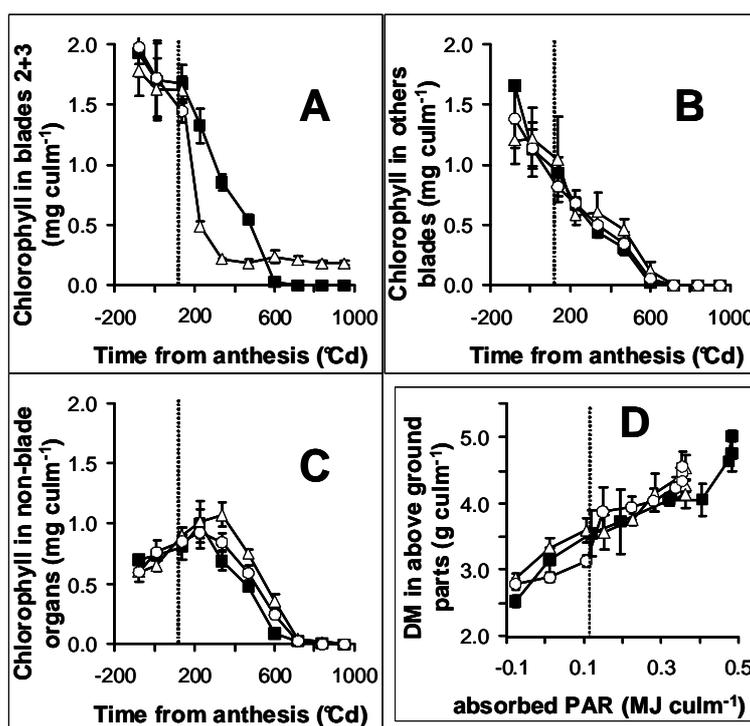


Figure 1-1: Green area evolution within the 0.8 NNI crop

Chlorophyll ($\text{mg}\cdot\text{culm}^{-1}$) in pooled leaf blades 2 + 3 (A), in other untreated leaf blades (B), and in non blade organs (C). DM evolution ($\text{g}\cdot\text{culm}^{-1}$) in above ground parts according to absorbed PAR (D) from anthesis to maturity either in controls (filled squares), in plants with wrapped leaf blades 2 and 3 (open triangles) or in plants with cut leaf blades 2 and 3 (open circles).

The points are means of triplicates and the bars indicate standard deviation. The time of treatment is reported by the dotted line.

b) Green area and absorbed PAR

The evolution of green area was assessed only for blades from -79 °Cd before anthesis till 720 °Cd post-anthesis, when the latest flag leaves turned yellow. Results essentially repeated that of chlorophyll. Green blade area (GBA) of the untreated flag leaves and lower leaves declined linearly over time (data not shown), and comparison of regression lines did not indicate any significant effect of treatments on the slopes from -79 to 720 °Cd ($P > 0.10$). The average rate of GBA loss was -6.3 ± 0.2 mm²·°Cd⁻¹·culm⁻¹ in the NNI 0.8 plot versus -4.7 ± 0.2 mm²·°Cd⁻¹·culm⁻¹ in the NNI 0.5 plot.

GBA evolution was then used to calculate the PAR absorbed by enlightened blades throughout grain filling. Figure 1-1D shows that DM in above ground parts could be fitted with $r^2 > 0.8$ to the absorbed PAR accumulated from anthesis until 720 °Cd, when GBA reached zero. Treated plants absorbed less PAR than controls but the average slope over this period (Radiation Use Efficiency; RUE) did not exhibit any significant effect of treatments ($P > 0.10$). The average RUE for all treatments was then 3.5 ± 0.2 g·MJ⁻¹ in the NNI 0.8 plot. At 720 °Cd however, the blades from control plants had absorbed 0.48 MJ·culm⁻¹ versus 0.36 MJ·culm⁻¹ for plants from both the cutting and wrapping treatments.

2. DM evolution

The DM in above ground parts (figure 1-2A) increased quite linearly in the controls until 720 °Cd. It increased at a slower rate after 138 °Cd in both the wrapping and cutting treatments subjects. Comparison for the slope of regression lines indicated that average net assimilation rates did not statistically differ ($P > 0.10$) from 1.8 ± 0.2 mg·°Cd⁻¹·culm⁻¹ in either the wrapping or cutting treatments. However, they were lower ($P < 0.01$) than for the controls (2.4 ± 0.3 mg·°Cd⁻¹·culm⁻¹). Note that for an easier comparison between treatments in figure 1-2A, DM in above ground parts was corrected after 121 °Cd for leaf cut plants, by adding the recorded DM that was removed through the cutting of blades 2+3. After 470 °Cd, DM was significantly higher in control plants than in those with either cut or wrapped blades ($P < 0.01$; table 1-2) by 0.4 ± 0.1 g·culm⁻¹. The DM plateau was attained at 720 °Cd in the controls compared to one week earlier for the two other treatments.

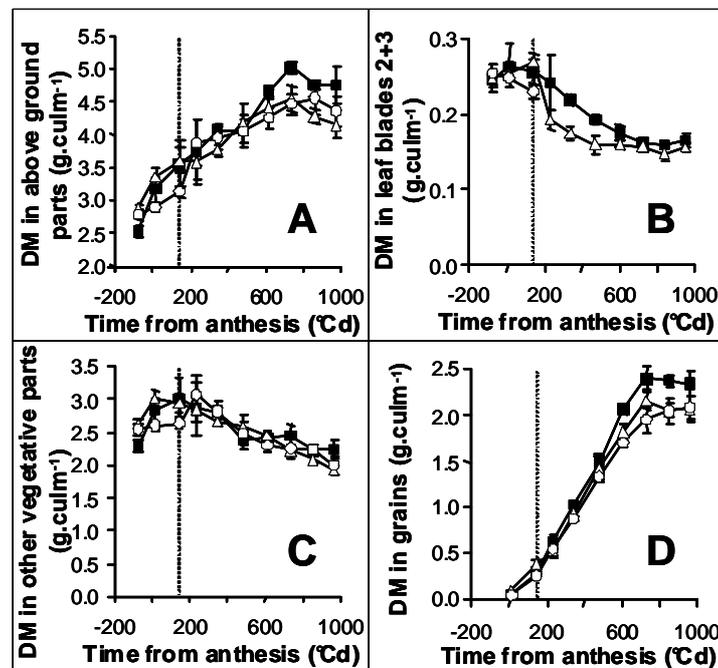


Figure 1-2: Dry mass evolutions (g.culm⁻¹) in the 0.8 NNI crop in above ground parts (A), in pooled leaf blades 2 and 3 (B), in other vegetative parts (C), and in grains (D) from anthesis to maturity.

Symbols are as in figure 1. The points are means of triplicates and the bars indicate standard deviation. The time of treatment is reported by the dashed line.

The DM of leaf blades 2+3 declined in all treatments after anthesis (figure 1-2B). In control plants, the DM loss from 138 °Cd to full maturity amounted to $0.08 \pm 0.03 \text{ g}\cdot\text{culm}^{-1}$, and therefore as much DM was directly lost by the cutting treatment. DM of the wrapped blades 2+3 decreased abruptly from 138 °Cd to 470 °Cd. At that time it had lost $0.11 \pm 0.02 \text{ g}\cdot\text{culm}^{-1}$, versus only $0.06 \pm 0.02 \text{ g}\cdot\text{culm}^{-1}$ in controls. The blade wrapping thus resulted in an early additional DM loss of $0.05 \text{ g}\cdot\text{culm}^{-1}$. DM then stabilized in the wrapped blades 2+3, while it still decreased until 720 °Cd in the control leaf blades 2+3. DM then remained stable in both treatments at $0.16 \pm 0.01 \text{ g}\cdot\text{culm}^{-1}$. Final DM was slightly heavier in controls than in wrapped blades, but the difference was not significant. Both direct DM loss by cutting or early DM release by wrapping amounted to less than 3% of final grain DM, and therefore their effect on grain filling was not detectable.

Table 1-2: Effect of blade treatments throughout grain filling as extracted from multiple ANOVA on DM in the various organs

Time (°Cd)	Above ground †	Blade 1	Blade 2 ††	Blade 3 ††	Blade 4	Chaff	Stem +sheaths	Grains
-79	-	NS	NS	NS	NS	NS	NS	nd
12	-	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
138	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
227	NS	-	*	-	NS	NS	NS	NS
337	-	NS	***	**	NS	NS	*	*
470	NS	NS	**	-	NS	NS	NS	-
599	*	NS	**	NS	NS	*	-	***
720	**	-	**	NS	NS	NS	-	***
840	*	NS	-	NS	-	NS	NS	***
949	*	NS	*	NS	-	NS	NS	**

ANOVA is shown only for the blade treatment effect; the two levels of N fertilization led to significant differences in DM mainly in leaf blades 1 and 2 at each sampling date, in chaff from 470 °Cd until 720 °Cd, and in grains after 337 °Cd. Taken as a whole, no interaction was observed between N fertilization levels and blade treatments on DM. † For an easier comparison between treatments, DM in above ground parts was corrected after 121°Cd for leaf cut plants, by adding the recorded DM removed in blades 2+3. †† Conversely ANOVA of blades 2 and 3 only compared controls and the blade wrapping treatment after 121°Cd

In the other vegetative parts (figure 1-2C), DM after either wrapping or cutting was not significantly different from that of controls on any sampling date ($P > 0.05$).

Grain DM increased quite linearly from 138°Cd to 599 °Cd (figure 1-2D), and stabilized after 720°Cd. No difference was identified between effects of either wrapping or cutting treatments. Statistical analysis of regression lines from 138 to 720 °Cd indicated that the grain filling rate was very significantly ($P < 0.001$) higher in controls ($3.8 \pm 0.1 \text{ mg}\cdot\text{°Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$) than following either the cutting or wrapping treatments ($3.2 \pm 0.1 \text{ mg}\cdot\text{°Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$). At 599 °Cd and later, grain DM from control plants was significantly higher ($P < 0.0001$), by $0.3 \pm 0.1 \text{ g}\cdot\text{culm}^{-1}$, than that of other treatments.

3. Evolution of total nitrogen amount

In the control plants from the NNI 0.8 plot, the final grain N was $41 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$, N uptake by above ground parts was $9 \pm 7 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ and N losses from vegetative parts amounted to $30 \pm 6 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$, while in the NNI 0.5 plot, the final grain N was $29 \pm 1 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$, N uptake was $8 \pm 3 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ and N losses from vegetative parts amounted to $20 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$. Hence, post anthesis N uptake was similar in the two plots whereas N remobilization was higher in the NNI 0.8 plot. The nitrogen amount increased linearly with time in above ground plant parts, but statistical comparison of the slopes from 138 °Cd to 720 °Cd did not indicate any significant effect of treatments. The average net N uptake was $10.2 \pm 1.2 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{°Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$ in the NNI 0.8 plot versus $8.3 \pm 0.9 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{°Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$ in the NNI 0.5 plot. Nitrogen amount

evolutions in the different plant organs are shown in figure 1-3 for the plot at NNI 0.8. For an easier comparison between treatments, N in above ground parts (fig. 1-3A) was corrected after 121°Cd for leaf cut plants by the recorded N that was removed through the cutting of blades 2+3. Such corrected plant N did not differ among treatments ($P > 0.05$; table 1-3) from -79 °Cd to 720 °Cd.

In control plants, leaf blades 2+3 lost about 88% of their N after anthesis (figure 1-3B) The N loss from 138 °Cd to full maturity was $6.3 \pm 0.6 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$, amounting 15% of the final grain N. The direct N loss by blade cutting was thus not negligible for grain filling. The N amount decreased abruptly in wrapped blades 2+3 from the start of the treatment until 470 °Cd. At that time, it had lost $5.5 \pm 0.4 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ versus only $4.2 \pm 0.6 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ in control blades. The N amount stabilized thereafter in wrapped blades 2+3 while it continued to decline at a slower rate until 599 °Cd in control blades 2+3. The N amount was very significantly lower ($P < 0.0001$) in the wrapped than in the control blades from 227 to 599 °Cd, with a maximum difference around $-3.0 \pm 0.1 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ at 337 °Cd, which could be regarded as an early release of N induced by the wrapping treatment. This difference was smaller although significant at $-2.1 \pm 0.1 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ in the NNI 0.5 plot. Later on, N stabilized in both treatments till full maturity. The final N amount was slightly higher in the wrapped than in the control blades 2+3, but the difference was significant only in the NNI 0.8 plot.

Table 1-3: Effect of blade treatments throughout grain filling as extracted from multiple ANOVA on N in the various organs

Time (°Cd)	Above ground †	Blade 1	Blade 2 ††	Blade 3 ††	Blade 4	Chaff	Stem +sheaths	Grains
-79	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	nd
12	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
138	NS	NS	NS	***	-	NS	NS	NS
227	NS	NS	***	***	**	NS	**	NS
337	NS	-	***	***	*	NS	**	*
470	NS	-	***	***	NS	*	-	*
599	-	***	***	**	NS	**	**	***
720	NS	**	**	**	-	NS	NS	***
840	NS	*	**	***	*	*	NS	**
949	NS	NS	***	***	*	-	NS	*

ANOVA is shown only for the effect of blade treatments. Significant differences in N amounts between the two fertilization levels were observed in all organs except lower leaf blades, which were already senescent when the experiment started. Taken as a whole, no interaction was observed between N fertilization levels and treatments on N. † For an easier comparison between treatments, N in above ground parts was corrected after 121°Cd for leaf cut plants, by adding the recorded N removed in blades 2+3. †† Conversely ANOVA of blade 2 and 3 compared only controls and the wrapping treatment after 121°Cd

In the other leaf blades (Figure 1-3C), N was remobilized slightly less rapidly following the wrapping and cutting treatments than in the controls, exhibiting a maximum difference of $1.1 \pm 0.6 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ at 337 °Cd. The leaf layer where this extra N was observed switched with time (data not shown): significantly ($P < 0.01$) more N than in the controls was found in lower leaf blades at 227 and 337 °Cd and in the flag leaf blade at 599 °Cd and later. In chaff (Figure 1-3 D), less N was recovered in the controls than in the cutting treatment before 599 °Cd and more thereafter. These differences were however of low significance ($P < 0.01$) and magnitude. Chaff N in the wrapping treatment was between the ones of the two other treatments and not statistically different from either of them. In stems and sheaths (Figure 1-3 E), the N amount was markedly higher after blade wrapping ($P < 0.001$) from 227 to 599 °Cd, exhibiting a maximum difference of $3.8 \pm 0.4 \text{ mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ at 337 °Cd. Then the N amount declined rapidly in the wrapped leaf treatment before stabilizing at the same amount as the other treatments at 840 °Cd. No difference was found between the controls and the blade

cutting treatment on any sampling date. While comparing N amount differences in stems and sheaths, the latter could be regarded as temporary sinks for extra-N released from wrapped blades 2+3. By opposition, stems and sheaths were not affected at all when remobilized N fluxes were decreased by cutting blades 2+3.

In grains (Figure 1-3 F), N accumulated quite linearly from 12 to 720 °Cd, stabilizing thereafter. No difference was observed in N amounts between the controls and the blade wrapping treatment on any sampling date, whereas after blade cutting the N amount was significantly lower in grains at 337 °Cd and later. The regression lines of grain N from 12 to 720 °Cd in the controls and the wrapping treatment were no different ($P > 0.10$), with an average grain N filling rate of $50.9 \pm 1.0 \mu\text{g}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$. In the blade cutting treatment, the slope indicated an average grain N filling rate of $41.2 \pm 1 \mu\text{g}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$, significantly lower than in the controls ($P < 0.0001$). Thus cutting blades 2 and 3 probably immediately reduced the grain N filling rate whereas wrapping blades 2+3 had no significant effect on the grain N at any time.

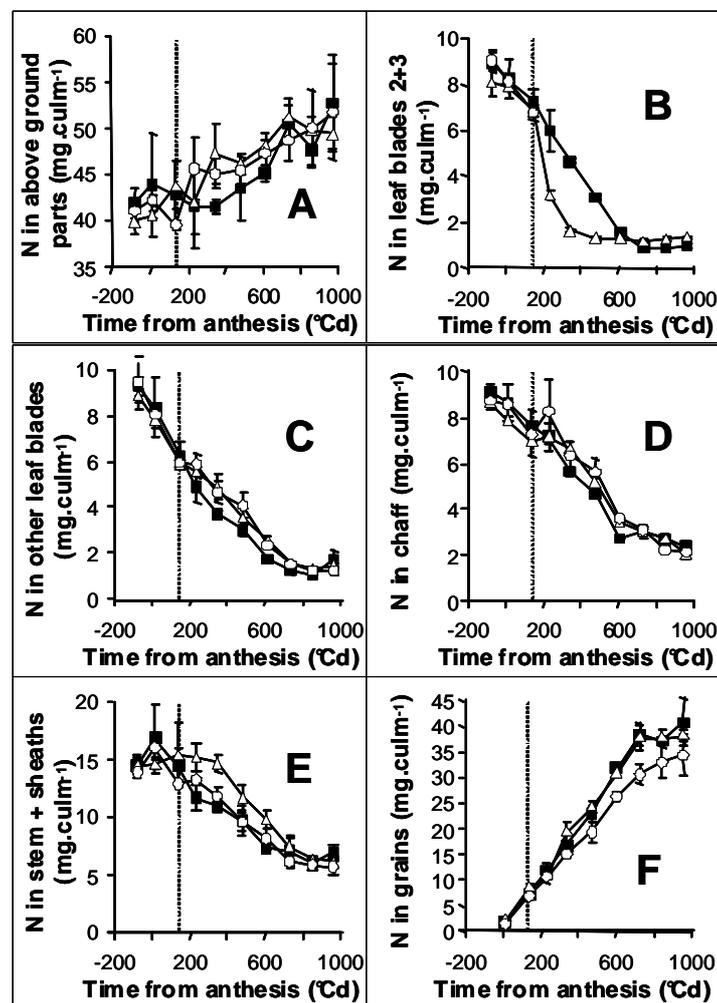


Figure 1-3: Nitrogen evolutions ($\text{mg}\cdot\text{culm}^{-1}$) in the 0.8 NNI crop in above ground parts (A), in pooled leaf blades 2 and 3 (B), in other leaf blades (C), in chaff (D), in stems and sheaths (E), and in grains (F) from anthesis to maturity.

Symbols are as in figure 1. The points are means of triplicates and the bars indicate standard deviation. The time of treatment is reported by the dashed line.

4. Evolution of nitrogen-related metabolite contents and enzyme activities

Data were recovered in blades only until 599 °C and as reported in table 1-4. Paired samples comparison suggested no difference occurred before treatments were applied. Both nitrate content and nitrate reductase activity were always very low except at -79 °Cd in the NNI 0.8 plot (3 $\mu\text{mol}\cdot\text{culm}^{-1}$ and 0.2 $\text{nkcat}\cdot\text{culm}^{-1}$, respectively). Later on, they were at zero, not modified by treatments. Soluble protein content and GS activity exhibited patterns like those of chlorophyll and total N. In blades 2+3 they were high at anthesis (9 $\text{mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ and 21 $\text{nkcat}\cdot\text{culm}^{-1}$, respectively) and progressively declining in the controls to nearly zero at 599°Cd. Wrapping led to a sudden fall in both protein content and GS activity to 1.5 $\text{mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ and 4 $\text{nkcat}\cdot\text{culm}^{-1}$, respectively, at 227 °Cd. Protein content then stayed constant at around 1 $\text{mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ while GS activity was at 1 $\text{nkcat}\cdot\text{culm}^{-1}$. Wrapping thus resulted in lower ($P < 0.01$) protein content and GS activity in blades 2+3, whereas no significant differences ($P > 0.05$) were observed in other blades. In the three blade treatments, protein content and GS activity declined at a constant rate from 8 $\text{mg}\cdot\text{culm}^{-1}$ and 18 $\text{nkcat}\cdot\text{culm}^{-1}$ to approximately zero at 599 °Cd. Both amino acid content and NADH-dependent GDH activity were quite constant in control blades 2+3 from anthesis until 599 °Cd, at around 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{culm}^{-1}$ and 1.2 $\text{nkcat}\cdot\text{culm}^{-1}$, respectively. In response to wrapping, they markedly increased at 227°Cd (15 $\mu\text{mol}\cdot\text{culm}^{-1}$ and 2.5 $\text{nkcat}\cdot\text{culm}^{-1}$, respectively, $P < 0.05$), falling thereafter below the control level (0.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{culm}^{-1}$ and 0.5 $\text{nkcat}\cdot\text{culm}^{-1}$, respectively; $P < 0.001$). By contrast, amino acid content and NADH-dependent GDH activity were not modified in other blades ($P > 0.05$). NAD-dependent GDH activity declined in wrapped blades ($P < 0.01$), but not as sharply as did GS activity and without transient increase as observed for NADH-dependent GDH activity. Lastly, endoproteolytic activity progressively increased in control blades from 1 to 4 $\text{AU}\cdot\text{culm}^{-1}$. It was slightly but significantly increased by 1 $\text{AU}\cdot\text{culm}^{-1}$ in wrapped blades 2+3 but not in other blades. Altogether, changes in nitrogen-related metabolite contents and enzyme activities were observed in wrapped blades 2+3 but not in other blades following either the wrapping or cutting treatments.

Table 1-4: Paired sample comparisons to control for the various nitrogen-related metabolite contents and enzyme activities

Blades	Period	Treatment	Nitrates	NR	Protein	GS	Amino acids	NADH-GDH	NAD-GDH	Proteolytic Activity
Blades 2+3	Before treatment	Wrapping	NS	NS	NS	NS	NS†	NS	NS	NS
Blades 2+3	Before treatment	Cutting	NS	NS	NS	NS	NS†	NS	NS	NS†
Blades 2+3	After treatment	Wrapping	NS	NS	↓**	↓*	↑***	↑**	↓*	↑*
Blades 2+3	After treatment	Cutting	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Other blades	Before treatment	Wrapping	NS†	NS†	NS	NS	NS†	NS	NS	NS
Other blades	Before treatment	Cutting	NS†	NS†	NS	NS	NS†	NS	NS	NS
Other blades	After treatment	Wrapping	NS	NS†	NS	NS	NS†	NS	NS	NS
Other blades	After treatment	Cutting	NS	NS†	NS	NS	-	NS	NS	NS

† means that sign and rank tests should be used instead of t-test because of data heteroscedasticity; arrows indicate the trend in treated plants, as compared to controls.

Discussion

1. Effect of blade wrapping

Blade wrapping was not a shading treatment. Because they were below the light compensation point, the fate of wrapped blades could rather be compared to that of excised darkened blades, a classical model for induced senescence. In such leaves, chlorophyll and proteins break down within a few days. Amino acids, then ammonia accumulate and diffuse somewhat in the medium (Peeters and van Laere, 1992). In wrapped blades 2 and 3, both soluble protein and chlorophyll fell within a week after treatment, while amino acid and endoproteolytic activity markedly increased at the same time. Moreover, wrapped blades differed from excised darkened blades in that they could efficiently export their released amino acid to unchanged sinks. As a consequence, amino acid declined soon after 227 °Cd, ammonia never accumulated, and total N amount declined rapidly in these leaves following treatment. Wrapped blades remobilized their nitrogen at a faster rate than control blades, but they were depleted earlier too. Actually, both protein and chlorophyll measurements suggested remobilization stopped in wrapped blades at a level slightly higher than in control blades, suggesting remobilization could not be completed in such a condition. Nevertheless, total N measurements indicated a balance of remobilized N between anthesis and maturity only marginally affected by blade wrapping. The expected result was therefore a temporary increase in available remobilized N at the whole plant level. Thus the paper dealt with N regulation at the level of the whole plant, as revealed by the induced changes in fluxes of remobilized N.

2. Effects of treatments on DM fluxes

Although the experiment was designed to vary N fluxes, it also modified DM, which in turn could impact N regulation. DM therefore received some attention. The DM directly remobilized from blades 2 and 3 throughout grain filling amounted to less than 3% of final grain DM, and therefore was not detectable at the level of the whole plant. Hence, differences between the two leaf treatments could be expected only if differences in photosynthesis then occurred. As treated plants were isolated in unchanged crop stands, it could be considered that cutting blades 2 and 3 did not result in more light reaching the lower leaves. Therefore any change in carbon balance could be attributed to plant status and functioning. Both cutting and wrapping treatments reduced carbon net assimilation by only one third, the same level as chlorophyll AUPC decrease, although GBA loss reached almost two thirds. This result confirmed previous works where net assimilation was reduced by 10% only by flag leaf cutting (Guitman et al., 1991). Some authors (Maydup et al., 2010) have suggested that the photosynthetic contribution of non-blade organs could be increased when blades are destroyed e.g. by diseases. However, the changes we observed in the senescence of both chaff and untreated leaf blades following blade wrapping or cutting were not significant, as judged by both GBA and chlorophyll evolution. Conversely, chlorophyll and soluble protein remobilization were delayed in the stems and sheaths following blade wrapping, in which case an increase in their photosynthetic capacity could be suspected. However, any significant variation in the contribution of non-blade organs to carbon balance should result in a variation of RUE, which was not observed. Variations in carbon balance of the whole plant were fully explained by the GBA loss using the non proportional relationships between leaf area and absorbed radiation (Monteith, 1965). On the other hand, the reduction of the net assimilation rate was not compensated by DM remobilization from vegetative organs. Consequently, the grain DM filling rate declined immediately after treatments were performed, and to the same extent as the net assimilation decrease. No compensatory change in grain filling duration was observed, as previously noted by Alvaro et al. (2008). Final grain DM was then significantly

lower than that of the controls, as commonly observed in both defoliation or shading experiments (Neals et al, 1963; Martinez-Carasco and Thorne, 1979; Guitman et al, 1991; Ma et al, 1996).

3. Effects of treatments on N fluxes:

According to our experiment, N uptake by above ground parts was neither accelerated nor slowed down by treatments (blade wrapping or cutting) whereas it has previously been shown that N absorption is reduced when the flag leaf is removed (Neals et al., 1963; Guitman et al., 1991). Paper discrepancy with previous studies could be assigned to the low N uptake in the controls, which amounted to less than 20% of final grain N, approximately the same level as N remobilization from the roots (Andersson et al., 2005). In plots with INN markedly lower than 1, soil N availability is low (Justes et al., 1994), thus leading to nitrate in the tissues very low and nitrate reductase activity no longer detected after anthesis. The part of true N absorption in N uptake by above ground parts was probably negligible. Therefore the pathway of N remobilized from organs was not hidden by any variation in N absorption in treated vs. control plants, which makes it possible to analyze the effects of treatments on N remobilization alone.

In defoliation experiments, N from excised leaves is lost, and obviously final grain N is always lowered. Nevertheless, the lowering of remobilized N flux does not result in an acceleration of N remobilization from other organs. Paradoxically, Guitman et al. (1991) even reported that both N and soluble proteins decreased later in remaining leaves following flag leaf excision. Ma et al. (1996) indicated that following a complete defoliation, the nitrogen concentration at grain maturity was higher in chaff and stems, also suggesting lower remobilization. It was sometimes hypothesized that plants would somehow protect their photosynthetic areas when their carbon balance was endangered. In spite of this, when blades 2 and 3 were cut in our experiment, neither remaining leaves nor stems or chaff exhibited either lower or delayed N remobilization. Not only their N evolution pattern, but also their final N concentration in tissues was the same as those observed in control plants. Only chlorophyll appeared to decline a little later in stems and sheaths following blade cutting. This discrepancy with the literature might come from the extent of post anthesis N uptake as N remobilization from vegetative tissues results from the balance between N input and output. ¹⁵N labeling studies indicate that N absorbed after anthesis is competitively incorporated into vegetative parts (Oscarson, 1996; Kichey *et al.*, 2007). Vegetative organs are not only sources, but also temporary sinks. As N uptake is usually higher at the start of grain filling, N balance in these organs frequently shifts from net accumulation by the first sampling times close to anthesis to net decrease later on. In defoliation studies where N uptake was important, N input to removed leaves could be re-allocated to the remaining organs, thus delaying the time for net N decrease in such receiving vegetative organs (Barneix and Guitman, 1993). In our study, the weakness of N uptake made it possible to show that vegetative organs did not react to defoliation by any change in N output. As a result, the rate of grain N filling immediately declined following the leaf cutting treatment. Moreover, it did so to the same extent as the N remobilization rate from control leaves 2 and 3, which clearly advocates against a sink regulation of grain N filling.

Wrapping blades 2 + 3 caused their N to be suddenly released to the plant, thus temporarily increasing the fluxes of remobilized N. However this increased N availability did not result in any change in grain N filling: released N was instead entrapped in stems or in sheaths. Interestingly, these organs then exhibited delayed chlorophyll degradation. Such linkage between chlorophyll and N has been reported about “stay green” cultivars whose longer leaf duration is associated with higher N uptake (Borrrell et al., 2001). In our case at any rate, N stored in stems and sheaths was further remobilized, so that the final grain N was the same as

in the controls. This result might suggest a sink regulation of the grain N filling rate in opposition to defoliation results. A hypothesis would be that lowering the source/sink ratio heightened source limitation, while an enhancing source/sink ratio leads to sink saturation (Bancal and Soltani, 2002). Such saturation has already been advocated in the case of ear trimming experiments (Jenner, 1991): the reduced ears are usually not able to incorporate as much N as controls (Martinez-Carasco and Thorne, 1979; Pérez et al., 1989; MacKown et al., 1992; Ma et al., 1996). In trimming experiments however, the N remobilization rate was lowered, leading to enhanced final N concentration in vegetative tissues, whereas in our case neither the N remobilization rate nor the final N concentration in stems and sheaths were modified. In the flag and lower leaf blades no enzyme activity was significantly modified, even for a while. In wrapped blades 2+3 the final N concentration was actually slightly higher than in the control blades, thus suggesting some N was lost, but it was found negligible at the level of the whole plant. Moreover, although grain protein concentration was significantly enhanced following the wrapping treatment (from 9.4 %DM to 10.1 %DM in the 0.8 NNI crop), it remained far below the physiological limitation of around 20 %DM eventually reached in ear trimming experiments. Lastly late fertilization as well as ear trimming experiments and *in vitro* ear culture (Jenner et al., 1991) reported that grains were able to incorporate N at a much higher rate than controls, which we did not observe. Clearly, data shown in this paper did not suggest that the conditions of sink saturation might occur, and results should be interpreted through the usual frame of source regulation. The results also clearly pointed out that “source” should be segmented for a better understanding of N flux regulation: stems and sheaths were downstream compared to wrapped blades. Following the wrapping treatment, stems and sheaths received enhanced N inputs, and, as observed following late fertilization, they were able to incorporate them (Oscarson, 1996), resulting in a delayed net remobilization pattern. However, late fertilizations also result in an enhanced rate of grain N filling, which we did not observe, even for a while. The two following hypotheses could be proposed to take this discrepancy into account. Firstly, nitrogen travels in the plant in different forms: remobilized N only in organic form travels through the phloem, whereas absorbed N after late fertilization is largely in mineral form and travels through the xylem. Hence, in the latter case some mineral N could bypass the stems and sheaths to be processed in chaff, and then directly delivered to the grains. An alternative hypothesis would argue that in our study the extra-flux of remobilized N amounted to $27 \mu\text{g } ^\circ\text{Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$ during the first week after blade wrapping. This flux was clearly higher than average N uptake ($13 \mu\text{g } ^\circ\text{Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$), and not negligible as compared to grain N filling ($50 \mu\text{g } ^\circ\text{Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$). However it was far below the levels N uptake reached under high fertilization (around $100 \mu\text{g } ^\circ\text{Cd}^{-1}\cdot\text{culm}^{-1}$). It is then possible that in our study the fluxes of remobilized N were small enough to be fully entrapped by stems and sheaths, which would otherwise overflow from these temporary sinks under high fertilization rates.

4. Conclusion

Under our experimental conditions characterized by no post anthesis N absorption, N released by leaf senescence seemed to be delivered to grains with up-regulation by stems or sheaths. Lowering the N availability immediately resulted in a lower grain filling rate, whereas increasing N availability did not change grain filling rate, due to temporary storage. Further works are needed to identify the precise sites of this regulation, and both and to what extent it is set up. If pushed to an extreme, the treatments applied to plants in this paper somewhat mimic what happens in the case of biotic attack. In some cases, leaves prematurely fall because of insect attack (*Cercospora* sp. Leafspot and defoliating arthropods / peanuts: Boote et al., 1980), which is well mimicked by the cutting treatment. In others, like most pathogen attacks, green leaf area is covered by symptoms, occulting light (Scholes and Rolfe, 1996)

and blocking nitrogen inside dead tissues (Bancal et al, 2008). Furthermore, necrotrophic or hemibiotroph pathogens have been shown to decrease both N remobilization (Garry et al, 1996) and uptake, although not to the same extent (Bancal et al, 2008). In these studies, the decreased N leaf availability due to disease was never compensated by a higher or faster depletion of N from healthy vegetative parts (Bancal et al, 2008). Although N uptake and remobilization are often affected by leaf diseases, other plant parts have never been shown to compensate the resulting lack in N to carry out fulfil grain filling at the same rate. This observation suggests that diseased plants may behave identically but to a lesser extent to plants either wrapped or cut in this paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mrs J Jean-Jacques for technical assistance in the trials work undertaken and in the preparation of this paper.

Références bibliographiques

- Alvaro F, Royo C, Moral LFGd, Villegas D** (2008). Grain filling and dry matter translocation responses to source–sink modifications in a historical series of durum wheat. *Crop Science* **48**(1523-1531).
- Andersson A, Johansson E, Oscarson P** (2005). Nitrogen redistribution from the roots in post-anthesis plants of spring wheat. *Plant Soil* **269**: 321-332.
- Arnon DI** (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology* **24**(1): 1-15.
- Austin RB, Morgan CL, Ford MA, Blackwell RD** (1980). Contributions to grain yield from pre-anthesis assimilation in tall and dwarf barley phenotypes in two contrasting Seasons. *Annals of Botany* **45**(3): 309-319.
- Bancal MO, Roche R, Bancal P** (2008). Late foliar diseases in wheat crops decrease nitrogen yield through N uptake rather than through variations in N remobilization. *Annals of Botany* **102**(4): 579-590.
- Bancal MO, Robert C, Ney B** (2007). Modelling wheat growth and yield losses from late epidemics of foliar diseases using loss of green leaf area per layer and pre-anthesis reserves. *Annals of Botany* **100**(4): 777-789.
- Bancal P** (2009). Decorrelating source and sink determinism of nitrogen remobilization during grain filling in wheat. *Annals of Botany* **103**: 1315-1324.
- Bancal P, Soltani F** (2002). Source-sink partitioning. Do we need Munch? *Journal of Experimental Botany* **53**(376): 1919-1928.
- Barneix AJ** (2007). Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. *Journal of plant physiology* **164**: 581-590.
- Barneix AJ, Arnozis PA, Guitman MR** (1992). The regulation of nitrogen accumulation in the grain of wheat plants (*Triticum aestivum*). *Physiologia plantarum* **86**: 609-615.
- Barneix AJ, Guitman MR** (1993). Leaf regulation of the nitrogen concentration in the grain of wheat plants. *Journal of experimental botany* **44**(267): 1607-1612.
- Boote KJ, Jones JW, Smerage GH, Barfield CS, Berger RD** (1980). Photosynthesis of peanut canopies as affected by leafspot and artificial defoliation. *Agron. J.* **72**: 247-252.
- Borrell A, Hammer G, van Oosterom E** (2001). Stay-green: A consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? *Annals of Applied Biology* **138**(1): 91-95.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- Brown H** (1968). A Study of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid for automated amino acid chromatography. *Clinical Chemistry* **14**: 967-978.
- Chaffei C, Suzuki A, Masclaux-Daubresse C, Ghorbel MH, Gouia H** (2006). Implication du glutamate, de l'isocitrate et de la malate déshydrogénases dans l'assimilation de l'azote chez la tomate stressée par le cadmium. *Comptes Rendus Biologies* **329**(10): 790-803.
- Demotes-Mainard S, Jeuffroy M** (2001). Incorporating radiation and nitrogen nutrition into a model of kernel number in wheat. *Crop science* **41**: 415-423.
- Feller U** (1979). Effect of changed source / sink relation on proteolytic enzyme activities and on nitrogen mobilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and cell physiology* **20**(8): 1577-1583.
- Ferrario-Mery S, Valadier M-H, Foyer CH** (1998). Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant physiology* **117**: 293-302.

- Garry G, Tivoli B, Jeuffroy MH, Citharel J** (1996). Effects of Ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on the translocation of carbohydrates and nitrogenous compounds from the leaf and hull to the seed of dried-pea. *Plant Pathology* **45**(4): 769-777.
- Guitman MR, Arnozis PA, Barneix AJ** (1991). Effect of source-sink relations and nitrogen nutrition on senescence and N remobilization in the flag leaf of wheat. *Physiologia Plantarum* **82**: 278-284.
- Hirel B, le Gouis J, Ney B, Gallais A** (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2369-2387.
- Jamieson P, Semenov M** (2000). Modelling nitrogen uptake and redistribution in wheat. *Field Crops Research* **68**: 21-29.
- Jenner CF, Uglade TD, Aspinall D** (1991). The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**: 211-226.
- Justes E, Mary B, Meynard J, Machet J, Thelier-Huche L** (1994). Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany* **74**: 397-407.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, le Gouis J** (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* **102**(1): 22-32.
- Ma Y-Z, MacKown CT, van Sanford DA** (1996). Differential effects of partial spikelet removal and defoliation on kernel growth and assimilate partitioning among wheat cultivars. *Field Crops Research* **47**: 201-209.
- MacKown CT, van Sanford DA** (1988). Nitrogen allocation with altered sink demand in wheat. *Crop Science* **28**: 133-136.
- MacKown CT, van Sanford DA, Zhang N** (1992). Wheat vegetative nitrogen compositional changes in response to reduced reproductive sink strength. *Plant Physiology* **99**: 1469-1474.
- Martinez-Carrasco R, Thorne GN** (1979). Physiological factors limiting grain size in wheat. *Journal of experimental botany* **30**(117): 669-679.
- Martre P, Porter JR, Jamieson PD, Triboi E** (2003). Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink / source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology* **133**: 1959-1967.
- Masclaux C, Valadier M-H, Brugière N, Morot-Gaudry J-F, Hirel B** (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* **211**(4): 510-518.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M** (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**(s1): 23-36.
- Maydup ML, Antonietta M, Guiamet JJ, Graciano C, López JR, Tambussi EA** (2010). The contribution of ear photosynthesis to grain filling in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* **119**(1): 48-58.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA** (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5**(1): 62-71.
- Monteith JL** (1965). Evaporation and environment. In: Symposium of the Society for Experimental Biology. pp 205-234
- Neales TF, Anderson MJ, Wardlaw IF** (1963). The role of the leaves in the accumulation of nitrogen by wheat during ear development. *Australian Journal of Agricultural Research* **14**: 725-736.
- O'Neal D, Joy KW** (1973). Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **159**(1): 113-122.
- Oscarson P** (1996). Transport of recently assimilated ¹⁵N nitrogen to individual spikelets in spring wheat grown in culture solution. *Annals of Botany* **78**: 479-488.

- Pan J, Zhu Y, Jiang D, Dai T, Li Y, Cao W** (2006). Modeling plant nitrogen uptake and grain nitrogen accumulation in wheat. *Field Crops Research* **97**: 322–336.
- Peeters KMU, van Laere AJ** (1992). Ammonium and amino acid metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiologia Plantarum* **84**(2): 243-249.
- Pérez P, Martínez-Carrasco R, Molino MMD, Rojo B, Ulloa M** (1989). Nitrogen uptake and accumulation in grains of three winter wheat varieties with altered source-sink ratios. *Journal of experimental botany* **40**(215): 707-710.
- Scholes JD, Rolfe SA** (1996). Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* **199**(4): 573-582.
- Simpson RJ, Lambers H, Dalling MJ** (1983). Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.)
IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. *Plant Physiology* **71**: 7-14.

Chapitre 2

Les lésions provoquées sur la feuille drapeau du blé par une inoculation locale de septoriose (*Mycosphaerella graminicola*) accélèrent-elles sa sénescence apicale?

Version préliminaire d'un article à soumettre à Plant Pathology

NB: quelques insertions en français ont été ajoutées pour faciliter la compréhension

Contexte et objectifs

La septoriose est la maladie la plus fréquente et nuisible du blé dans le nord de l'Europe. Les pertes de rendement ou de qualité des grains sont généralement liées à la perte de surface verte qu'elle induit. Ce travail vise à clarifier si la sénescence induite reste limitée autour de la zone d'infection où l'implication directe du champignon peut être soupçonnée. Alternativement, l'augmentation de la sénescence apicale des feuilles suggérerait que les régulations à l'échelle de la plante entière soient également perturbées.

Matériels et méthodes

L'expérience a porté sur quatre cultivars de blé d'hiver de sensibilités variées à la septoriose, et quatre isolats STB de virulences variées envers les cultivars choisis (tab.2-1). Des feuilles drapeau ont été inoculées avec les différents isolats sur 2 cm² à la dose de 10⁵ spores / mL. A partir de l'apparition des premiers symptômes (405 dj plus tard), on a mesuré par la prise de photos numériques (fig 2-1) l'évolution des surfaces sénescentes en distinguant les zones à l'apex de la feuille (*aa*) et autour de la zone d'inoculation (*sa*). Les mesures ont été répétées jusqu'à 1003 dj, lorsque les zones sénescents ont fusionné (fig 2-2). La sénescence diffuse causée par l'oïdium a été évaluée et s'est révélé être légèrement favorisée chez les plantes inoculées (fig 2-3), mais elle ne modifiait l'évolution ni de *sa* ni de *aa*

Principaux résultats

L'évolution de *sa* a suivi un modèle logistique, mais il n'a jamais atteint son plateau final avant de fusionner avec *aa*, bien qu'elle s'étende au-delà des 2 cm² inoculés. Les ajustements (fig 2-5) suggèrent une voie de résistance différente entre les Caphorn, dans lequel la maladie se développe plus lentement, et Koréli, dans lequel la maladie se développe rapidement, mais plus tard. La sénescence apicale suivait un modèle exponentiel chez les témoins comme chez les plantes inoculées. Le taux de croissance de *aa* dépendait du cultivar, mais aucun effet des isolats de septoriose n'a été détecté, malgré leur variabilité en terme de *sa* induite (fig 2-8). Des tests de comparaisons appariées entre brins témoins et appariés des mêmes plantes montrent que *aa* était plus faible chez les témoins dès le début de l'expérience, mais que son taux de croissance n'était pas augmenté par l'inoculation. Cela suggère plutôt que la sénescence apicale était différente entre les témoins et les plantes inoculées dès l'inoculation, probablement en raison d'un artefact expérimental.

Conclusion

D'après ce travail la sénescence apicale des feuilles inoculées n'a pas été accélérée par rapport au témoin malgré la large gamme de septoriose obtenue. La discussion porte sur la résistance des cultivars et la terminologie de la sénescence induite, dans l'objectif ultime de modéliser les flux azoté des grains par les plantes malades.

Does *Septoria tritici* blotch lesions induced by a localized *Mycosphaerella graminicola* inoculation accelerate apical senescence of winter wheat flag leaf?

¹BenSlimane Rym, ¹Bancal Pierre, ²Suffert Frederic, ¹Bancal Marie-Odile

¹INRA, UMR 1091 INRA/INAPG Environnement et Grandes Cultures, F-78850 Thiverval Grignon, France

² INRA, UMR1290 BIOGER, F-78850 Thiverval Grignon, France.

ABSTRACT

Septoria tritici blotch (STB) is the most frequent and damaging disease of wheat in north Europe. Yield or grain quality losses are usually related to green area losses disease induced. The present work aims at clarifying if this induced senescence is restricted around the infection zone where a direct involvement of the fungus could be suspected. Alternatively, increase in senescence at the leaf apex would suggest regulations at the whole plant level are also modified. The experiment involved four winter wheat cultivars varying in their susceptibility towards septoria, and four STB isolates differing by their virulence level towards the chosen cultivars. Flag leaves were inoculated with the different isolates on 2 cm² at a dose of 10⁵ spores /mL. Starting 405 °Cd later, at the appearance of the first symptoms, senescence evolutions at leaf apex (*aa*) and around inoculation zone (*sa*) were measured by repetitively taking numerical photos until 1003 °Cd, when senescent areas merged. Diffuse senescence caused by powdery mildew was assessed and shown to be slightly promoted in inoculated plants, but not modifying either *sa* or *aa* evolution. The *sa* evolution followed a logistic pattern, but it never reached its final plateau before to merge with *aa*, despite it could extend beyond the inoculated 2 cm². Fits suggested that the resistance pattern differed between cv. Caphorn, in which disease developed more slowly, and cv. Koréli, in which disease developed rapidly, but late. Apical senescence followed an exponential pattern in both control and inoculated shoots. The relative rate of *aa* was affected by cultivar, but no effect of STB isolates was detected despite large variations in *sa* extent. Paired comparisons between inoculated and control shoots showed that *aa* was lower in controls from the beginning of experiment. However comparison of kinetic parameters indicated the relative rate of *aa* was not increased by inoculation. It suggested instead that apical senescence was different between controls and inoculated shoots since the time of inoculation, possibly because of experimental artifact. It is concluded from this work, that over a wide range of STB disease, apical senescence was not accelerated in inoculated leaves as compared to control. These results are discussed with regard to cultivars resistance and terminology of induced senescence; with the ultimate objective of modeling N fluxes to grains in diseased plants.

Key words

Septoria tritici, *Mycosphaerella graminicola*, apical senescence, induced senescence, winter wheat, cultivars, isolates

Introduction

Septoria tritici blotch (STB), caused by the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*, is among the most frequent and damaging foliar diseases of wheat (*Triticum aestivum*) in northern Europe. The main damage of STB on plant functioning is the decrease of green leaf area (GLA; Robert et al., 2004). STB usually expands after the maximum level of GLA is reached, shortening the duration of green area life (LAD) more specifically during the grain filling period. Gaunt (1995) stated that LAD shortening by pathogen is tightly related to the lower photosynthesis balance after anthesis, and therefore to grain yield losses, which could reach 60% in susceptible cultivars (Cornish *et al.*, 1990). By contrast, the correlation between LAD and grain protein concentration (GPC) was shown to vary with environment, genotype and disease severity (Dimmock and Gooding, 2002). Then GPC of diseased crops, the main quality index in wheat trading, becomes unpredictable as it sometimes increases but more frequently decreases with STB attacks. In this context, Bancal *et al.* (2008) pointed out that the decrease in GLA affected differently the two nitrogen (N) sources for grain filling, *i.e.* post-anthesis N uptake and N remobilization, the relative contribution of which to N grain filling may largely vary with environment and genotype. Then GLA decrease should be separately related to N uptake, N remobilization and carbon assimilation in order to predict GPC robustly.

It may then be worth modeling dynamically GLA either in absence or in presence of STB. After anthesis, leaves do senesce in healthy plants; N is remobilized to fill grain, while GLA progressively declines. The mechanisms implied in the control of natural senescence remain poorly described and are still not well understood. Most reports however suggest control is located in vegetative parts which are the main N sources for grain filling through remobilization (Feller and Fischer, 1994; Gan and Amasino, 1997; Gregersen *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008).

When diseased plants were assessed in field experiments, STB symptoms *sensu stricto* (necrotic area covered by pycnidia) were often added to natural senescence, especially at the end of the epidemic stage on the three last leaves. Indeed, most of necrotic areas around infection sites could be directly or indirectly caused by the fungal infection. Tavernier *et al.* (2007) observed an important decrease of chlorophyll and protein content corresponding to the appearance of anthracnose symptoms in pea leaves when the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* shifted from biotrophic to necrotrophic stage. Furthermore Talbot *et al.* (1997) found that rice leaves showed a pronounced senescence 48 h after applying culture filtrate extracts of *Magnaporthe grisea*. This suggested that pathogens might induce senescence following disease kinetics, not resulting from a direct interaction with plant tissues, but from the release close to infection sites of toxic products. Such induced senescence around the necrotic zone was reported in STB (Gooding *et al.*, 2005; Ruske *et al.*, 2003; Gaunt *et al.*, 1986; Leitch and Jenkins, 1995), although to our knowledge, toxins involvement in STB-plant interaction has not yet been firmly established. Beyond, if natural senescence is more or less controlled at the diseased leaves scale just like in healthy leaves, the control of senescence could be affected itself by external factors such as pathogen attack (Quirino *et al.*, 2000).

In cereals, first events of natural senescence progresses from the leaf apex to the ligulae and may be assessed independently from STB lesions. One hypothesis that could support an increase in apical senescence of diseased leaves is that the pathogen diverts nutrients from leaves for its own growth. Fungus thus acts as additional N sink and plant might maintain the rate of grain N filling by accelerating N leaf depletion (Pageau *et al.*, 2006). If among plant pathogens, biotrophic fungi are the most cited organisms defined as new sinks (Ayres *et al.*,

1996), hemibiotrophic fungi with a long biotrophic latent period like STB may also behave as new sinks interacting with plant functioning.

Components of senescence should be separated, at the leaf level, into apical senescence and local senescences, because they result from different physiological processes in reaction to pathogen infection. Most papers however are based on an overall assessment of senescence that mixes up natural and induced senescence; the later being assessed by difference to a healthy control. Moreover inoculation in literature frequently leads to explosive diseases with much higher rates than that encountered on the fields. Inoculum concentration used in artificial contamination are usually very high (10^7 or 10^8 spores/mL) and are applied on whole leaves, which is hardly comparable with natural contamination events. In such conditions, separation between local and apical senescence can be only obtained at the very beginning of natural senescence (Robert, 2003). The aim of this article is to investigate the effect of STB on the dynamics of apical senescence, based on more realistic experimental conditions, especially inoculation on restricted leaf area, to further model epidemic effects on GLA loss. If STB affects apical senescence, then all N remobilization fluxes in plant should be modified in forthcoming model. Otherwise damages are restricted to the local area mixing necrotic zone and induced senescence around, all of them under fungus regulation. Restricted flag leaf area of different winter wheat cultivars were inoculated using different *M. graminicola* isolates close to natural conditions and non destructive assessments were repeated to characterize senescence kinetics of both inoculated zone and leaf apex on the same leaves. With this study, we test whether apical senescence is affected or not in diseased leaves as compared to healthy ones in a range of compatible interactions between plant and pathogen.

Materials and methods

1. Greenhouse experimental design

The greenhouse experiment involved four winter wheat cultivars varying in their susceptibility towards STB: Soissons and Apache are recorded as moderately susceptible (resistance rating 5), while Caphorn and Koréli are classified as moderately resistant and resistant to STB (resistance rating 6 and 7, respectively).

Four isolates of *M. graminicola* were used. Two of them were collected from wheat fields (cv. Soissons) of the INRA experimental station of Grignon (France, 48°50' N, 1°57' E); a third was collected in INRA experimental station of Le Rheu (France, 48°01' N, 1°43' W; M. Trottet, personal communication); the last one was the reference isolate IPO323 (Kema and van Silfhout, 1997). These isolates, later on designated in paper by i1, i2, i3, i4 respectively, were classified based on their respective aggressiveness on each of the four cultivars (Table 1; F. Suffert, personal communication).

Air temperature was registered automatically every 15 min in greenhouse. The thermal time, expressed in degree-days (°Cd), was calculated by summing the daily mean air temperature adjusted for the base temperature 0°C.

Table 2-1: classification of isolates virulence on the cultivars

	Apache	Caphorn	Koréli	Soissons
i1	+++	++	+	+++
i2	+++	++	+	+++
i3	++	-	-	+++
i4	+	-	-	+

-: no symptoms; +, ++, +++: ascendant degree of symptoms

Each experimental criterium (interaction cultivar × isolate), consisting of the inoculation of the flag leaf of adult wheat plant with a single STB isolates, was replicated four times. This gave a set of 64 inoculated plants. The same number of control shoots was chosen.

2. Plants preparation

Seeds of the cultivars Soissons, Apache and Caphorn were sown in Jiffy peat pots at a rate of two seeds per pot, on December, 5th 2008, while seeds of Koréli were sown one week later. Seedlings were kept for eight weeks at 8°C with a 10 h light period and a 14 h dark period for vernalization. They were then transferred to square pots (1.1 L) filled with commercial compost (Klasmann substrat 4; Klasmann France SARL), fertilized with 4 g Osmocote Exact (16N 11P 11K 3MgO Te), and placed in the greenhouse. The plants were twice fertilized with a commercial nutritive solution (1 l Hydrokani C2) diluted 1/100 in a 100 l water reservoir and applied in the pot saucers five and seven weeks after the seedling transfer in greenhouse. Daylight was complemented by 400-W sodium lamps to obtain 9 h of dark period and 15 h of light period. Temperature was regulated by a cooling system at 12 °C /20 °C during the night/day. Secondary tillers were cut, and only three shoots were kept per plant, from which one would have been inoculated while the two other used as control.

Treatments against aphids (λ -Cyhalothrin, 1 mg /L; Pyrimicarb 20 mg /L) were applied steadily. Treatment against powdery mildew (Ethyrimol, 2 mL /L; Quinoxifen, 1 g /L) was applied just after vernalization and was repeated twice a month until three weeks before inoculation. After inoculation fungicides were no longer used, and some mildew attacks occurred. Epidemics were slowed down gently swapping leaf blades with a wet clean paper.

3. Inoculum preparation and inoculation

Inoculation was performed at heading stage for Caphorn, and at anthesis for cultivars Apache, Koréli and Soissons. The inocula were obtained from a stock conidial suspension of the four *M. graminicola* isolates. Subcultures were grown onto Petri dishes containing PDA (potato dextrose agar 39 g l⁻¹) at 20°C in total darkness during one week. Spores were collected on the day of inoculation in sterile distilled water. The spore suspension was adjusted with a haemocytometer (Malassez cell) to a concentration of 10⁵ spores /mL. Two drops of surfactant Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween 20, Sigma) were added per 100 mL of inoculum. Tagged flag leaf blades were inoculated with a paint brush on April, 14th 2009. Inoculation was done over 2 cm of leaf length (3-4 cm²) within the basal half of leaf blades. The restricted inoculated area was marked with a small white sticker. Inoculated leaves were then bagged during 72 hours in a humid polyethylene transparent bag by maintaining the inoculated face inside. Additional lamps were removed during the three days of bagging to avoid high temperature and to increase air humidity in the bags.

4. Diseased and senescent areas assessment

At the appearance of the first symptoms, evolution of apical senescence and STB lesions inoculated leaves and controls were photographed and measured by numerical image analysis at a resolution at 1000 pixels /inch. The device consisted of a numerical camera fitted in a closed body, the inside of which was equipped with light emitting diodes (LED), providing a polychromatic white light (Figure 2-1). The benefit of such a device is to keep photos free of the external monochromatic light provided by the sodium lamps of the greenhouse. Photos were taken on a blue surface to easily separate leaves by image analysis. The length of pictures was about 10 cm, and therefore several pictures should be linked up to obtain a single leaf assessment. The whole surface was photographed for controls only during the first assessment, while later on only the front of senescence and mildew lesions, when occurring,

were pictured. Assessments were carried out until all plants were completely senescent. Control were assessed seven times, while inoculated plants were assessed ten times for the three STB isolates i1, i2, i3, whereas plants inoculated with i4 were harvested after four or five assessments only for other analyses not described in this paper. In most cases, inoculated and control plants were assessed on the same day. The dates of assessments were expressed in sums of degree days after inoculation ($^{\circ}\text{Cd}$).

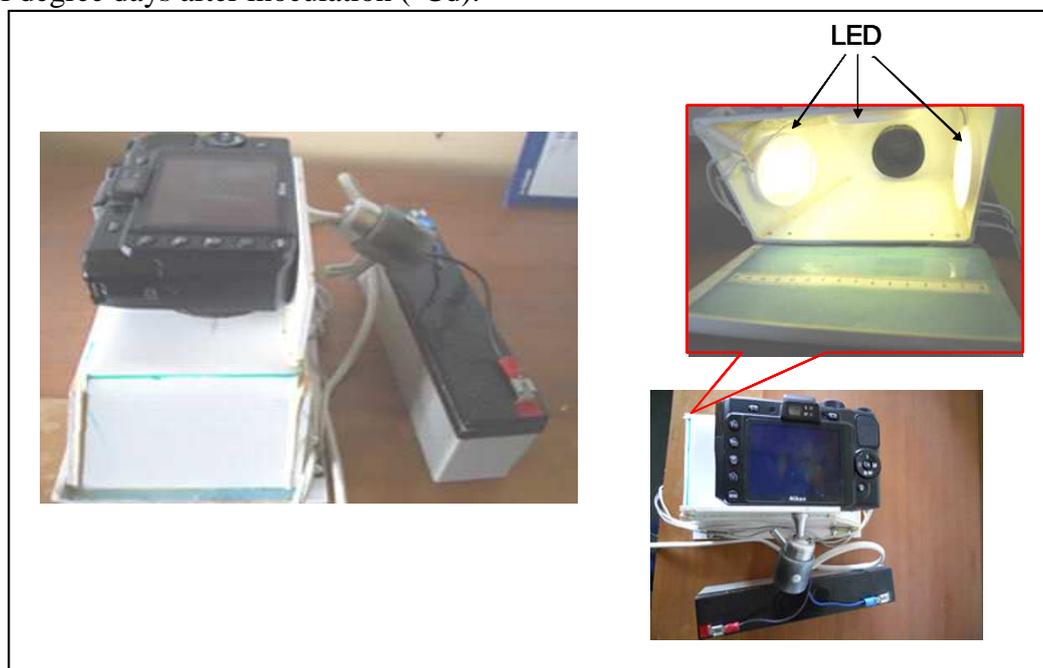


Figure 2-1: *Dispositif de prises de vues numériques*

5. Image analysis

In order to eliminate color dominance, the white color was adjusted prior to any image analysis, using a control area within each picture. The resolution was then decreased to 700 pixels /inch precise enough to allow the analysis with Assess software (Lamari L., American Phytopathological Society, 2002). Image analysis was performed according to each picture, and then results were added up for each leaf. Results were obtained in pixels and then ratios to whole blade area of green and senescent surfaces were calculated. Three kinds of symptoms were measured: senescent area at leaf apex (*aa*), STB lesions around the inoculation zone, with or without pycnidia (*sa*), and diffuse lesions (*da*) within the remaining green area. At later stages senescent areas merged, and then the number of fair assessments for *aa* and *sa* was restricted to an average of six for the STB isolates i1, i2, i3, vs. four assessments for i4. By opposition, diffuse *da* symptoms were progressively recovered by the two other senescences. Therefore at each new assessment some *da* symptoms merged with either *sa* or *aa*. They were considered remaining equal to that of the previous assessment, while the other leaf parts continued to evolve.

6. Statistical analyses and data transformation

The variances were compared between both cultivars and isolates using Cochran's and Bartlett's test, leading in some cases to log-transform the raw data. Afterwards, the normality of data sets was checked using skewness and Kurtosis tests. When data sets were not normal, the equality of medians was compared using Kruskal-Wallis test to investigate the effects of cultivars and isolates. Normal data sets were compared by analysis of variance (ANOVA) and of covariance. At least part of *da* symptoms occurred from powdery mildew which could

interfere with both monocarpic and STB-induced senescences (assessed by *aa* and *sa* kinetics, respectively). Interactions with *da* were then investigated, characterizing the logarithm of its AUDPC as a covariate. Lastly, interaction between *aa* and *sa* kinetics was investigated by analysis of covariance using the logarithm of *sa* AUDPC as a covariate.

The *sa* kinetics versus time expressed after inoculation was adjusted for every plant to a logistic function of time with r^2 at 0.98 in average: $sa = M / [1 + e^{-r \cdot (T-t)}]$, where M is the asymptotic plateau reached by *sa*, r the initial relative growth rate, and T the time at the inflexion point, when *sa* reached $M/2$. Statistical analyses were performed on these three parameters as well as on raw *sa* data.

The *aa* kinetic was adjusted for every plant to an exponential function of time: data were log-transformed so that the parameters could be estimated from linear regression with r^2 at 0.97 in average. The slope represents the relative rate of apical senescence while the intercept is the logarithm of apical senescence at the inoculation date. Statistical analyses were performed on these two parameters as well as on raw *aa* data.

Results

First STB symptoms were recorded 24 days after inoculation (405 °Cd). Senescent areas were assessed until 74 days after inoculation (1323 °Cd). Some leaves still showed distinguishable senescent areas until 1244 °Cd, but senescent areas merged much before in most of cases, thus impairing any visual discrimination between *da*, *sa* and *aa* symptoms (Figure 2-2). Therefore averaged results per treatments are presented in the current paper at 1003 °Cd, using raw data still available for 36 plants. Extrapolations were obtained, as later described, from fitting of symptoms in the 28 other cases. Such a choice could however bias the results, as the 16 plants inoculated with the less aggressive isolate *i4* were sampled earlier, at 768 °Cd or 932 °Cd, before any STB symptoms appeared on the two resistant cultivars Caphorn and Koréli. Those plants were considered as fully STB resistant although it can not be excluded that *sa* would have extend later.

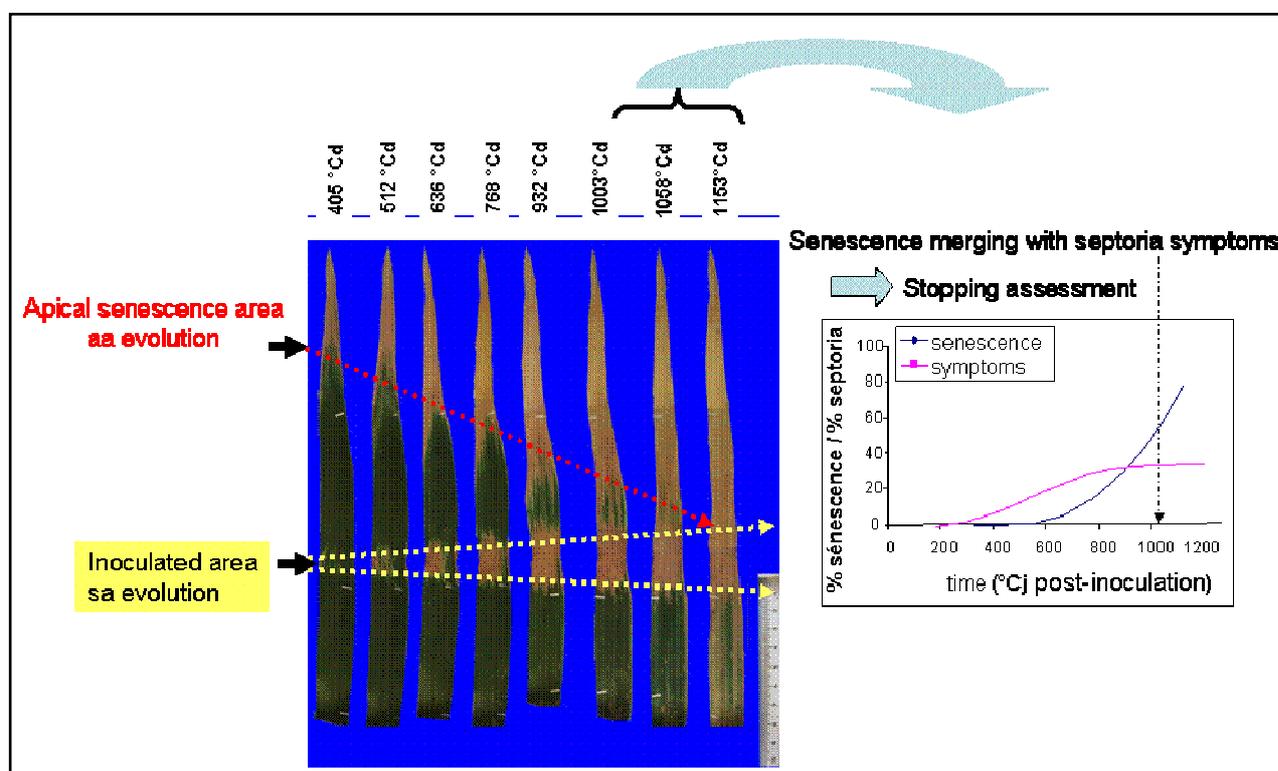


Figure 2-2: Evolutions de la sénescence à l'apex (*aa*) et autour de la zone inoculée (*sa*) d'une feuille

1. Diffuse senescence

The *da* symptoms grew by exponential waves that stopped when swapping treatments occurred. They reached a maximum of 11 cm², about 18% of total leaf blade, but they were generally much lower, in average 1.8 and 2.3 cm² in control and inoculated plant (5% and 6% of total area, respectively) with very large variation between and within treatments (Figure 2-3).

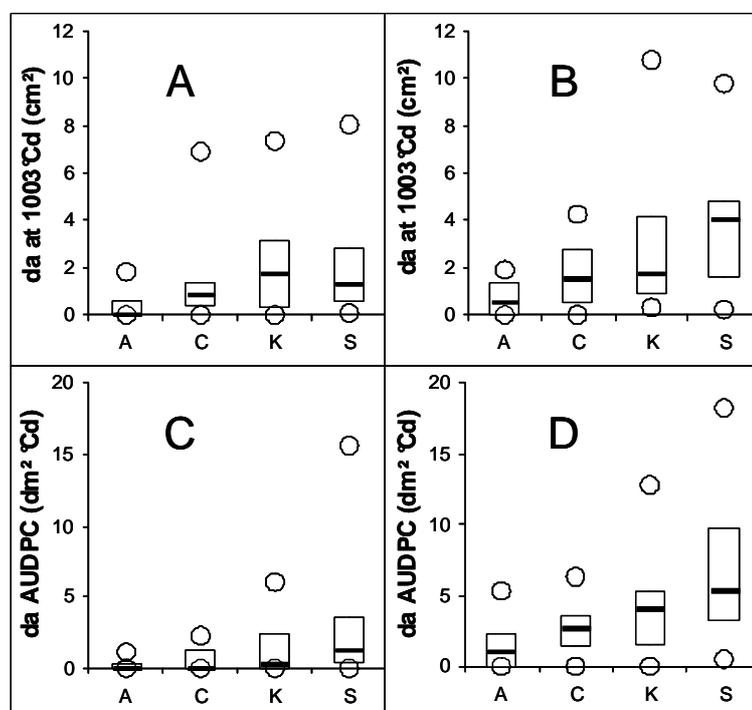


Figure 2-3: Box plots for area of diffuse senescence (*da*) in cm² and corresponding AUDPC (dm² °Cd) by control (A,C) and inoculated plants (B,D) at 1003 °Cd, for each cultivar (A:Apache, C:Caphorn, K:Koréli, S: Soissons). The various isolates are pooled up.

Box plots draw the range between first and third quartile. Medians are reported as thick lines and minimum and maximum recorded values as open circles.

Box plots draw the range between first and third quartile. Medians are reported as thick line and extreme recorded values as open circles.

After log-transformation, two-way ANOVA on both *da* level and AUDPC at 1003 °Cd suggested that Apache was less affected and Soissons more affected ($p < 10^{-4}$) than Caphorn and Koréli. The difference between isolates was not significant ($p > 5\%$). The area of diffuse senescence *da* were significantly lower in control plants ($p < 10^{-4}$). The effect of inoculation was confirmed by paired sample comparison between inoculated and control shoot within each single plant ($p < 10^{-4}$). Diffuse senescence was significantly higher in the inoculated plants, but it was also observed in control. Moreover *da* never bore any pycnidia, therefore it cannot be considered only as a STB sub-symptom despite it was higher on inoculated plants.

2. Senescence around inoculated area

Except Caphorn and Koréli plants inoculated by i4 isolate, almost all inoculated plants eventually exhibited STB symptoms around their inoculation zone. At 405 °Cd, the first assessed date, one half of the plants were already diseased, yet with large variations between and within treatments ($p < 10^{-4}$). At this stage, resistant Caphorn and Koréli (in average 0.03 cm² *i.e.* 0.1% of total leaf area) on the one hand already differentiated from susceptible Apache and Soissons (0.30 cm² *i.e.* 0.8% of total leaf area) on the other hand, while the less virulent i4 isolate led to smaller *sa* (0.01 cm²) than undifferentiated i1, i2 and i3 (0.21 cm²).

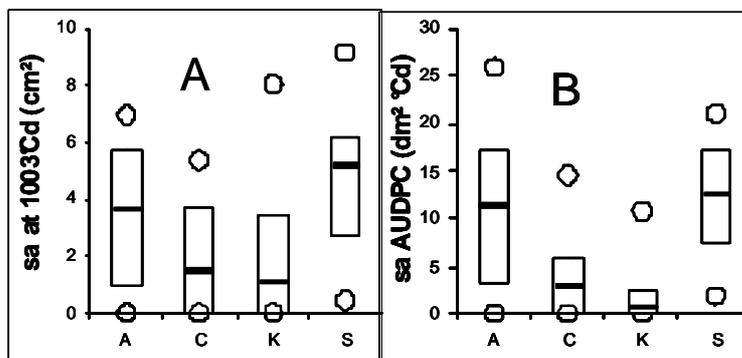


Figure 2-4: Box plots for senescence area around inoculation zone (*sa*) in cm^2 (A) and corresponding AUDPC ($\text{dm}^2 \text{ }^\circ\text{Cd}$) (B), at 1003°Cd , for each cultivar (A: Apache, C: Caphorn, K: Koréli, S: Soissons). The various isolates are pooled up.

Box plots draw the range between first and third quartile. Medians are reported as thick lines and extreme recorded values as open circles

At $1003 \text{ }^\circ\text{Cd}$, including plants where STB did not develop, *sa* reached an average of 3.1 cm^2 (7.5% of total leaf blade), and when *sa* and *aa* merged, a maximum *sa* level at 24% was recorded. Data for *sa* were homoscedastic, permitting the use of Kruskal-Wallis test without log-transformation. Statistical analyzes on both *sa* level (Figure 2-4A) and AUDPC (Figure 2-4B) at $1003 \text{ }^\circ\text{Cd}$ essentially confirmed what was observed at $405 \text{ }^\circ\text{Cd}$. Caphorn and Koréli were more resistant than Apache and Soissons ($p < 10^{-4}$), while the effect of STB isolate ($p < 10^{-4}$) could be explained by the lower virulence of *i4*. The senescent symptoms *da* and *sa* were then of the same magnitude, but they were not correlated ($r^2 = 0.00$; $p > 5\%$). The AUDPC of diffuse area was not accepted as a covariate ($p > 5\%$), suggesting *sa* was not affected by *da*.

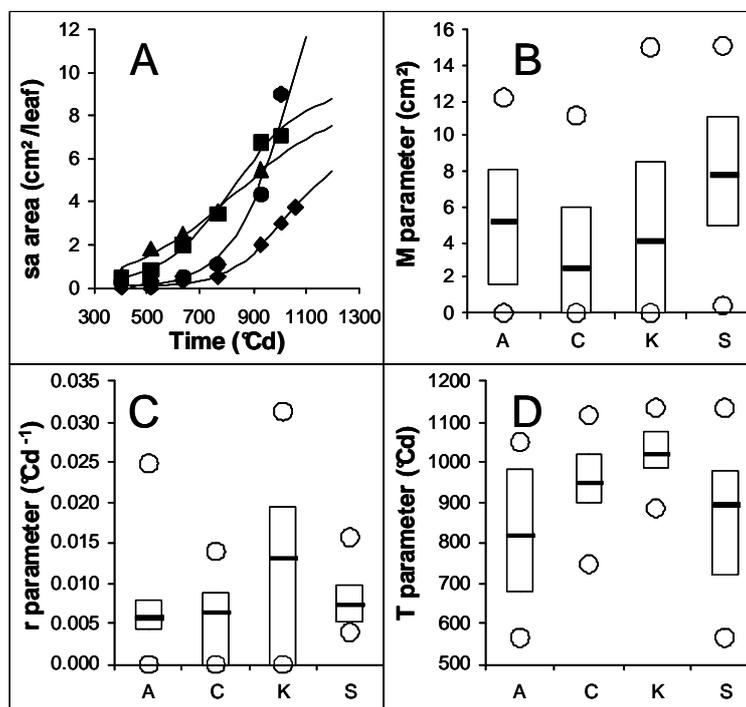


Figure 2-5: Data for senescence area around inoculation zone (*sa*). A: evolution of *sa* by four individual plants (cv. Soissons; *i2* isolate) and corresponding logistic fitting. Time is expressed as thermal time (accumulated degree days from inoculation base $0 \text{ }^\circ\text{C}$). B, C, D: Box plots of logistic parameters (*M*: disease plateau, *r*: disease initial relative rate, *T*: time at inflexion point) for each cultivar (A: Apache, C: Caphorn, K: Koréli, S: Soissons). The various isolates are pooled up.

Box plots draw the range between first and third quartile. Medians are reported as thick lines and extreme recorded values as open circles

Figure 2-5A illustrates the *sa* kinetics of the four replications obtained for the cultivar Soissons inoculated with i2 isolate. Despite large variation in earliness and severity, the overall evolution of *sa* with time followed the ascending part of a sigmoid that justifies the fitting of a logistic function to individual leaf data sets. Parameters obtained for the fitting were then statistically compared.

When the varying senescent zones merged, *sa* had extended beyond the 3-4 cm² initially inoculated, but it accounted for only about two third of the asymptotic plateau M, which was actually never reached (Figure 2-5B). Nevertheless the M magnitude stayed realistic (from 8 to 20 % of total leaf area), and moreover M, unlike *r* and T, was significantly correlated to *sa* AUDPC ($r^2 = 0.47$), suggesting it was adequately fitted. Two-way ANOVA on M underlined the lower resistance of Soissons, as compared to Caphorn ($p < 5\%$) and the lower virulence of i4 as compared to i1 i2 and i3 ($p < 10^{-4}$), while no interaction was characterized ($p > 5\%$). The *r* parameter, initial relative rate of *sa*, was very variable due to Koréli behavior (Figure 2-5C): either no STB symptom occurred (and then *r* was estimated null) or *sa* extend much more rapidly (median $18 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{Cd}^{-1}$) than in other cultivars, which did not differ together (median $7 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{Cd}^{-1}$; $p > 5\%$). No significant effect of isolate was observed on *r* ($p > 5\%$). Lastly the inflexion time T (Figure 2-5D) was not defined for the 11 inoculated plants which did not exhibit STB. In all other cases *sa* could be properly assessed until T was bypassed, except some early sampled plants; T was then accurately fitted to values around 80 $^\circ\text{Cd}$ before senescent area merged. Two-way ANOVA on T suggested that STB extend 200 $^\circ\text{Cd}$ later in Koréli than in Apache; however the difference was hardly significant ($p < 5\%$). No significant difference was assigned to isolates ($p > 5\%$), while defective data sets did not allow to test if there was an interaction between the cultivar and the isolate on this parameter. As a whole, the *sa* assessments confirmed aggressiveness and resistance data given in Table 1.

3. Apical senescence

At 405 $^\circ\text{Cd}$, the first assessed date, apical senescence was clearly started, more in Apache, with *aa* covering in average 3.5 cm² (8.6% of total leaf area), and less in Caphorn (0.7 cm²; 1.5% of total leaf area) (data not shown). This cultivar effect was very highly significant ($p < 10^{-4}$), while inoculated leaves were significantly more senescent than control ones ($p < 1\%$), yet without effect of isolate ($p > 5\%$). The higher *aa* at 405 $^\circ\text{Cd}$ of inoculated shoots was also observed by paired comparison of the inoculated and the control shoot in every plant ($p < 0.1\%$).

At 1003 $^\circ\text{Cd}$, *aa* reached an average of 9.5 and 14.5 cm² in control and inoculated plant, respectively (23% and 35% of total area), and then more than three fold *da* + *sa*. Both *aa* raw data and AUDPC showed that apical senescence was more advanced in Apache than in other cultivars (Figure 2-6). ANOVA confirmed this cultivar effect in both cases ($p < 10^{-4}$) and it also indicated that inoculated plants exhibited more *aa* ($p < 0.1\%$), what was also confirmed by paired comparison ($p < 0.1\%$). Besides, isolates were not found to affect differently either *aa* raw data or *aa* AUDPC ($p > 5\%$) and no interaction was detected between cultivar and inoculation effects ($p > 5\%$). The AUDPC of diffuse area was accepted as a covariate ($p < 1\%$), thus confirming inoculation promoted both *da* and *aa*. However analysis of covariance led to the same conclusion than ANOVA: apical senescence was more advanced in Apache than in other cultivars ($p < 10^{-4}$) and inoculated plants exhibited more *aa* ($p < 0.1\%$) yet without difference between isolates ($p > 5\%$). As a conclusion, apical senescence was clearly more advanced in inoculated shoots at least from 405 $^\circ\text{Cd}$. Nevertheless, the large *sa* variation observed in experiment did not led to variation in apical senescence.

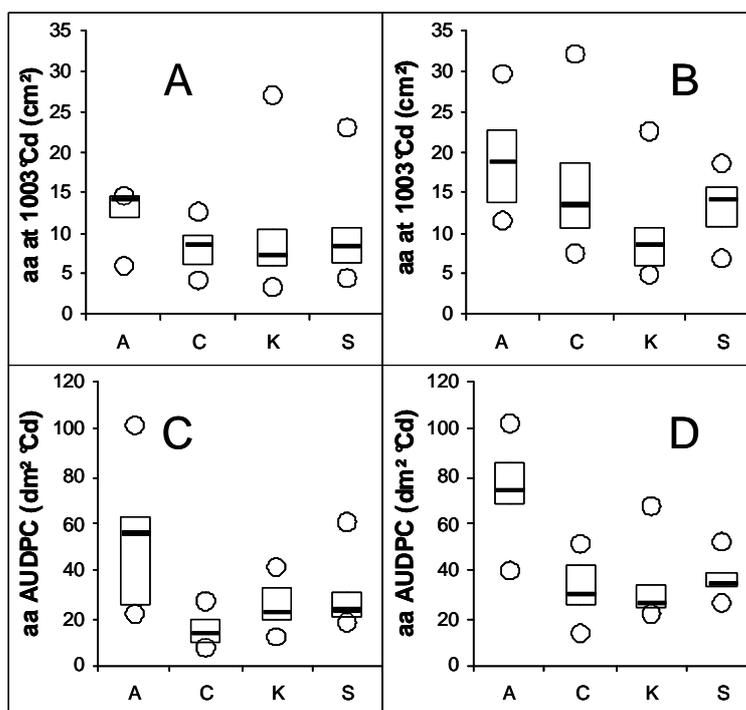


Figure 2-6: Box plots for area of apical senescence (*aa*) in cm^2 and corresponding AUDPC at 1003°Cd (dm^2Cd) by control (A,C) and inoculated plants (B,D) for each cultivar (A: Apache, C: Caphorn, Koréli, S: Soissons). The various isolates are pooled up.

Box plots draw the range between first and third quartile. Medians are reported as thick lines and extreme recorded values as open circles

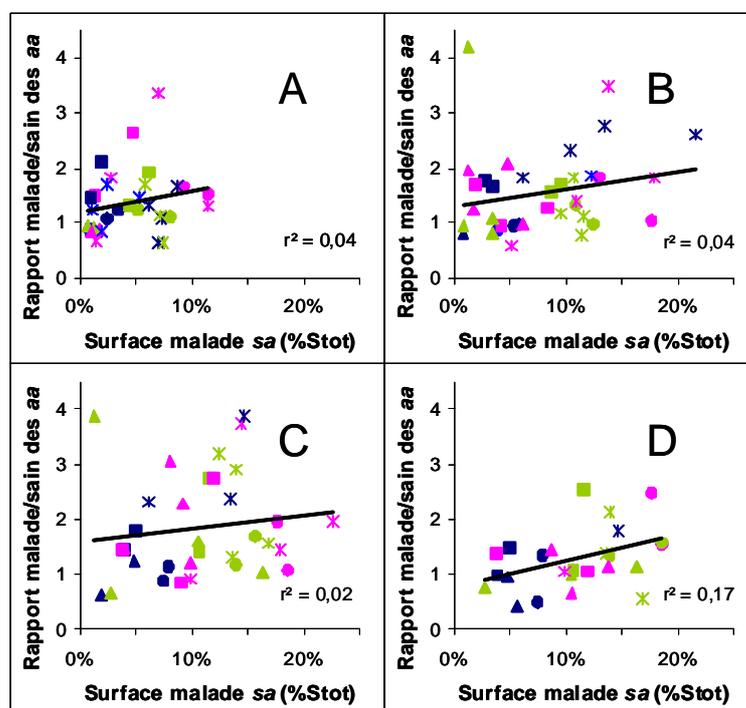


Figure 2.7: Rapport des sénescences apicales entre brin inoculé et témoin correspondant selon la sévérité à différentes dates après inoculation: 768°Cd (A), 932°Cd (B), 1058°Cd (C) et 1153°Cd (D).

Chaque point représente un couple inoculé/témoin. Les brins de sévérité inférieure à 0,5% ont été exclus. Les symboles représentent les variétés de blé (ronds Apache, carrés Caphorn, triangles Koréli, étoiles Soissons) et les couleurs les isolats de septoriose (i1 bleu foncé, i2 rose, i3 vert, i4 bleu clair).

Apical senescence in diseased relative to control leaves was plotted against septoria severity (% total leaf area), date by date for various assessments (Figure 2-7). The correlation was hardly found significant, further more only at 1153 °Cd ($r^2 = 0,17$; $p < 5\%$). It could be analyzed either as an absence of relation between *sa* and *aa*, or as a too large variability between and within cultivar \times isolate interactions, preventing any significant correlation to show up. Thereafter another way is proposed to characterize a possible effect of *sa* on *aa*. The four replicates obtained for Soissons are drawn either for control (Figure 2-8A) or for inoculated with i2 isolates (Figure 2-8B). Before its mergence with *sa*, the *aa* kinetics followed an exponential pathway and then data were log-transformed and linearly related to time. The effects of cultivar and isolate on slope (Figure 2-8C and 2-8D) and intercept (Figure 2-8E and 2-8F) of this relationship were then statistically analyzed.

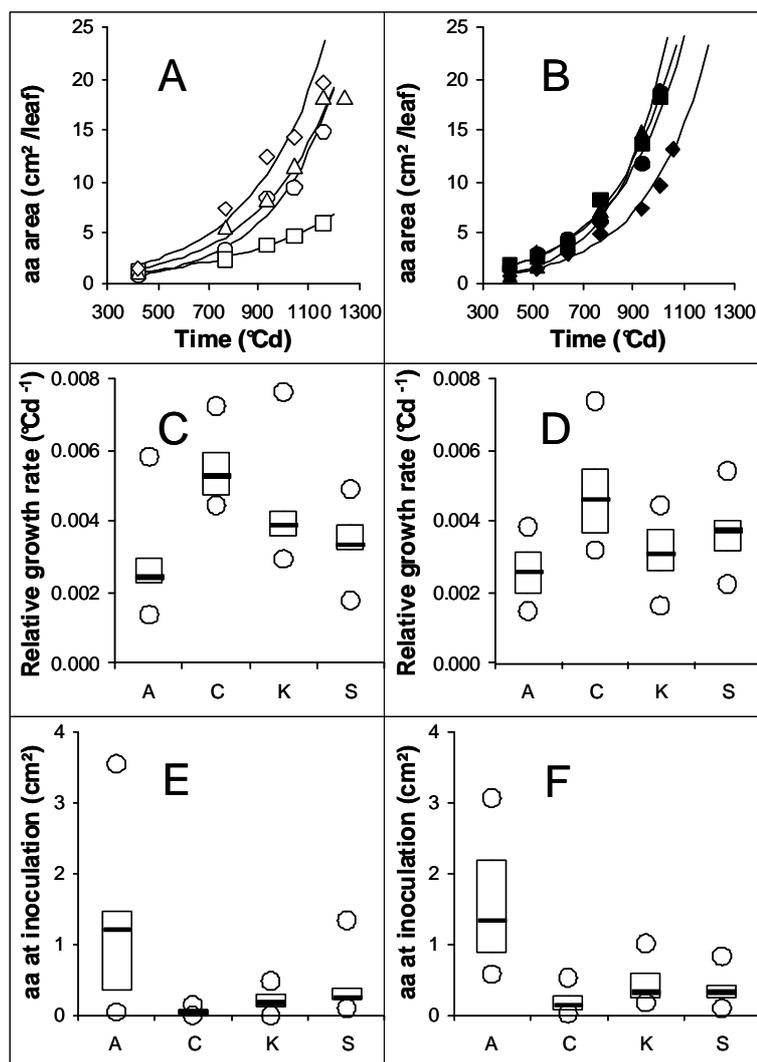


Figure 2-8: A, B: Evolution of apical senescence (*aa*) and corresponding exponential fitting by four control plants (A) and four i2 inoculated plants cv. Soissons (B). Time is expressed as thermal time (accumulated degree days from inoculation base 0 °C). C, D, E, F Box plots of *aa* logistic parameters (relative growth rate and area at inoculation date) for each cultivar (A: Apache, C: Caphorn, K: Koréli, S: Soissons) in control (C, E) and inoculated (D, F) plants. The various isolates are pooled up. Box plots draw the range between first and third quartile. Medians are reported as thick lines and extreme recorded values as open circles

Intercept was found to vary significantly with the cultivar ($p < 10^{-4}$). Hence, intercept can be regarded as the logarithm of the apical senescence by the inoculation day, which was thus more advanced by Apache scoring an average value of 1.4 and 0.7 cm² in inoculated and control plants, and less in Caphorn (0.13 and 0.03 cm², respectively). Despite the effect of inoculation was clear ($p < 0.1\%$), that of the isolate was not significant at 5% level, and no interaction was found between cultivar and inoculation ($p > 5\%$). Paired comparison between inoculated and control shoots confirms that intercept is lower in control shoots ($p < 10^{-4}$). Hence, apical senescence would then already differ between inoculated and control shoots at the time of inoculation. The slope of regression was a measurement of the relative rate of *aa*. A significant effect of cultivar ($p < 10^{-4}$) on the slope was found, with apical senescence proceeding more slowly in Apache and more quickly in Caphorn (in average $2.7 \cdot 10^{-3}$ vs. $5.0 \cdot 10^{-3}$ °Cd⁻¹, respectively). However, no effect of the inoculation ($p > 5\%$) nor interaction between the two factors ($p > 5\%$) was found. Paired comparison between inoculated and control shoots did not likewise show any senescence acceleration in inoculated shoots ($p > 5\%$). Lastly neither the AUDPC of *da*, nor that of *sa* were accepted as covariates for the relative rate of *aa* ($p > 5\%$), suggesting it was not affected either by *da* or *sa*.

Altogether, these results strongly showed that apical senescence was not accelerated by diseases between 405 °Cd and 1003 °Cd. The higher *aa* level in inoculated as compared to control plants throughout the experiment derived from a difference already observed at 405 °Cd and likely present since inoculation day.

Discussion

The present study assessed the effect of a restricted diseased leaf area (maximum 3-4 cm²) on apical leaf senescence. It involved a range of wheat cultivars varying according to their susceptibility towards STB, the flag leaves of which were inoculated with STB isolates differing by their aggressiveness towards the chosen cultivars.

Symptoms kinetics were in the same magnitude than those observed in the field with senescence rates ranging from $11 \cdot 10^{-3}$ °Cd⁻¹ to $35 \cdot 10^{-3}$ °Cd⁻¹, as in Bancal *et al.* (2007), and *sa* plateau ranging from 2% to 90%, as in Lovell *et al.* (2004). This contrasted to some previous studies where STB was inoculated to induce a massive and rapid disease development. In our work for instance, inoculum concentration was adjusted to a concentration 10^5 spores /mL, then 1000 folds lower than that used by Robert (2003), but close to that usually observed in natural conditions (Lovell *et al.*, 1997). While disease severity is usually positively correlated with inoculum concentration at a given assessment point (Shearer, 1978; Chungu *et al.*, 2001), increased inoculum concentration makes symptoms to evolve either faster or earlier. The median of fitted *sa* plateau in our work was 11% of whole blade area, whereas severity up to 100% were reported in the literature. Such levels are possible only when apical senescence is negligible, *i.e.* when disease develops early after inoculation. For instance, Magboul *et al.* (1992) reported symptoms that appeared around ten days after inoculation at 20°C (200 °Cd) and inflexion time occurred ten days later, twice earlier than that reported here. Logistic fitting reported by Magboul *et al.* (1992) also suggested a relative rate for STB around $20 \cdot 10^{-3}$ °Cd⁻¹, twice more rapidly than the median of our data. In the present study, as plant were not overwhelmed by sudden disease, varying resistance mechanisms differentiated. The relative rate for *sa* was reduced in the case of cv. Caphorn, in other words disease developed more slowly in this cultivar. This was not true for cv. Koréli, for which the higher relative rate was compensated by a later inflexion time; disease developed rapidly, but late. In both Caphorn and Koréli part of plants failed to develop any *sa* symptoms, then resistance not only involved disease development but also probably either the triggering of necrotrophic phase or the success of initial infection. These differences in the ways plant resist as well as in

the virulence of STB isolates enhanced in our case the variability in the ratio between STB and natural senescence, as *sa* AUDPC was one third of *aa* AUDPC by susceptible Soissons vs. 2.7% only by resistant Koréli.

At first glance, the level of apical senescence was increased in inoculated plants. However this *aa* increase was never related to the varying *sa* levels or AUDPC obtained by resistance or virulence tested. Moreover it was recorded from the first assessment and exponential fitting of *aa* suggested control and inoculated already differentiated by the day of inoculation. An experimental bias should be suspected; for instance the inoculation treatment *per se* could have triggered an earlier senescence, as control shoots were not bagged for three days. An alternative hypothesis is that inoculation was unwillingly performed on main shoot rather than on associated tiller: main shoot are older than tiller and could senesce earlier. In any case, fit extrapolation suggested the *aa* level was higher in inoculated shoots by less than 1 mm² in average the day of inoculation, which could explain it was not experimentally noticed when leaves were selected.

Altogether, our results suggested that the rate of apical senescence was not affected by disease. Apical senescence however is the way leaves remobilize N to fill the grains. Absence of variation in *aa* kinetics then suggests STB would at first not influence the rate of N remobilization. This result can be related to a previous work of Ben Slimane *et al.* (2009); by cutting 2nd and 3rd leaf blades, plants were starved from 21% of N to be remobilized. As a consequence, rate of grain N filling was immediately reduced by the same extent while neither senescence nor N remobilization of untreated leaves was affected. On the other hand, the opposite experiment that consisted in a complete darkening of 2nd and 3rd leaf blades results in sudden release of their N content to the plant, hardly modified N remobilization and senescence of untreated leaves. Overall, it strongly suggested that the current rate of apical senescence was not modified when change in N availability occurred somewhere in plant. It could thus be hypothesized that in diseased plants grain N filling would proceed unchanged until *aa* and *sa* merge. At this later step only would grain filling suddenly drop because N in *sa* is likely unavailable for grain. In diseased leaves a high N content is frequently found at harvest, suggesting late N blockage in tissues by many diseases (Garry *et al.*, 1996; Bancal *et al.*, 2008).

In an attempt to separate the components of induced senescence in the case of STB, this work only considered the effects of the disease on the rate of apical senescence *aa*. However senescence around the inoculation zone *sa*, likely mixes necrotic area beside the pycnidia, and induced senescence developing all around, which may explain why *sa* extended beyond the inoculated 2 cm². Previous works that mention accelerated or anticipated senescence because of disease usually considered plants where apical senescence remains negligible; it can thus be supposed that by induced senescence authors meant local, not apical senescence. Magboul *et al.* (1992) varied disease development through the conditions of inoculation and found a high correlation between the increased rates of STB severity and that of induced (*i.e.* local) senescence. By opposition Kema *et al.* (1996), inoculating 50 STB isolates to 23 plant genotypes realized a cluster analysis for both pycnidia and necrotic areas (likely necrotic area and local induced senescence), and concluded that extents of these two areas were not correlated. Providing we properly identified and related the different diseased areas in these two papers, the discrepancy between their findings may come from the way a disease range was obtained, genetic variations in the one hand, environmental variations on the other hand. It suggests necrotic area and local induced senescence might not respond to the same determinism (Kema *et al.*, 1996). For instance, the effect of fungus toxins could interact with a plant hypersensitive response (HR) like that characterized with varying pathogen (Butt *et al.*, 1998; Pontier *et al.*, 1999). Not to mention that HR shares common features with senescence such as regulatory or signal transduction pathways and specific genes involved in

the two processes (Butt *et al.*, 1998; Glazebrook, 2005; Obregon *et al.*, 2001; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Hence, it could be considered itself as a form of local senescence that limits disease expansion. Other studies, however, have mentioned HR-like cell death as a feature of disease susceptibility that may facilitate plant infection by various necrotrophic pathogens (Govrin and Levine, 2000; van Baarlen *et al.*, 2004), including STB (Keon *et al.*, 2007). On the other hand, the effect of toxins was characterized in pathosystems that involve necrotrophs like *Botrytis elliptica* / lily (van Baarlen *et al.*, 2004), or *Alternaria alternata* / tomato (Wang *et al.*, 1996), or *Cochliobolus Victoriae* / oat (Navarre et Wolpert, 1999). In these interactions, symptoms of senescence such as chlorophyll degradation or DNA laddering, typical symptom of apoptosis, were detected as a consequence of the specific toxins secretion. Currently, to our knowledge, no published work is available in the case of *STB tritici*, although the possibility of toxins involvement to explain cell death has been suggested previously (Shetty *et al.*, 2003; 2007; Kema, personal communication, 2010).

Conclusion and perspectives

Under our experimental conditions STB did not induce an acceleration of the apical senescence. The discrepancy of our results with previous works could be attributed firstly to the inoculation method, leading to moderate severity and disease kinetics close to that observed in the field, and overall to the definition of induced senescence which previously mixed up symptoms, apical and local senescence. Discriminating between necrotic symptoms, and senescence induced all around was not assessed in this study, partly because of the difficulty of defining the boundaries of sporulating areas. Thus, working on local senescence needs further investigations. Developing a image analysis program would allow separating as precisely as possible the pycnidia area from the remaining diseased surface. The diseased surface could be considered on the basis of pycnidia coverage (density, number). A complementary way would be to quantify the fungus by qPCR, as it was recently shown to correlate to area covered with pycnidia (Guo *et al.*, 2006, 2007; Rohell *et al.*, 2002). If this is achieved, our results hold the promise of an easier modeling of the GLA loss induced by foliar diseases, which is a key point in the modeling of either yield or protein quality losses.

Références bibliographiques

- Ayres PG, Press MC, Spencer-Philips PTN** (1996). Effects of pathogens and parasitic plants on source-sink relationships. In: E Zamski and AA Schaffer, (eds) Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink relationships. New York, pp 479-500.
- Bancal MO, Roche R, Bancal P** (2008). Late foliar diseases in wheat crops decrease nitrogen yield through N uptake rather than through variations in N remobilization. *Annals of Botany* **102**(4): 579-590.
- Bancal M-O, Robert C, Ney B** (2007). Modelling wheat growth and yield losses from late epidemics of foliar diseases using loss of green leaf area per layer and pre-anthesis reserves. *Annals of Botany* **100**: 777-789.
- Ben Slimane R, Bancal P, Bancal M-O** (2009). Regulation of grain nitrogen accumulation in wheat. In F Feldmann, DV Alford and C Furk (eds), Crop resistance to biotic and abiotic factors. Proceedings of the 3rd international symposium on plant protection and plant health in Europe Berlin, Germany, pp 198-208
- Butt A, Mousley C, Morris K, Beynon J, Can C, Holub E, Greenberg JT, Buchanan-Wollaston V** (1998). Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* **16**(2): 209-221.
- Chungu C, Gilbert J, Townley-Smith F** (2001). *Septoria tritici* blotch development as affected by temperature, duration of leaf wetness, inoculum concentration, and host. *Plant Disease* **85**(4): 430-435.
- Cornish P, Baker G, Murray G** (1990). Physiological responses of wheat (*Triticum aestivum*) to infection with *Mycosphaerella graminicola* causing *Septoria tritici* blotch. *Australian Journal of Agricultural Research* **41**: 317-327.
- Dimmock JPRE, Gooding MJ** (2002). The influence of foliar diseases, and their control by fungicides, on the protein concentration in wheat grain: a review. *The Journal of Agricultural Science* **138**(4): 349-366.
- Feller U, Fischer A** (1994). Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**(3): 241-273.
- Gan S, Amasino RM** (1997). Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* **113**(2): 313-319.
- Garry G, Tivoli B, Jeuffroy MH, Citharel J** (1996). Effects of Ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on the translocation of carbohydrates and nitrogenous compounds from the leaf and hull to the seed of dried-pea. *Plant Pathology* **45**(4): 769-777.
- Gaunt RE** (1995). The relationship between plant disease severity and yield. *Annual Review Phytopathology* **33**: 119-144.
- Gaunt RE, Thomson WJ, Sutcliffe J** (1986). The assessment of speckled leaf blotch in winter wheat in New Zealand. *Annals of Botany* **58**: 33-38.
- Glazebrook J** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205-227.
- Gooding MJ, Gregory PJ, Ford KE, Pepler S** (2005). Fungicide and cultivar affect post-anthesis patterns of nitrogen uptake, remobilization and utilization efficiency in wheat. *Journal of Agricultural Science* **143**: 503-518.
- Govrin EM, Levine A** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**(13): 751-757.
- Gregersen PL, Holm PB, Krupinska K** (2008). Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* **10**(s1): 37-49.

- Guo J-R, F. Schnieder, Verreet J-A** (2006). Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development in wheat using a real-time PCR assay. *FEMS Microbiology Letters* **262**: 223-229.
- Guo J-R, F. Schnieder, Verreet J-A** (2007). A real-time PCR assay for quantitative and accurate assessment of fungicide effects on *Mycosphaerella graminicola* leaf blotch. *Journal of Phytopathology* **155**(7-8): 482-487.
- Kema GHJ, Annone JG, Sayoud R, Silfhout CHV, Ginkel MV, Bree Jd** (1996). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat *Mycosphaerella graminicola* pathosystem I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* **86**(2): 200-212.
- Kema GHJ, van Silfhout CH** (1997). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem III. Comparative seedling and adult plant experiments. *Phytopathology* **87**(3): 266-272.
- Keon J, Antoniw J, Carzaniga R, Deller S, Ward JL, Baker JM, Beale MH, Hammond-Kosack K, Rudd JJ** (2007). Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(2): 178-193.
- Leitch MH, and P. D., Jenkins** (1995). Influence of nitrogen on the development of *Septoria* epidemics in winter wheat. *The Journal of Agricultural Science* **124**: 361-368.
- Lovell D, Parker S, Hunter T, Royle D, Coker R** (1997). Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* **46**(1): 126-138.
- Lovell DJ, Parker SR, Hunter T, Welham SJ, Nichols AR** (2004). Position of inoculum in the canopy affects the risk of *Septoria tritici* blotch epidemics in winter wheat. *Plant Pathology* **53**: 11-21.
- Magboul AM, Geng S, Gilchrist DG, Jackson LF** (1992). Environmental influence on the infection of wheat by *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **82**(12): 1407-1413.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M** (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**(s1): 23-36.
- Navarrea DA, Wolpert TJ** (1999). Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats *The Plant Cell* **11**: 237-250.
- Obregon P, R. M, Sanz A, Castresana C** (2001). Activation of defence-related genes during senescence: a correlation between gene expression and cellular damage. *Plant Molecular Biology* **46**: 67-77.
- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry J-F, Masclaux-Daubresse C** (2006). The two senescence-related markers, *GSI* (cytosolic glutamine synthetase) and *GDH* (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**(3): 547-557.
- Pontier D, Balague C, Roby D** (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie* **321**(9): 721-734.
- Quirino BF, Noh Y-S, Himelblau E, Amasino RM** (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**(7): 278-282.
- Robert C** (2003). Etude et modélisation du fonctionnement d'un couvert de blé attaqué par le complexe parasitaire *Puccinia triticina- Mycosphaerella graminicola*. Thèse de doctorat. INAPG, 135 p.
- Robert C, Bancal M-O, Nicolas P, Lannou C, Ney B** (2004). Analysis and modelling of effects of leaf rust and *Septoria tritici* blotch on wheat growth. *Journal of Experimental Botany* **55**(399): 1-16.

- Robert-Seilaniantza A, Navarroa L, Baria R, Jones JD** (2007). Pathological hormone imbalances *Current Opinion in Plant Biology* **10**(4): 372-379.
- Rohel EA, P. Laurent, B. A. Fraaije, N. Cavalier, Hollomon DW** (2002). Quantitative PCR monitoring of the effect of azoxystrobin treatments on *Mycosphaerella graminicola* epidemics in the field. *Pest Management Science* **58**(3): 248-254.
- Ruske RE, Gooding MJ, Jones SA** (2003). The effects of adding picoxystrobin, azoxystrobin and nitrogen to a triazole programme on disease control, flag leaf senescence, yield and grain quality of winter wheat. *Crop Protection* **22**: 975-987.
- Shearer BL** (1978). Inoculum density-host response relationships of spring wheat cultivars to infection by *Septoria tritici*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **84**: 1-12.
- Shetty NP, Kristensen BK, Newman MA, Miller K, Gregersen PL, Jrgensen HJL** (2003). Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**(6): 333-346.
- Shetty NP, Mehrabi R, Lutken H, Haldrup A, Kema GHJ, Collinge DB, Jrgensen HJL** (2007). Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist* **174**(3): 637-647.
- Talbot NJ, McCafferty HRK, Ma M, Moore K, Hamer JE** (1997). Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**(3): 179-195.
- Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Lauge R, Reisdorf-Cren M, Langin T, Masclaux-Daubresse C** (2007). The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of Experimental Botany* **58**(12): 3351-3360.
- van Baarlen P, Staats M, van Kan JAL** (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology* **5**(6): 559-574.
- Wang H, Li J, Bostock RM, Gilchrist DG** (1996). Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell* **8**(3): 375-391.

Chapitre 3

Effets de la dose et de la date des fertilisations azotées sur les cinétiques de la septoriose foliaire (*Mycosphaerella graminicola*) et de la sénescence apicale du blé d'hiver (*Triticum aestivum*) en conditions naturelles

Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons traité de l'effet de la septoriose sur la cinétique de la sénescence apicale suite à une inoculation localisée sur 2 cm². Nous avons travaillé en conditions contrôlées en serre, et en combinant des géotypes de blé et des isolats de septoriose différents. Dans cette partie, nous allons travailler dans des conditions naturelles en combinant une seule variété sensible à la septoriose (Soissons), et des conduites agricoles différentes. Nous considérerons d'une part des épidémies naturelles de septoriose sur deux années consécutives (2008, 2009), et d'autre part des inoculations artificielles effectuées en 2009. Dans les deux cas, on étudiera les deux feuilles supérieures de la plante responsables de 50 à 75 % de l'assimilation nette en carbone pendant le remplissage et de 25 à 55 % de la remobilisation azotée pendant la même période (Bancal, communication personnelle).

Notre intérêt pour les conduites agricoles découle de l'effet de la fertilisation azotée sur l'extension du feuillage, ainsi que sur la teneur en azote (N) foliaire. En effet ces deux paramètres sont soupçonnés de jouer sur le développement des maladies foliaires (Walters et Bingham, 2007).

L'extension du feuillage par la fertilisation conduit à des couverts plus denses, mais avec deux conséquences opposées sur le développement des maladies foliaires (Lovell *et al.*, 1997). D'abord la densité foliaire facilite le contact entre feuilles ce qui favorise donc la contamination. En revanche la densité foliaire entraîne la fermeture du couvert végétal ce qui diminue la pénétration et l'énergie cinétique des gouttes de pluie réduisant ainsi la dispersion par splashing. D'autres auteurs ont mis en évidence l'impact microclimatique de la fermeture du couvert (Savary *et al.*, 1995). Dans un couvert dense, le développement du pathogène est favorisé par l'augmentation de la durée d'humectation des feuilles qui facilite la germination des spores; par contre la température est diminuée ce qui prolonge la période de latence. D'après Simon *et al.* (2003), l'effet de la fertilisation dépend des caractéristiques variétales, des pratiques agronomiques et des conditions climatiques. La fertilisation favorise le développement de la septoriose dans les conditions climatiques propices à la maladie. Un effet similaire avait été observé dans le cas de la septoriose des glumes (Tiedemann *et al.*, 1995). Par contre Tompkins *et al.* (1993) ont trouvé que la sévérité de la septoriose augmente avec les faibles fertilisations azotées: dans leur essai sous semis direct, les couverts étaient moins développés et plus sensibles à la maladie que dans le cas des semis conventionnels.

Par ailleurs, la feuille sert de substrat pour l'alimentation du champignon. Chez les biotrophes (oïdium, rouille brune), quand les tissus foliaires sont riches en N, la période de latence est raccourcie, et la sporulation est augmentée (Tiedemann *et al.*, 1995). van den Berg *et al.* (2008) ont mis en évidence, dans le cas du pathosystème rouille/ *Holcus lanatus*, que la forte disponibilité en N entraîne une apparition précoce de la maladie ainsi qu'une vitesse plus élevée du développement du pathogène. Pour les nécrotrophes ou hémibiotrophes, une augmentation de la fertilisation azotée augmente généralement la sévérité d'attaque de la maladie telle que *Magnaporthe grisea* (Talukder *et al.*, 2005) et *Septoria tritici* (Leitch et Jenkins, 1995; Lovell *et al.*, 1997).

Olesen *et al.* (2003a) ont comparé les deux effets majeurs de la fertilisation azotée sur le développement de la maladie. La sévérité de l'oïdium et de la septoriose augmentait avec la fertilisation azotée d'abord en raison de l'accroissement de la teneur en N foliaire à

l'émergence de la feuille drapeau (Olesen *et al.*, 2003b). Des corrélations positives existaient aussi entre la sévérité de la maladie et la taille du couvert, mais elles étaient faibles ce qui suggère que dans ce cas, la teneur en N foliaire était plus importante pour le développement de la maladie que la taille du couvert. Quelques études se sont aussi intéressées à l'effet du fractionnement des apports azotés sur le développement de la maladie. Les apports précoces favorisent la croissance du couvert tandis que les plus tardifs jouent d'avantage sur la teneur en N foliaire. Ainsi, Olesen *et al.* (2003b) ont montré qu'à l'échelle de la plante, la sévérité de la septoriose, et plus encore celle de l'oïdium, était d'autant plus élevée que la fertilisation se faisait tôt. Par contre Leitch et Jenkins (1995) n'ont pas trouvé d'effet de la date de la fertilisation sur la sévérité de la septoriose en post-floraison.

Ces résultats apparaissent un peu contradictoires pour la septoriose des feuilles, et nous avons entrepris de tester l'effet de la dose et de la date des fertilisations azotées sur les cinétiques de la septoriose et de la sénescence apicale. L'extension des couverts et la teneur en N foliaire ont été caractérisées, tandis que l'inoculation artificielle permettait de distinguer les effets de la conduite agricole sur l'infection de ceux sur le développement de la maladie. Cette série d'expérimentation nous a aussi permis d'étendre la gamme de sévérité de septoriose analysée pour son effet sur la sénescence apicale.

Matériels et méthodes

1. Matériels

a. Les plantes

L'expérimentation a impliqué une seule variété de blé tendre, Soissons, qui a été utilisée dans l'expérimentation en serre de 2009. C'est une variété qui a eu un grand succès mais est à présent dépassée (inscription en 1988); elle se caractérise par un nombre élevé de talles et d'épis mais des grains plutôt petits. Selon du Cheyron et Moris (2010), elle répond aux critères suivants:

Critères	Note CTPS modifiée Arvalis	
Aptitude au Semis précoce	4	intermédiaire
Alternativité	3	Hiver
Précocité Epiaison	7	Précoce
Précocité Montaison	4	Tardive
Teneur Protéique	5,5	Assez élevée
Sensibilité R. brune	2	Très sensible
Sensibilité R. jaune	6	Modérément résistante
Sensibilité <i>S. nodorum</i>	5	Moyenne
Sensibilité <i>S. tritici</i>	5	Moyenne

b. Les champignons

En 2008 comme en 2009 un témoin recevant une pleine couverture fongicide (UNIX + INPUT PACK 0.8+0.8 kg /ha) était comparé à des plantes non protégées contre les maladies foliaires tardives (UNIX seulement). En conditions d'épidémies naturelles (2008, 2009), une ou plusieurs souches de septoriose sont impliquées; cependant des inoculations artificielles ont été surajoutées les deux années.

En 2008, l'inoculation utilisait la souche « Rym » isolée à Grignon mais peu agressive (cette souche correspond à l'isolat *i2* dans le chapitre II) alors que l'épidémie naturelle était nette, si bien qu'on n'a pas observé de différence entre les zones inoculées et non inoculées dans la parcelle et que seule la première a été étudiée. En 2009, on a utilisé la souche « 22 » isolée à Grignon et de forte agressivité (cette souche correspond à l'isolat *i1* dans le chapitre II). Comme l'épidémie naturelle était faible, les zones inoculée et non inoculée du champ étaient très différentes, et toutes les deux ont été caractérisées.

2. Dispositifs expérimentaux

a. Essais agricoles

Les deux années, la parcelle utilisée correspondait à un précédent Maïs, avec un reliquat azoté faible (environ 30U) qui permettait de moduler amplement la fertilisation.

- En 2008, on a utilisé trois conduites agricoles qui variaient par la densité de semis et la répartition des fertilisations azotées (l'apport total en engrais est identique):

Conduite agricole	Densité de semis	Fertilisation sortie d'hiver	2 ^{ème} apport Montaison	3 ^{ème} apport Gonflement
2008.1	514 grains/m ²	30 U	90 U	90 U
2008.2	238 grains/m ²	60 U	50 U	100 U
2008.3	238 grains/m ²	120 U	90 U	0 U

Les trois conduites agricoles ont été raisonnées pour conduire aux résultats suivants

2008.1: avec une double densité et des apports précoces faibles entraîne deux carences carbonée et azotée pendant la montaison.

2008.2: Le 3^{ème} apport est très important, ce qui maximise l'absorption d'azote après la floraison

2008.3: Le 1^{er} apport est très important, ce qui maximise le tallage et minimise l'absorption d'azote après la floraison.

- En 2009, la conduite de l'essai a due être modifiée en cours de route à cause de problèmes de semis, cependant les protocoles 2008.2 et 2009.2 sont comparables, de même que les protocoles 2008.3 et 2009.3. Par contre les protocoles 2008.1 et 2009.0 sont très différents, ce dernier se caractérisant par une faible densité de peuplement et une carence azotée sévère maintenue tout le long du cycle.

Conduite agricole	Densité de semis	Fertilisation sortie d'hiver	2 ^{ème} apport Epi 1 cm	3 ^{ème} apport 2 Nœuds	4 ^{ème} apport Gonflement
2009.0	179 grains/m ²	0 U	0 U	55 U	0 U
2009.2	162 grains/m ²	45 U	50 U	0 U	100 U
2009.3	297 grains/m ²	85 U	120 U	0 U	0 U

Dans tous les cas, chaque conduite agricole était appliquée à un seul train de semis de largeur 1,8 m et d'une centaine de mètres de longueur. Le train était divisé dans le sens de la longueur dont une moitié était traitée et l'autre non.

b. Inoculation au spray en 2008

En 2008, on a procédé à une inoculation au spray sur 16 m linéaires et 4 rangs au centre des trains, ce qui assurait de pouvoir prélever au moins 300 plantes comparables (voir plus loin). Après repérage le 24 Avril, l'inoculation a été fixée au 13 Mai pour un stade de développement prévu de Z39. En fait à cause des températures plus élevées que prévu, les plantes avaient déjà atteint le stade Z50.

- La souche de *M. graminicola* (souche « Rym », peu agressive) a été repiquée en boîtes de pétri sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar), puis placés à l'obscurité, à 20°C pendant une semaine. Le jour de l'inoculation, l'inoculum a été préparé en couvrant les boîtes de Pétri d'eau stérile avant de les gratter au scalpel. La suspension contenant les spores a été prélevée et ajustée à une concentration de 10^5 spores par mL à l'aide d'une cellule de Malassez. L'inoculum a ensuite été conservé à 5°C jusqu'au soir.
- Les parcelles ont été irriguées de 5 mm la veille, puis de 15 mm entre 17 h et 21 h.
- Vers 19 h on a pulvérisé une première fois à l'eau pour refroidir les feuilles car la température était assez élevée: $T_{max} = 26,1$ °C d'après la station météorologique.
- L'inoculation a eu lieu de 19 à 21 h par 2 personnes en vis à vis par train en pulvérisant 1,5 L, soit $1,2 \cdot 10^7$ spores par m^2 (on avait ajouté du tween à l'inoculum à la dose de 1‰)
- Les trois jours suivants, on a pulvérisé de l'eau vers 9h, 11h, 17h, 19h et irrigué le soir.

c. Inoculation au pinceau en 2009

En 2009, les traitements expérimentaux combinaient non seulement les trois conduites agricoles mais aussi deux étages foliaires: la feuille drapeau (F1) et celle au dessous (F2). On a pratiqué deux types d'inoculation (sur la moitié de la feuille, en pleine ou demi-largeur à partir de 2 cm de la ligule), avec 30 répétitions pour chaque traitement. Les F2 ont été inoculées les 11 et 12 Mai (Z39) et les F1 le 18 Mai (Z50). Les plantes étaient sélectionnées visuellement le jour de l'inoculation en excluant les plantes trop petites ou trop grandes. Le suivi n'a été réalisé, par la suite, que sur la moitié des répétitions choisies d'après la taille de l'épi et la réussite de l'inoculation. La longueur moyenne des F1 et des F2 avait préalablement été déterminée pour chaque conduite agricole, et la zone inoculée ajustée pour couvrir la moitié inférieure de la feuille (Tableau 3-1).

Tableau 3-1: Caractéristiques des feuilles inoculées en 2009

	Longueur des limbes	Zone inoculée
2009.0 Feuille F2	15,0 ± 1,6 cm	de 2 à 7 cm de la ligule
2009.2 Feuille F2	22,6 ± 2,5 cm	de 2 à 10 cm de la ligule
2009.3 Feuille F2	26,6 ± 1,6 cm	de 2 à 12 cm de la ligule
2009.0 Feuille F1	9,4 ± 1,7 cm	de 2 à 5 cm de la ligule
2009.2 Feuille F1	15,0 ± 2,6 cm	de 2 à 7,5 cm de la ligule
2009.3 Feuille F1	17,0 ± 3,2 cm	de 2 à 7,5 cm de la ligule

L'inoculum a été cultivé comme en 2008, sauf qu'il s'agissait de la souche « 22 » plus agressive. L'inoculation a été réalisée au pinceau, à la dose de 10^6 spores par mL, en demi ou en pleine largeur, sur la longueur sélectionnée pré-marquée au feutre fin. Les feuilles inoculées ont ensuite été ensachées pendant 72 heures selon la méthode mise au point par F.

Suffert en 2007. La feuille repliée avec la face inoculée vers l'intérieur était recouverte par un sachet transparent en polyéthylène humidifié par brumisation afin de maintenir l'humectation nécessaire à l'infection. Pendant les trois jours d'ensachage, les plantes étaient couvertes par une bâche contre les pluies. Dans le cas des feuilles drapeau, on a aussi installé un filet d'ombrage réduisant la lumière de 20% en raison d'un ensoleillement élevé pendant ces trois jours.

D'autre part le 22 Mai, une pulvérisation agricole de fongicide a été réalisée sur la parcelle. On a donc protégé la zone inoculée en appliquant la bâche plastique. Malheureusement cette opération s'est effectuée en plein soleil et a endommagé de nombreuses feuilles F1, ce dont il faudra tenir compte même si on a exclu de l'analyse toutes les plantes présentant clairement un problème.

3. Suivi de la sénescence foliaire

a. Plantes inoculées en 2009

Dans ce cas le suivi a été réalisé de manière non destructive sur un nombre limité de plantes par parcelle. L'apparition des chloroses a été suivie visuellement, et dès lors, les plantes présentant ces chloroses ont été tagguées afin d'être prises en photos quand les premières nécroses ont commencé à apparaître. Les dates d'apparition des chloroses et des nécroses ont été notées plante à plante. L'évolution des symptômes et de la sénescence apicale a été suivie par prise de photos (environ 1000 pixels par pouce) avec le même dispositif que celui utilisé pour l'expérimentation en serre. Le suivi a été effectué jusqu'à ce que toutes les plantes aient été 100% sénescentes. Malgré l'utilisation d'une lumière blanche dans le dispositif utilisé, les photos présentaient une dominante jaune marquée, nécessitant un rétablissement du blanc avec le logiciel *Photoshop Elements*. La résolution des photos a ensuite été réduite à 700 pixels par pouce qui permettait leur analyse par le logiciel *Assess*. Pour chaque photo, l'analyse d'image a concerné la partie située entre les 2 traits de feutre délimitant la zone photographiée, puis les résultats par photo ont été sommés pour une même feuille. Deux types de résultats ont été obtenus: la sénescence apicale, et les lésions vers le bas dues à la septoriose. Les résultats bruts ont été obtenus en pixels, puis convertis en cm² et en pourcentage de surface totale. Pour une comparaison plus facile avec les autres plantes au champ, les résultats seront présentés en pourcentage de la surface totale plutôt qu'en cm² comme dans le cas de l'expérience en serre.

b. Autres plantes

Dans ce cas, le suivi a été réalisé de manière destructive par prélèvements hebdomadaires de plantes considérées comme représentatives de la plante moyenne dans chaque conduite agricole. A l'épiaison, un prélèvement a été réalisé sur une surface de 0,5 m² représentant 100 à 200 plantes selon la densité. On a sélectionné parmi ces plantes des brins maitres dont le poids frais était dans une fenêtre de ± 1 g par rapport à la moyenne de la placette. La longueur de l'épi de ces brins moyens a été caractérisée et par la suite et jusqu'à la maturité 15 brins ont été sélectionnés chaque semaine en se basant sur la longueur de leur épi. En 2009, on procédait aussi à un prélèvement hebdomadaire de 0,35 m² pour contrôler le nombre de brins. Les deux années, les 15 brins sélectionnés ont été disséqués, et leurs limbes classés par étage foliaire puis collés sur des transparents en trois répétitions de 5 plantes afin d'être scannés. Le scan a été réalisé sur fond bleu, au format Tiff, en couleurs brutes et à une résolution de 300 pixels par pouce. Les lésions observées vers la base des feuilles correspondaient majoritairement à de la septoriose, cependant quelques cas étaient douteux; de plus l'apex de

nombreuses feuilles était mécaniquement endommagé. Un tri sélectif a donc été réalisé *a posteriori* sur les scans afin de n'utiliser que des feuilles septoriées avec leur pointe intacte. Tout comme dans le cas des plantes inoculées en 2009, l'évolution de la sénescence apicale et des symptômes de septoriose chez les plantes malades a été suivie jusqu'à ce qu'ils se mélangent. Les feuilles étaient de longueur très variable et de plus elles changeaient à chaque date puisque le prélèvement était destructif, on présentera donc les résultats en pourcentage de la surface totale plutôt qu'en cm²

4. Traitement des données et analyses statistiques

a. Cinétiques de sénescence

Le type de cinétique suivi par chaque sénescence a été vérifié dans chaque cas; cependant le modèle observé au cours de l'expérimentation en serre (sénescence apicale exponentielle, sénescence autour de la zone inoculée logistique) n'a pas toujours été retrouvé, et donc le paramétrage des courbes de sénescence sera détaillé dans la partie résultat. Dans la plupart des cas, les dates de suivi ont été exprimées en degrés jours après floraison (djA), mais dans le cas de l'essai inoculé en 2009, certains paramètres peuvent aussi être rapportés en degrés jours après inoculation (djI).

b. Analyses de variance

Les données correspondant à des cinétiques exponentielles, ont été transformées par une fonction logarithmique afin d'exprimer les résultats en utilisant la régression linéaire. La pente représente le taux de la sénescence, et l'ordonnée à l'origine le logarithme de la sénescence au temps zéro. Des ANOVA multifactorielles ont été réalisées sur ces deux paramètres pour tenir compte de l'effet de l'étage foliaire et du mode de conduite agricole. On a souvent testé l'ordonnée à l'origine plutôt que la sénescence initiale afin de respecter l'homogénéité des variances. Même dans ce cas le test de Kurtosis n'était pas toujours respecté, mais la comparaison des médianes selon Kruskal-Wallis aboutissait au même résultat que l'ANOVA.

Certaines données de maladies étaient assimilables à des cinétiques logistiques

$$m = M / [1 + e^{-r \cdot (T-t)}],$$

où m est le pourcentage de surface malade avec ou sans pycnides, M est le plateau asymptotique de la logistique, r le taux de croissance initial, et T le temps au point d'inflexion. Ces paramètres ont été ajustés sur Xcel en utilisant la fonction solveur, puis des ANOVA multifactorielles ont été réalisées comme indiqué ci-dessus

Résultats

A. Epidémies naturelles

Cette section compare les témoins traités en 2008 et 2009, avec les plantes non traitées correspondantes. En 2008, ces plantes avaient été inoculées au spray, mais sans résultat visible. Pour chaque année, le niveau de maladie « en épidémie naturelle » a été caractérisé, et les effets de la conduite agricole et des traitements fongicides ont été testés sur les paramètres de la cinétique de maladie pour les feuilles F1 et F2, et aussi sur les paramètres de la cinétique de la sénescence apicale. L'analyse des plantes non traitées puis inoculées au pinceau en 2009 sera traitée à part.

1. Epidémie 2008

a. Caractérisation agronomique des peuplements à l'anthèse

Les différentes conduites agricoles ont conduit à une variabilité des peuplements qui pourrait elle-même influencer sur la réussite de l'épidémie. Une caractérisation a donc été réalisée et reportée dans la figure 3-1 ainsi que le tableau 3-2.

Tableau 3-2: ANOVA des effets des conduites agricoles (ITK) et des traitements fongicides (Fon) sur les paramètres des peuplements obtenus en 2008 à l'anthèse (NE/m²: nombre d'épis par m², GLAI: indice foliaire vert, SF: surface foliaire): * $P < 1\%$; ** : $P < 10^{-3}$; ***: $P < 10^{-4}$; NS: non significatif ($P > 5\%$) et caractérisation de l'effet des conduites agricoles sur les peuplements en 2008 (moyenne et écart-types pour trois répétitions). nd = non déterminé. Les différents ITK sont décrits en p.99.

		----- Paramètres étudiés -----					
		NE/m ²	GLAI (m ² /m ²)	SF F1 (cm ² /brin)	SF F2 (cm ² /brin)	[N] F1 (%MS)	[N] F2 (%MS)
ANOVA 2 facteurs							
		-	***	***	***	NS	*
ITK		(2≤1≤3)	(1=2<3)	(1=2<3)	(1<2<3)	NS	(2=1<3)
Fon		nd	NS	NS	NS	NS	-(nt<t)
ITK × Fon		nd	NS	NS	NS	NS	NS
Moyennes ± écarts-type							
2008.1	traités	619 ± 32	3,3 ± 0,2	24,5 ± 2,0	18,8 ± 0,2	4,2 ± 0,1	3,4 ± 0,1
2008.1	non tr.	nd	3,4 ± 0,3	26,0 ± 1,8	18,9 ± 0,5	4,0 ± 0,1	3,3 ± 0,1
2008.2	traités	571 ± 23	4,1 ± 0,3	26,7 ± 0,9	28,3 ± 0,3	4,3 ± 0,4	3,8 ± 0,1
2008.2	non tr.	nd	3,8 ± 0,3	25,4 ± 1,4	27,9 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,4 ± 0,1
2008.3	traités	736 ± 90	5,7 ± 0,6	34,6 ± 1,0	35,7 ± 1,0	4,6 ± 0,5	4,0 ± 0,1
2008.3	non tr.	nd	5,5 ± 0,6	32,6 ± 0,4	34,7 ± 0,2	4,3 ± 0,2	3,8 ± 0,1

La conduite des cultures entraîne une teneur azotée des feuilles légèrement plus élevée sous 2008.3. Toutefois cette différence est à peine significative ($P < 5\%$) et du même ordre de grandeur que celle observée entre les feuilles prélevées dans les zones traitées et non traitées sous 2008.1 et 2008.3 (Figure 3-1). Cette différence est trop précoce pour être attribuée aux maladies (contrairement à ce qu'on observe après 600 djA). Il s'agit probablement d'une hétérogénéité de la parcelle. Il est possible qu'à cause de cette hétérogénéité il y ait aussi eu une différence de densité de peuplement entre zone traitée et non traitée, mais cela n'a pas été mesuré. En tout cas, les différences de tallage ont complètement gommé celles de densité de semis. Le nombre de brins épiés par m² était maximum sous 2008.3 ($P < 10^{-4}$), alors que la densité de semis était double sous 2008.1. La taille des feuilles n'était pas significativement affectée par le traitement ($P > 5\%$) mais elle était modifiée par la conduite agricole ($P < 10^{-4}$). Pour les deux étages foliaires la surface des feuilles était maximale sous 2008.3, tandis que la F2 sous 2008.1 était significativement plus petite que sous 2008.2. Globalement la taille du couvert (GLAI) variait comme celle des F1.

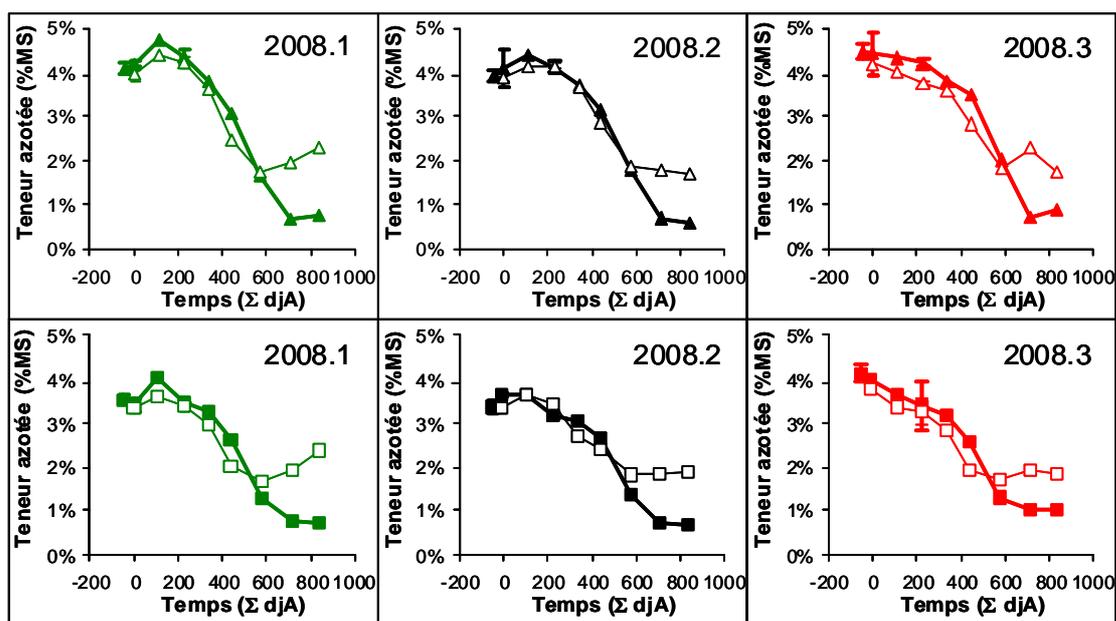


Figure 3-1: Evolution de la teneur azotée des feuilles (%MS) en 2008, en fonction du temps en degrés jours après l'anthèse (ΣdjA). Les symboles pleins (moyenne et écart-types pour trois répétitions) indiquent les données des parcelles traitées et les symboles vides celles des parcelles non traitées. Les feuilles F1 (en haut) sont représentées par des triangles et les F2 (en bas) par des carrés. Le code couleur est le suivant: 2008.1: vert, 2008.2: noir, 2008.3 rouge. Les différents ITK sont décrits p.99.

L'année 2008 se caractérise ensuite par une épidémie d'intensité moyenne avec un effet de réduction des surfaces vertes de l'ordre de 30% en intégrant sur toute la période de remplissage (donnée non figurée). Toutefois ce calcul ne distingue pas la sénescence apicale de celle localisée autour des sites d'infection, ce qu'on va étudier à présent.

b. Cinétiques de sénescence

Contrairement à l'expérimentation en serre, la maladie ne se développe pas seulement à la base de la feuille. Donc les zones sénescentes ne sont pas aussi bien séparées; d'ailleurs la maladie peut se développer en plusieurs zones qui fusionneront avec la sénescence apicale à des moments distincts. Le résultat de cette observation, valable pour toutes les expérimentations au champ, est que le dernier point valide (où les zones sénescentes sont clairement séparables) arrive relativement tôt, bien avant que la feuille soit 100% sénescente. En 2008, le dernier point valide arrivait entre 321 et 576 djA selon l'étage foliaire et les traitements. La surface sénescente totale représentait toujours moins de 70%, et dans la plupart des cas moins de 30% (Figure 3-2). Il n'est donc pas très surprenant qu'aucune relation entre surface malade et sénescence apicale n'émerge clairement de ces données brutes.

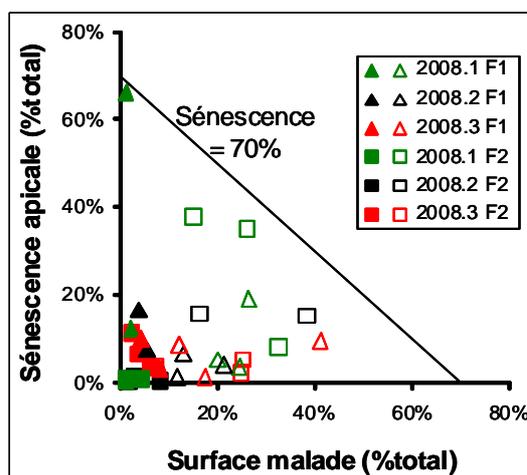


Figure 3-2: Surface malade et sénescence apicale au dernier point valide en 2008. Les symboles sont comme pour la figure 1. La droite correspondant à 70% de surface sénescente a été indiquée.

Pour utiliser au mieux l'information qu'on avait, on a recherché un ajustement pour les deux types de sénescence observés. La première question à se poser était quel pouvait être le meilleur ajustement. Le tableau 3-3 rapporte les résultats obtenus en ajustant toutes les données de chaque modalité expérimentale à différentes équations mathématiques.

Tableau 3-3: Ajustement des surfaces sénescentes en 2008 par étage foliaire (F1 et F2), par traitement fongicide et par conduite agricole. Deux types de modèles ont été testés pour la surface malade: soit exponentielle, soit logistique. Deux types de modèles ont été testés pour la sénescence apicale: soit exponentielle, soit constante puis exponentielle. Les coefficients de corrélation r^2 indiquent la robustesse de l'ajustement testé. L'astérisque (*) indique que les trois paramètres ajustés pour ce modèle font qu'il n'est pas différent de l'exponentielle (modèle à deux paramètres).

Feuilles F1		Σ djA Dernier Pt	Nb de Pts	----- coefficients de corrélation r^2 -----			
				S. malade		S. apicale	
			Expo	Logistique	Expo	Cte/Expo	
2008.1	traités	576	21	0,82	0,78	0,57	0,63
2008.1	non tr.	440	18	0,92	0,92 *	0,85	0,85 *
2008.2	traités	560	21	0,82	0,82 *	0,73	0,73 *
2008.2	non tr.	423	18	0,86	0,86 *	0,68	0,68 *
2008.3	traités	560	21	0,95	0,95 *	0,70	0,70 *
2008.3	non tr.	560	18	0,98	0,98	0,78	0,78 *
Feuilles F2							
2008.1	traités	576	21	0,84	0,84 *	0,68	0,94
2008.1	non tr.	440	18	0,96	0,96	0,69	0,69 *
2008.2	traités	423	19	0,69	0,69 *	0,60	0,61
2008.2	non tr.	423	16	0,94	0,93	0,88	0,97
2008.3	traités	423	18	0,83	0,84	0,84	0,82
2008.3	non tr.	321	15	0,86	0,86	0,83	0,83 *

➤ La surface malade a été ajustée à une logistique dans l'expérience en serre, cependant en 2008 les coefficients de corrélations n'étaient pas meilleurs dans ce cas qu'avec une fonction exponentielle, plus simple. De plus, dans la moitié des cas, les ajustements logistiques proposaient des valeurs très élevées pour le point d'inflexion, ce qui revient à transformer la logistique en exponentielle dans le domaine des observations. Enfin graphiquement, la relation entre le temps et le logarithme de la surface malade était toujours clairement linéaire (données non figurées), ce qui montre bien que la relation est exponentielle.

➤ La sénescence apicale était ajustée à une exponentielle dans l'expérience en serre, ce qui revient à dire que la surface concernée croît d'abord très lentement. Caractériser cette faible croissance pose une difficulté dans le cas de mesures destructrices, parce qu'elle risque d'être masquée par le bruit entre les différents échantillons. C'est pour cela qu'on a testé un modèle alternatif dans lequel la sénescence apicale semble d'abord constante, puis varie exponentiellement après un certain délai. Cependant dans la plupart des cas, non seulement l'amélioration obtenue par ce modèle plus compliqué reste marginale, mais surtout le délai ajusté se place avant le début des observations (autrement dit le modèle revient à une exponentielle simple). En fait, il n'y a que pour les feuilles F2 traitées sous 2008.1 que les deux ajustements sont très différents. Cependant les paramètres de l'ajustement proposeraient alors une sénescence qui ne démarrerait qu'après 398 djA, bien après celle des F1 du même traitement, ce qui est absurde. On a donc considéré qu'il s'agissait d'un artefact, et conservé le modèle exponentiel simple pour toutes les sénescences apicales.

c. Paramètres des ajustements

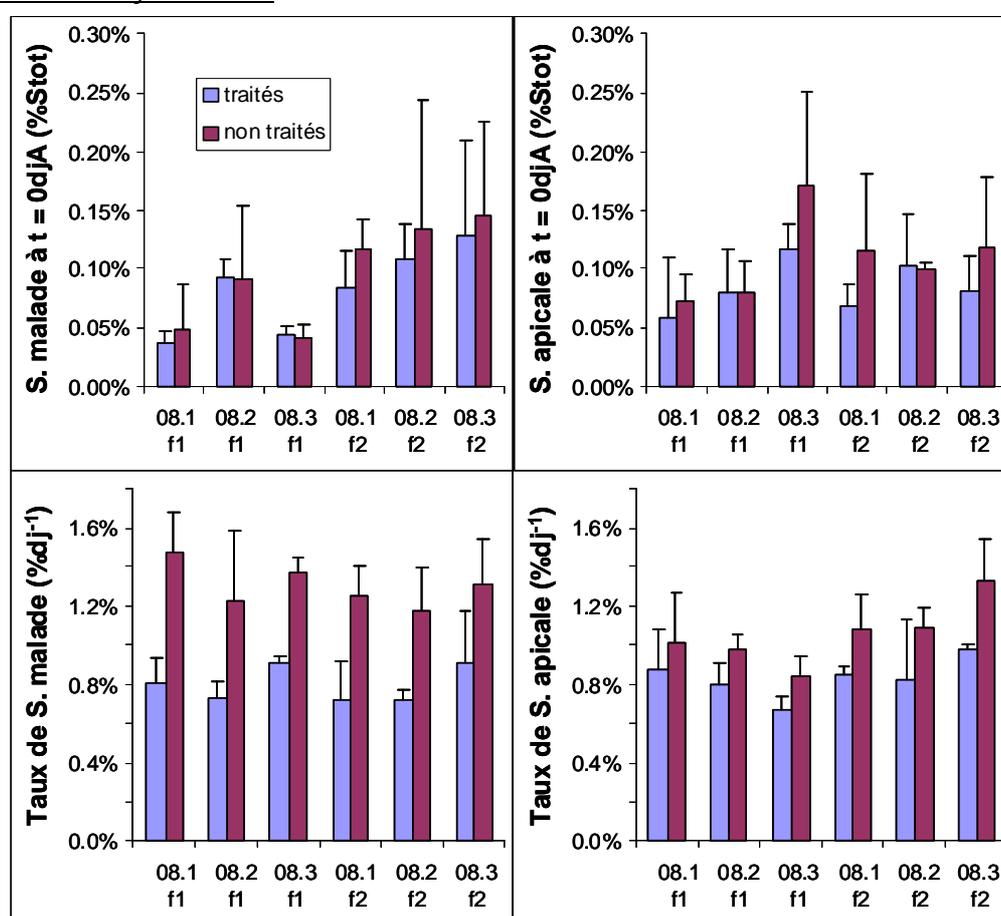


Figure 3-3: Paramètres (surface à l'anthèse et taux initial de croissance) obtenus par ajustements exponentiels de la surface malade (à gauche) et de la sénescence apicale (à droite) en 2008 pour la F1 et la F2 pour chaque itinéraire technique (cf p99). Moyennes et écart types pour trois répétitions

Les jeux de données ont alors été divisés en trois de manière à obtenir trois ajustements par modalité expérimentale. Les paramètres des ajustements exponentiels ont été obtenus à partir de la relation linéaire entre le temps et le logarithme des sénescences. Bien que le nombre de points soit réduit (de 5 à 7) tous les ajustements obtenus restaient significatifs au niveau 5%, et la plupart au niveau 1%. La pente des relations linéaires donne le taux de croissance de la

surface malade (mR) et de la sénescence apicale (aR). A partir de l'ordonnée à l'origine, on obtient la surface malade (mS_0) et la sénescence apicale (aS_0) à l'anthèse (Figure 3-3).

Des analyses de variance à trois facteurs ont pu être obtenues pour chaque paramètre (Tableau 3-4). De façon prévisible, le taux de croissance de la maladie mR était très significativement supérieur dans le cas des plantes non traitées ($P < 10^{-4}$). Cependant mR était loin d'être nul chez les plantes traitées, et on peut penser que la couverture fongicide était insuffisante cette année. Par contre mR n'était significativement affecté ni par les conduites agricoles, ni par l'étage foliaire ($P > 5\%$). La surface malade à l'origine mS_0 était un peu plus élevée chez les F2 ($P < 10^{-3}$), mais son incertitude importante n'a pas permis de voir d'effet de la conduite agricole ou des fongicides. Ni l'étage foliaire ni les fongicides n'affectaient la sénescence apicale aS_0 , et son avance sous 2008.3 semble douteuse ($P < 5\%$). Enfin le taux de sénescence apicale aR était plus élevé chez les F2 ($P < 1\%$), du moins sous 2008.3 comme l'indique l'interaction entre étage foliaire et conduite agricole. Le point le plus intéressant est que le aR était clairement plus élevé ($P < 10^{-3}$) chez les plantes malades. Ceci suggère que la maladie a accéléré la sénescence apicale.

Tableau 3-4: ANOVA multifactorielle des effets de l'étage foliaire (Str), des conduites agricoles (ITK) et des traitements fongicides (Fon) sur les paramètres des ajustements exponentiels des sénescences en 2008 (mS_0 : surface malade à 0 dJA, mR : taux initial de croissance de la maladie, aS_0 : surface sénescence à 0 dJA, aR : taux initial de croissance de la sénescence apicale): * $P < 1\%$; ** $P < 10^{-3}$; *** $P < 10^{-4}$; NS: non significatif ($P > 5\%$). Les différents ITK sont décrits en p.99.

	S. malade		S. apicale	
	mS_0	Taux mR	aS_0	Taux aR
Str	**	NS	NS	*
ITK	NS	NS	-	NS
Fon	NS	***	NS	**
Str × ITK	NS	NS	NS	-
Str × Fon	NS	NS	NS	NS
ITK × Fon	NS	NS	NS	NS

Cet effet n'est pas considérable, et aR n'admet pas mR comme covariable ($P > 5\%$; donnée non présentée). Par contre, les deux taux sont significativement corrélés ($P < 1\%$) quoiqu'avec un coefficient et une pente faible (Figure 3-4): ${}^mR = 0,6\% + 0,3 \cdot {}^aR$; $r^2 = 0,21$

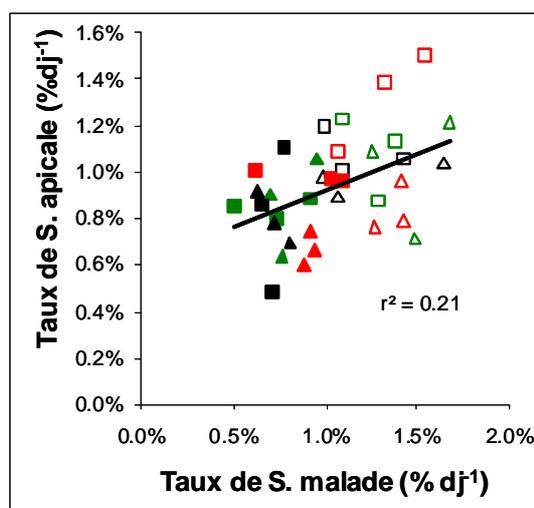


Figure 3-4: Corrélation entre le taux de croissance de la surface malade mR et celui de la sénescence apicale aR en 2008. Chaque point correspond à une répétition. Les symboles sont comme en figure 3-1.

En conclusion, dans le cas de l'épidémie moyenne de 2008, un certain accroissement de la sénescence apicale apparaît par l'ajustement exponentiel des données. Au dernier point valide (où les zones sénescents sont clairement séparables), la moyenne des ajustements exponentiels atteint 27% et 12% de surface malade et de sénescence apicale chez les plantes non traitées contre 4% et 3% respectivement pour les témoins à la même date. Cet accroissement reste cependant trop faible et trop bruité pour être visible sur les données brutes (Figure 3-2).

2. Epidémie 2009

a. Caractérisation agronomique des peuplements à l'anthèse

La conduite des cultures a entraîné une différence très significative ($P < 10^{-4}$) du peuplement épi qui est plus dense sous 2009.3 et moins sous 2009.0, sans effet du traitement fongicide ($P > 5\%$). La conduite des cultures entraîne aussi une variation de la taille des feuilles ($P < 10^{-4}$) plus grande sous 2009.3 et moins sous 2009.0. Malheureusement, un effet fongicide peut aussi être relevé ($P < 1\%$ sur F2; $P < 5\%$ sur F1). Cette différence est trop précoce pour être attribuée aux maladies. Il s'agit probablement d'une hétérogénéité de la parcelle qui se répercute sur le GLAI. Enfin, la teneur azotée des feuilles n'était affectée ni par la conduite des cultures, ni par les traitements ($P > 5\%$).

Tableau 3-5: ANOVA des effets des conduites agricoles (ITK) et des traitements fongicides (Fon) sur les paramètres des peuplements obtenus en 2009 à l'anthèse (NE/m²: nombre d'épis par m², GLAI: indice foliaire vert, SF: surface foliaire): * $P < 1\%$; ** $P < 10^{-3}$; *** $P < 10^{-4}$; NS: non significatif ($P > 5\%$) et caractérisation de l'effet des conduites agricoles sur les peuplements en 2009 (moyenne et écart-types pour trois répétitions). nd = non déterminé. Les différents ITK sont décrits en p.99.

		----- Paramètres étudiés -----					
		NE/m ²	GLAI (m ² /m ²)	SF F1 (cm ² /brin)	SF F2 (cm ² /brin)	[N] F1 (%MS)	[N] F2 (%MS)
ANOVA 2 facteurs							
		***	***	***	***	NS	NS
ITK		(0<2<3)	(0<2<3)	(0<2<3)	(0<2<3)	NS	NS
Fon		NS	(nt<t)	(nt<t)	* (nt<t)	NS	NS
ITK × Fon		NS	***	NS	NS	nd	nd
Moyennes ± écarts-type							
2009.0	traités	255 ± 14	1,1 ± 0,0	7,4 ± 0,4	11,8 ± 0,3	3,9	3,9
2009.0	non tr.	256 ± 22	1,3 ± 0,1	7,7 ± 0,9	11,6 ± 0,8	4,0	3,4
2009.2	traités	499 ± 35	2,6 ± 0,1	14,4 ± 1,0	20,9 ± 0,7	4,2	3,3
2009.2	non tr.	479 ± 31	2,7 ± 0,1	13,5 ± 1,0	19,6 ± 0,7	3,8	3,7
2009.3	traités	743 ± 35	5,4 ± 0,2	21,4 ± 1,5	26,8 ± 0,8	4,1	4,0
2009.3	non tr.	698 ± 40	4,6 ± 0,2	18,8 ± 0,4	24,9 ± 0,5	4,7	3,8

L'année 2009 se caractérise ensuite par des symptômes pas toujours typiques de la septoriose et une épidémie d'intensité variable avec un effet de réduction des surfaces vertes négligeable sous 2009.0 et 2009.2, mais qui atteint environ 10% sous 2009.3 en intégrant sur toute la période de remplissage (donnée non figurée). Toutefois ce calcul ne distingue pas la sénescence apicale de celle localisée autour des sites d'infection, ce qu'on va étudier à présent.

b. Cinétiques de sénescence

Le dernier point valide (où les zones sénescents sont clairement séparables) arrive plus tard qu'en 2008 (vers 600 djA), mais dans la surface malade est toujours faible (Figure 3-5). Comme aucune relation entre surface malade et sénescence apicale n'émerge clairement de

ces données brutes, on a recherché un ajustement pour les deux types de sénescence observés. Le tableau 3-6 rapporte les résultats obtenus pour la recherche du meilleur ajustement.

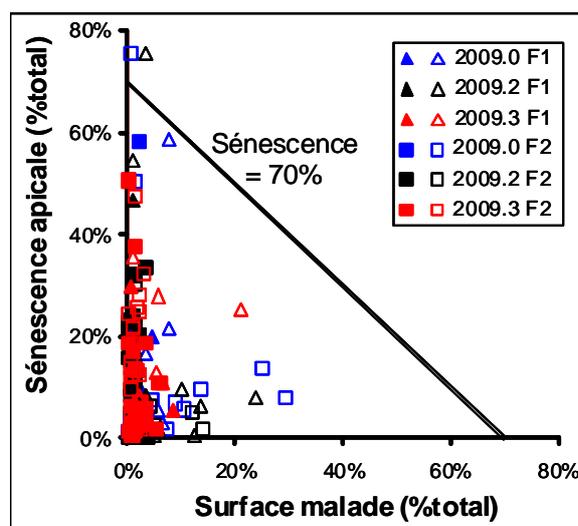


Figure 3-5: Surface malade et sénescence apicale au dernier point valide en 2009. Les symboles pleins indiquent les données des parcelles traitées et les symboles vides celles des parcelles non traitées. Les feuilles F1 sont représentées par des triangles et les F2 par des carrés. Le code couleur est le suivant: 2009.0: bleu, 2009.2: noir, 2009.3 rouge. Les différents ITK sont décrits en p.99. La droite correspondant à 70% de surface sénescente a été indiquée.

Tableau 3-6: Ajustement des surfaces sénescentes en 2009 par étage foliaire (F1 et F2), par traitement fongicide et par conduite agricole. Deux types de modèles ont été testés pour la surface malade: soit exponentielle, soit logistique. Deux types de modèles ont été testés pour la sénescence apicale: soit exponentielle, soit constante puis exponentielle. Les coefficients de corrélation r^2 indiquent la robustesse de l'ajustement testé. L'astérisque (*) indique que les trois paramètres ajustés pour ce modèle font qu'il n'est pas différent de l'exponentielle (modèle à deux paramètres).

Feuilles F1		Σ djA Dernier Pt	Nb de Pts	----- coefficients de corrélation r^2 -----			
				S. malade		S. apicale	
			Expo	Logistique	Expo	Cte/Expo	
2009.0	traités	598	72	0,32	0,15	0,72	0,73
2009.0	non tr.	740	82	0,62	0,50	0,74	0,77
2009.2	traités	587	73	0,42	0,39	0,45	0,55
2009.2	non tr.	587	57	0,71	0,48	0,53	0,69
2009.3	traités	587	64	0,70	0,37	0,61	0,61 *
2009.3	non tr.	587	53	0,73	0,34	0,84	0,84 *
Feuilles F2							
2009.0	traités	598	73	0,33	0,06	0,60	0,73
2009.0	non tr.	598	74	0,48	0,21	0,57	0,68
2009.2	traités	730	95	0,32	0,20	0,46	0,77
2009.2	non tr.	587	74	0,46	0,22	0,59	0,69
2009.3	traités	730	88	0,51	0,38	0,56	0,56
2009.3	non tr.	587	81	0,51	0,40	0,80	0,83

Les ajustements obtenus apparaissent beaucoup plus bruités qu'en 2008, peut-être à cause du changement de protocole (en 2009, on a mesuré chaque feuille individuellement, alors qu'en 2008 on a moyenné par scan de 1 à 5 feuilles). Comme l'année précédente la surface malade

s'ajuste plutôt à une exponentielle qu'à une logistique. Par contre, les données montrent que la sénescence apicale ne s'accroît qu'après un long délai sous 2009.0 et surtout sous 2009.2, tandis que le modèle exponentiel simple reste justifié sous 2009.3. Dans un premier temps, on avait choisi d'appliquer le modèle exponentiel retardé dans tous les cas pour la sénescence apicale, mais les paramètres ajustés étaient très fortement inter-corrélés ($r^2 = 0,94$ entre le logarithme de aS_0 et aR), ce qui suggère un modèle trop paramétré. On présentera donc ici les résultats d'ajustements exponentiels simples pour la sénescence apicale. L'inter-corrélation entre paramètres descend alors à $r^2 = 0,68$ (elle ne vaut que $r^2 = 0,19$ pour les surfaces malades).

c. Paramètres des ajustements

Les données ont été réparties en trois lots de manière à obtenir trois ajustements par modalité expérimentale. Les paramètres ont été obtenus par la relation linéaire entre le temps et le logarithme des sénescences (Figure 3-6). Tous les ajustements obtenus étaient significatifs au niveau 1%.

Des analyses de variance à trois facteurs ont été réalisées pour chaque paramètre (Tableau 3-7). Le taux de croissance de la maladie mR est significativement supérieur dans le cas des plantes non traitées ($P < 10^{-3}$). Cependant mR est beaucoup plus faible qu'en 2008, et la différence entre traités et non traités est presque nulle sous 2009.3, comme l'indique l'interaction ITK×Fon ($P < 5\%$). Pour la surface malade à l'anthèse mS_0 on a relevé des effets très significatifs de la conduite agricole et de l'étage foliaire ainsi que de leur interaction ($P < 10^{-4}$): en fait la mS_0 était très élevée sur la F1 sous 2009.0 et 2009.2, mais pas sous 2009.3. L'interaction ITK×Fon ($P < 10^{-3}$) vient de ce que mS_0 est plus importante sous 2009.2 pour les plantes traitées, alors que c'est l'inverse sous 2009.3. Mises ensemble ces données suggèrent que la maladie progresse moins lentement chez les plantes non traitées parce que mR est moins faible sous 2009.0 et 2009.2 et parce que mS_0 est plus importante sous 2009.3. Les ajustements prévoient que la surface malade à 600 djA n'est pas très élevée: en moyenne 2% sur les feuilles traitées et 5% sur les feuilles non traitées; c'est ce qu'on voyait déjà sur les données brutes de la figure 3-5.

La sénescence apicale à la floraison aS_0 ne semblait pas affectée par les fongicides, mais semble moins avancée sur les F2 ($P < 10^{-4}$) et sous 2009.0 ($P < 1\%$). Ce résultat est surprenant puisqu'on s'attendrait à une sénescence plus précoce des vieilles feuilles et sous carence azotée. Il pourrait être influencé par l'inter-corrélation entre aS_0 et aR . En effet on observe une diminution de aR chez les F1 ($P < 10^{-3}$) et sous 2009.2 ($P < 1\%$). Enfin aR était plus élevé ($P < 1\%$) chez les plantes malades.

Vue le très faible développement des maladies, il est difficile de penser qu'elles ont accéléré la sénescence apicale. Bien que le modèle exponentiel simple sous estime la sénescence apicale tardive par rapport aux données brutes (Figure 3-5), il permet quand même de constater que la sénescence apicale se développe plus vite que les maladies. A 600 djA la moyenne des ajustements exponentiels atteint 6% sur les feuilles traitées et 13% sur les feuilles non traitées. Il est possible que cette différence soit simplement liée à l'hétérogénéité des peuplements. Dans la zone traitée les plantes avaient de plus grandes feuilles, il est possible qu'elles aient vieilli plus vite sans lien avec la faible pression de maladie. D'ailleurs quand on a estimé l'effet du traitement en intégrant la réduction des surfaces vertes sur toute la période de remplissage, on a obtenu une différence négligeable sous 2009.0 et 2009.2. Sous 2009.3 la différence atteignait 10% mais plus par hétérogénéité de la sénescence apicale que par développement de la surface malade.

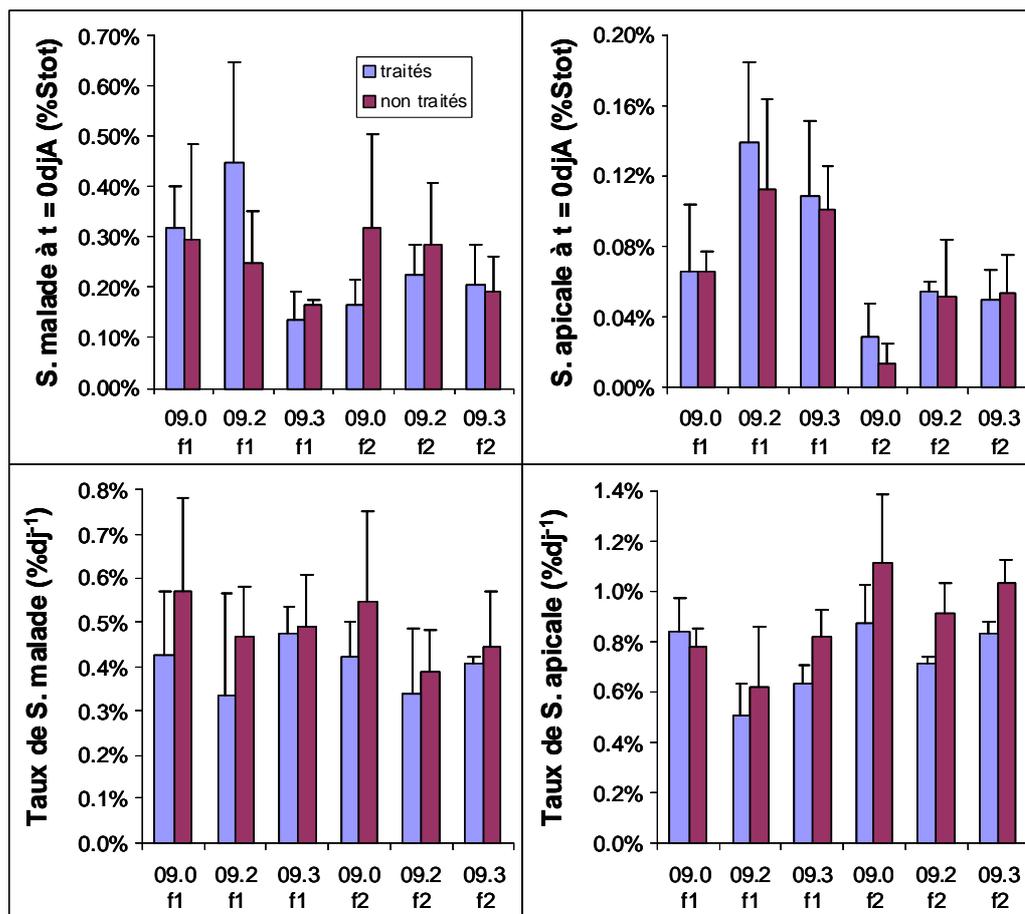


Figure 3-6: Paramètres (surface à l’anthèse et taux initial de croissance) obtenus par ajustements exponentiels de la surface malade (à gauche) et de la sénescence apicale (à droite) en 2009 par strate foliaire (F1 et F2) et par itinéraire technique (cf p.99). Moyennes et écart types pour trois répétitions pour chaque itinéraire technique.

Tableau 3-7: ANOVA multifactorielle des effets de l’étage foliaire (Str), des conduites agricoles (ITK) et des traitements fongicides (Fon) sur les paramètres des ajustements exponentiels des sénescences en 2009 (^mS₀: surface malade à l’anthèse, ^mR: taux initial de croissance de la maladie, ^aS₀: surface sénescente à l’anthèse, ^aR: taux initial de croissance de la sénescence apicale): * P < 1%; **: P < 10⁻³; ***: P < 10⁻⁴; NS: non significatif (P > 5%)

	S. malade		S. apicale	
	^m S ₀	Taux ^m R	^a S ₀	Taux ^a R
Str	**	NS	***	**
ITK	***	NS	*	*
Fon	NS	**	NS	*
Str × ITK	***	NS	NS	NS
Str × Fon	-	NS	NS	NS
ITK × Fon	**	-	NS	NS

B. inoculation au champ

Cette section s’intéresse aux plantes inoculées au pinceau dans la zone non traitée en 2009. On pourra comparer ces plantes à leurs voisines non inoculées bien que le traitement des images ait été très différent. Elles ne constituent cependant pas un vrai témoin, puisque la procédure d’inoculation pourrait influencer la sénescence par elle-même.

a. Données brutes

A une exception près, les chloroses sont apparues entre 240 et 450 djI, avec un effet marqué de l'étage foliaire ($P < 10^{-4}$), en interaction avec la conduite agricole ($P < 10^{-4}$). Sur les feuilles F1, les chloroses étaient notées plus tôt ($P < 10^{-4}$) sous 2009.0 que sous 2009.3 et étaient très tardives sous 2009.2 (médianes à 309, 362 et 412 djI respectivement). Sur les feuilles F2, le délai entre 2009.0 et 2009.2 n'était pas significatif, les chloroses étant significativement ($P < 10^{-4}$) plus tardives sous 2009.3 (médianes à 263, 279 et 318 djI respectivement). L'apparition des nécroses était très corrélée à celle des chloroses ($r^2 = 0,88$ en exprimant les deux dates en djI), avec une pente non significativement distincte de 1 ($P > 5\%$). Cependant le délai entre chlorose et nécrose était constant (2 ± 1 jour) sur les F1 et la plupart des F2, mais atteignait 3 ± 1 jour sur les F2 sous 2009.0 ($P < 10^{-4}$).

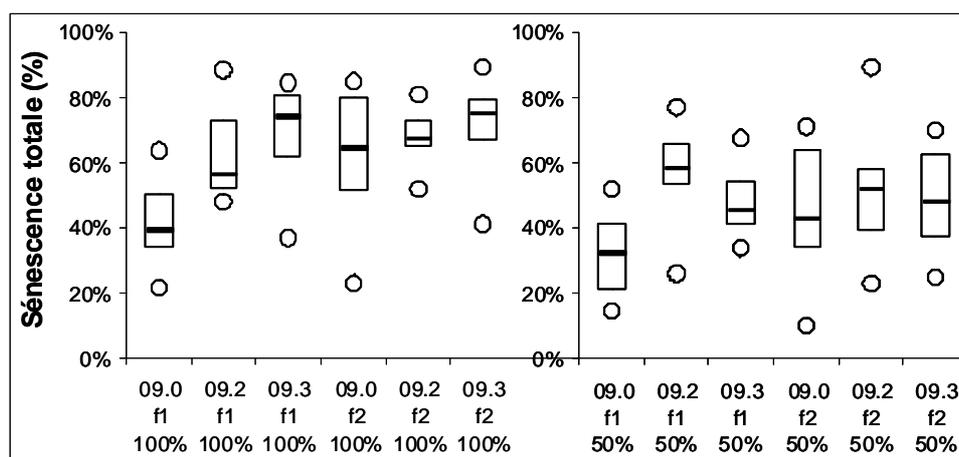


Figure 3-7: Sénescence totale (maladie + apicale) en pourcentage de surface totale au dernier point valide sur les feuilles (F1 et F2) inoculées en 2009 (les ITK sont décrits en p.99). Le cadre de gauche présente les feuilles inoculées en pleine largeur (100%) et celui de droite les feuilles inoculées en demi-largeur (50%). Représentation en Box plot: la médiane est repérée par un trait gras, la boîte représente l'intervalle entre 1^{er} et 3^{ème} quartile et les points extrêmes sont figurés par des cercles.

L'inoculation a ensuite déclenché une maladie concentrée vers la base de la feuille, ce qui a permis de suivre séparément surface malade et sénescence apicale jusqu'à un stade de sénescence totale nettement plus avancée qu'en épidémie naturelle (Figure 3-7). Au moment du dernier point valide (où les zones sénescentes sont clairement séparables), la médiane des sénescences (maladie + apicale) atteignait 60 à 75% pour les inoculations en pleine largeur et 40 à 60% pour les inoculations en demi-largeur. La seule exception étant les feuilles F1 sous 2009.0: sur ces feuilles très courtes, la limite entre surface malade et sénescence apicale était brouillée plus tôt.

Comme le développement de la septoriose était très variable entre les plantes inoculées, le dernier point valide a été observé entre 130 et 610 djA, donc à des degrés de sénescence naturelle très variable. La date d'inoculation étant différente entre modalités expérimentales, on peut aussi présenter le dernier point valide en dj après l'inoculation (djI), ce qui réduit un peu sa variabilité: de 380 à 760 djI. Les résultats de l'analyse de variance sur le dernier point valide ne changent pas avec l'unité utilisée: tout d'abord le mode d'inoculation n'a pas d'effet significatif ($P > 5\%$), et les données correspondantes ont été regroupées sur la figure 3-8. Ensuite on observe un effet de la conduite des cultures ($P < 10^{-3}$) et de l'étage foliaire ($P < 10^{-4}$). On retrouve notamment l'arrêt prématuré des observations pour les feuilles F1 sous 2009.0, mais aussi le fait que le dernier point intervient plus tard sous 2009.2 que sous 2009.3, et sur les feuilles F1 que sur les feuilles F2.

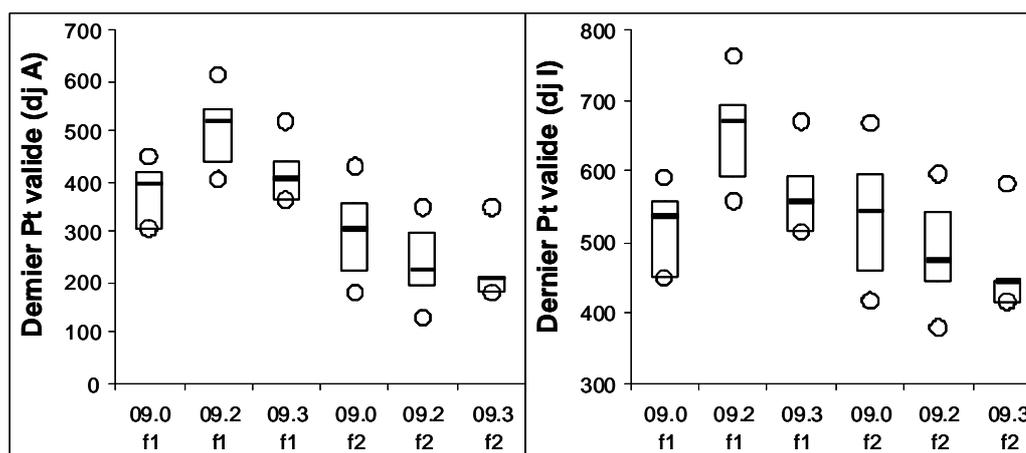


Figure 3-8: Temps au dernier point valide sur les feuilles (F1 et F2) inoculées en 2009 en degrés jours après anthèse (djA) à gauche et en degrés jours après inoculation (djI) à droite. Le mode d'inoculation n'ayant pas d'effet significatif, les données ont été regroupées par étage foliaire et par itinéraire technique (cf p.99). Représentation en Box plot comme pour la figure 7

Donc bien que l'inoculation ait entraîné un développement considérable de la maladie, la variabilité des conditions au moment du dernier point valide peut expliquer qu'aucune relation claire n'émerge entre les données brutes de surface malade et celles de sénescence apicale (Figure 3-9).

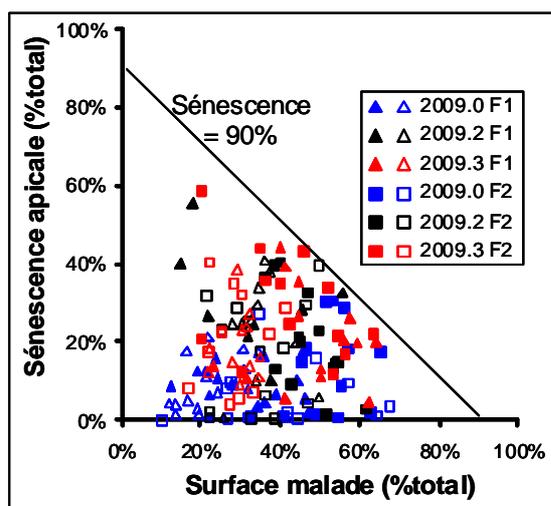


Figure 3-9: Surface malade et sénescence apicale en pourcentage de surface totale au dernier point valide en 2009. Les symboles pleins indiquent les données des feuilles inoculées en pleine largeur et les symboles vides celles des feuilles inoculées en demi-largeur. Les feuilles F1 sont représentées par des triangles et les F2 par des carrés. Le code couleur est le suivant: 2009.0: bleu, 2009.2: noir, 2009.3 rouge (les ITK sont décrits en p.99). La droite correspondant à 90% de surface sénescente a été indiquée.

Il faudrait reprendre cette figure pour chaque modalité expérimentale de manière à ce que toutes les plantes soient au même stade et aient été inoculées dans les mêmes conditions. On obtient alors de faibles corrélations ($r^2 \approx 0,3$) qui sont généralement peu significatives (Tableau 8). Quand elles le sont, leur pente, positive mais faible, ressemble à celle obtenue avec l'épidémie de 2008: il faudrait un quadruplement de la maladie pour un doublement de la sénescence apicale.

Tableau 3-8: Pente des relations constatées entre surface malade et sénescence apicale à différents moments après l'inoculation. On a regroupé les plantes inoculées en pleine ou demi-largeur. Le degré de signification est indiqué comme suit: en gras souligné $P < 1\%$; en gras $P < 5\%$; en italique $P < 10\%$; NS $P > 10\%$; nd non déterminé

		----- Période d'observation (dJI) -----					
		300-350	350-400	400-450	450-500	500-550	550-600
2009.0	Feuilles F1	NS	NS	NS	NS	0.277	nd
2009.0	Feuilles F2	NS	<i>0.113</i>	NS	NS	<i>0.247</i>	NS
2009.2	Feuilles F1	nd	nd	0.154	0.172	<i>0.353</i>	<i>0.077</i>
2009.2	Feuilles F2	0.280	<i>0.313</i>	NS	NS	NS	nd
2009.3	Feuilles F1	NS	NS	0.151	NS	NS	NS
2009.3	Feuilles F2	0.224	0.316	NS	NS	nd	nd

b. Cinétiques de sénescence

On va essayer d'aller plus loin en ajustant toutes les observations à des cinétiques de sénescence. Tout d'abord, on a recherché un ajustement pour les deux types de sénescence observés. Le tableau 3-9 rapporte les résultats obtenus pour la recherche du meilleur ajustement.

Tableau 3-9: Ajustement des surfaces sénescentes après inoculation en 2009 par étage foliaire, par conduite agricole et par mode d'inoculation. Deux types de modèles ont été testés pour la surface malade: soit exponentielle, soit logistique. Deux types de modèles ont été testés pour la sénescence apicale: soit exponentielle, soit constante puis exponentielle. L'astérisque (*) indique que les trois paramètres ajustés pour ce modèle font qu'il n'est pas différent de l'exponentielle (modèle à deux paramètres).

		$\Sigma djA / djI$ Dernier Pt	Nb de Pts	----- coefficients de corrélation r^2 -----			
				S. malade		S. apicale	
Feuilles F1				Expo	Logistique	Expo	Cte/Expo
2009.0	Inoc 100%	416 / 558	56	0.59	0.77	0.52	0.52*
2009.0	Inoc 50%	450 / 591	67	0.59	0.64	0.52	0.52
2009.2	Inoc 100%	611 / 764	41	0.07	0.14	0.55	0.57
2009.2	Inoc 50%	541 / 693	49	0.65	0.70	0.56	0.58
2009.3	Inoc 100%	518 / 671	60	0.46	0.48	0.33	0.34
2009.3	Inoc 50%	439 / 591	49	0.76	0.90	0.61	0.61*
Feuilles F2							
2009.0	Inoc 100%	400 / 638	71	0.46	0.65	0.44	0.44*
2009.0	Inoc 50%	431 / 669	64	0.31	0.50	0.65	0.65*
2009.2	Inoc 100%	296 / 545	52	0.54	0.63	0.38	0.38*
2009.2	Inoc 50%	296 / 545	63	0.51	0.62	0.48	0.49
2009.3	Inoc 100%	210 / 445	51	0.68	0.70	0.63	0.63*
2009.3	Inoc 50%	347 / 582	51	0.31	0.41	0.16	0.16*

Les ajustements sont plutôt meilleurs que ceux obtenus avec l'épidémie naturelle, et comme pour l'expérience en serre, la cinétique de la maladie s'adapte nettement mieux à une logistique qu'à une exponentielle. De plus, le point d'inflexion mT ajusté était toujours plus précoce, de 70 dj en moyenne, que le dernier point observé (donnée non présentée), ce qui traduit un amortissement visible de la courbe. La sénescence apicale s'adapte correctement à une exponentielle. Par contre l'introduction d'un délai est rejetée par l'ajustement dans la moitié des cas, et dans l'autre il améliore à peine le r^2 . On a donc retenu l'exponentielle simple pour ajuster la sénescence apicale.

c. Paramètres des ajustements

Les données ont ensuite été ajustées pour chaque individu (= feuille inoculée). Le problème est que le nombre de points valides par individu est faible (de 2 à 8, avec une moyenne de 4). Le nombre de degrés de liberté entraîne une faible signification des ajustements, voire l'impossibilité d'ajuster tous les paramètres. Le nombre d'individus utilisables par modalité expérimentale était de 13 en moyenne pour la sénescence apicale et de 9 pour la surface malade. Les ajustements obtenus présentaient des r^2 élevés ($> 0,9$ en moyenne), mais peu significatifs en raison du manque de degré de liberté. C'est pourquoi les analyses de variances présentées ci-dessous (Tableau 3-10) ont aussi été faites en excluant les ajustements de faible probabilité, ce qui ne changeait pas les conclusions. L'ajustement logistique fournit trois paramètres: un plateau mM (%Stot), un taux initial mR (% dj^{-1}) et un point d'inflexion mT . Ce dernier pouvant être exprimé en djA ou en djI , les deux analyses de variance ont été faites.

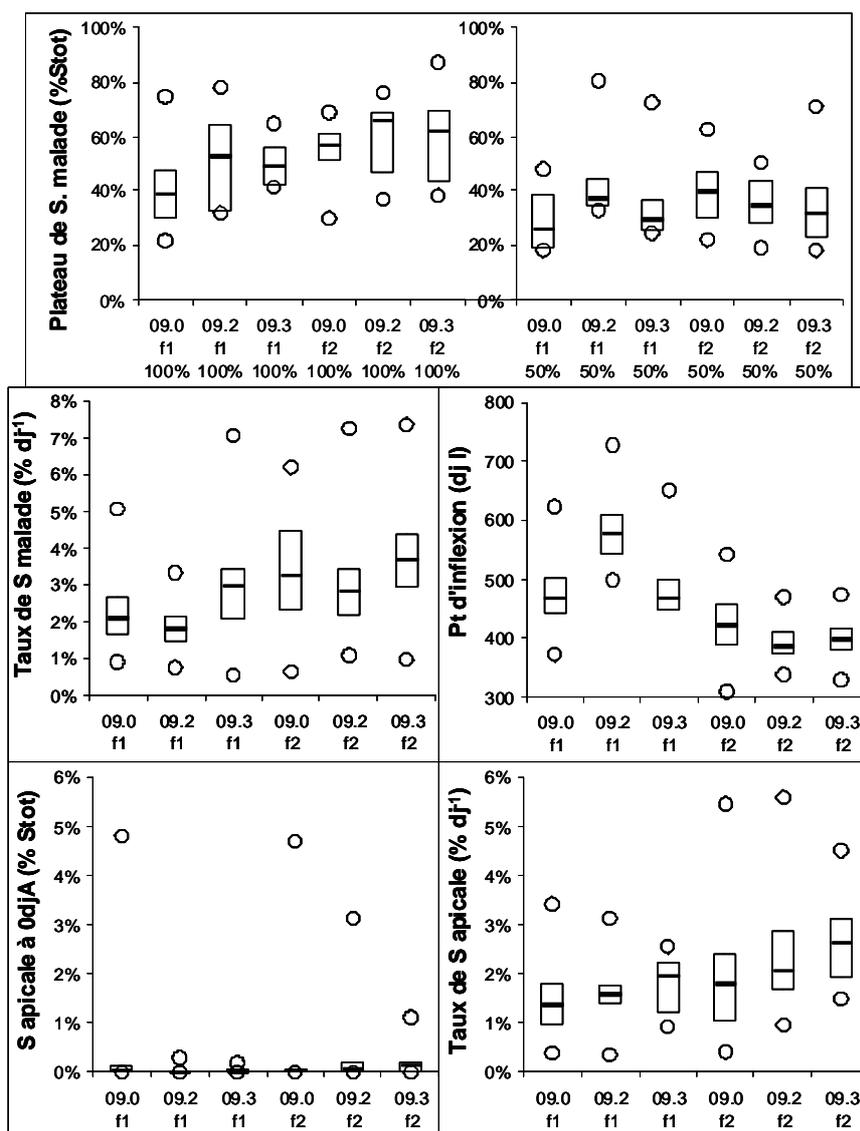


Figure 3-10: Paramètres obtenus par ajustement logistique de la surface malade (en haut) (plateau, taux initial de surface malade, et temps au point d'inflexion) et exponentiel de la sénescence apicale (en bas) (sénescence apicale à 0djA et taux initial de sénescence apicale) après inoculation en 2009. Le mode d'inoculation n'a d'effet significatif que pour le plateau de la surface malade, sinon les données ont été regroupées par étage foliaire et par itinéraire technique. Représentation en Box plot comme pour la figure 3-7

➤ Le plateau de la logistique mM est le seul paramètre pour lequel l'effet du mode d'inoculation est significatif ($P < 10^{-4}$): les feuilles inoculées en demi-largeur ont un mM plus petit que celle inoculées en pleine largeur. Ceci suggère que la maladie ne s'est étendue que sur une surface limitée autour de la zone inoculée, quoique supérieure à celle-ci. On notera qu'au dernier point valide, la maladie avait atteint environ 85% de la valeur de mM ; celui-ci était donc déterminé avec une meilleure précision que pour l'expérience en serre. Ni la conduite des cultures ni l'étage foliaire ne montrent d'influence sur mM . Ainsi la moindre sénescence observée au dernier point valide (figure 3-9) pour les feuilles F1 sous 2009.0 ne semble pas correspondre à un problème d'inoculation, mais à une maladie qui s'est développée trop lentement par rapport à la sénescence apicale. Le taux de croissance de la maladie mR était plus élevé sur les feuilles F2 ($P < 10^{-4}$) et moins sous 2009.2 que sous 2009.3 ($P < 1\%$). Les plantes cultivées sous 2009.0 présentaient un mR intermédiaire, non significativement différent des deux autres. Enfin l'analyse de variance appliquée au point d'inflexion mT donnait les mêmes résultats que celui-ci soit exprimé en djA ou en djI. Le point d'inflexion se produisait plus tard sur les feuilles F1 ($P < 10^{-4}$), et cela a compensé la différence de mR : les feuilles F1 étaient moins malades que les F2, c'est pour cela que le dernier point valide a été observé plus tard (Figure 3-8). Le point d'inflexion était aussi sensible à la conduite agricole ($P < 10^{-3}$ en djA, $P < 10^{-4}$ en djI), mais en interaction avec l'étage foliaire ($P < 10^{-4}$): il n'y avait pas d'effet sur les feuilles F2, par contre les feuilles F1 cultivées sous 2009.2 qui avaient un mR plus faible, avaient aussi un mT plus tardif. La maladie s'est donc développée lentement et tardivement dans ce cas. Le point d'inflexion était significativement corrélé à la date d'apparition des nécroses ($r^2 = 0,60$ en exprimant les deux dates en djI), le délai entre les deux étant significativement plus court de 25 dj sur les F2 que sur les F1 ($P < 10^{-3}$), et de 30 dj sous 2009.3 que sous les autres conduites agricoles ($P < 10^{-4}$). Il n'y avait pas d'interaction entre ces facteurs ($P > 5\%$), tandis qu'une l'interaction Str \times Inoc ($P < 5\%$) provenait de ce que les dates d'apparition des nécroses étant un peu plus dispersées après inoculation en demi-largeur, c'est seulement dans ce cas que l'effet de l'étage foliaire devenait significatif.

Tableau 3-10: ANOVA multifactorielle des effets de l'étage foliaire (Str), des conduites agricoles (ITK) et du mode d'inoculation (Inoc) sur les paramètres obtenus après inoculation en 2009 par l'ajustement logistique de la maladie: mM : plateau de la maladie, mR : taux initial de la maladie, mT : temps au point d'inflexion en degrés jours après anthesis (djA) ou en degrés jours après inoculation (djI) et l'ajustement exponentiel de la sénescence apicale: aS_0 : sénescence apicale à la floraison, aR : taux initial de la sénescence apicale. * $P < 1\%$; ** $P < 10^{-3}$; *** $P < 10^{-4}$; NS: non significatif ($P > 5\%$)

	----- S. malade -----				S. apicale	
	mM	mR	mT (djA)	mT (djI)	aS_0	aR
Str	NS	***	***	***	**	***
ITK	NS	*	**	***	NS	*
Inoc	***	NS	NS	NS	NS	NS
Str \times ITK	NS	NS	***	***	**	NS
Str \times Inoc	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ITK \times Inoc	NS	NS	NS	NS	NS	NS

➤ La sénescence apicale, sauf quelques cas particuliers, était très faible à la floraison. La médiane des aS_0 était de l'ordre de 0,04% de la surface foliaire, semblable à celle des plantes non inoculées (voir section précédente). L'analyse de variance indique que aS_0 est plus petite sur les feuilles F1 ($P < 10^{-3}$), sauf sous 2009.0 comme l'indique l'interaction Str \times ITK ($P < 10^{-3}$). Enfin le taux de la sénescence apicale aR était plus faible sur les feuilles F1 ($P < 10^{-4}$) et sous 2009.0 que sous 2009.3 ($P < 1\%$). Les plantes cultivées sous 2009.2 présentaient un aR

intermédiaire, non significativement différent des deux autres. Les taux aR atteints après inoculation étaient beaucoup plus élevés que ceux des plantes non inoculés (voir section précédente), cependant ils s'en rapprochaient quand la maladie était faible (Figure 3-11).

➤ Le taux de croissance de la sénescence apicale semble à peine affecté par celui de la maladie (Figure 3-11), et d'ailleurs aR n'admet pas mR comme covariable (donnée non figurée). Cependant le taux ne caractérise pas aussi bien une logistique qu'une exponentielle. Si on utilise la vitesse de la maladie au point d'inflexion ($V_{max} = ^mR \cdot ^mM / 4$), la corrélation reste faible, mais elle est très hautement significative ($P < 10^{-4}$).

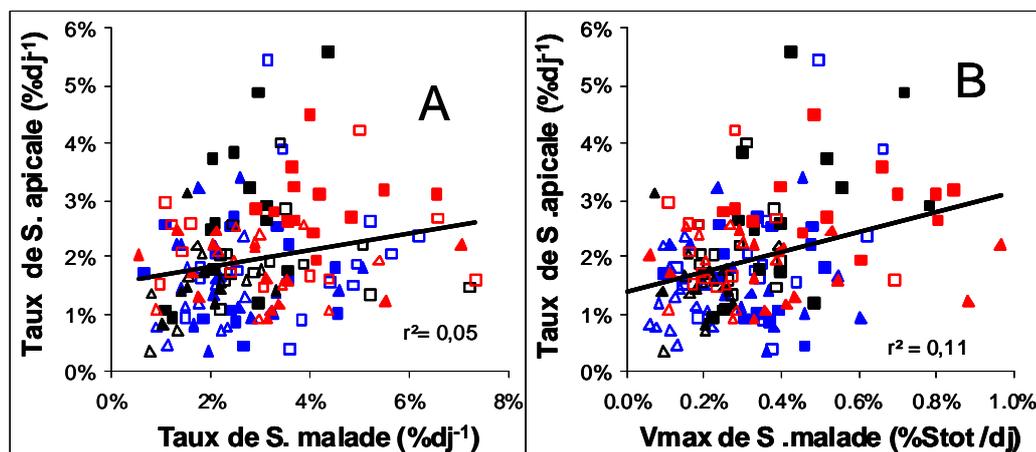


Figure 3-11: Corrélation entre la maladie et le taux exponentiel de la sénescence apicale aR après inoculation en 2009. La maladie est caractérisée par son taux de croissance logistique (A) ou par sa vitesse au point d'inflexion (B). Chaque point correspond à une répétition. Les symboles sont comme en figure 9.

Enfin, si l'on intègre la réduction des surfaces vertes sur toute la période de remplissage, on constate que l'inoculation a réduit celle-ci de 25% à 35% sur les F1, de 55% à 65% sur les F2, ce qui équivaut à une épidémie importante. Or, comme dans le cas de l'épidémie de 2008, on ne peut exclure que la maladie accélère la sénescence apicale, mais les corrélations et les pentes obtenues sont toujours si faibles qu'elles sont couvertes par le bruit expérimental sur les données brutes.

Discussion

L'expérimentation décrite dans ce chapitre visait deux objectifs: d'une part étudier l'effet des plantes et des couverts sur leur sensibilité à la maladie, et d'autre part extrapoler en extérieur au champ les résultats obtenus en conditions contrôlées en serre pour des sévérités de la septoriose plus fortes que celles générées en serre.

En 2008, les différentes conduites agricoles ont permis de créer une variation de la densité foliaire d'un facteur deux, et une légère variation de la teneur en azote foliaire. Dans les deux cas, c'était le mode 2008.3, avec une fertilisation précoce produisant un tallage surabondant, qui donnait les valeurs les plus élevées. Cependant l'épidémie n'était pas significativement différente selon la conduite agricole, ce qui confirme plutôt la bibliographie concluant au peu d'impact de la densité foliaire (Olesen *et al.*, 2003b). L'absence d'effet de l'étage foliaire est plus difficile à interpréter puisqu'on ne connaît pas l'état physiologique des différentes feuilles au moment où l'infection a eu lieu. En 2009, les différentes conduites agricoles conduisaient à des peuplements très différents, mais pas à une variation des teneurs azotées

foliaires. Comme il n'y a pas eu d'épidémie naturelle cette année-là, on n'a pas de confirmation des résultats de 2008. Le développement de maladies sur des plantes inoculées n'est *a priori* pas sensible à la facilitation de l'infection par la densité foliaire. Par contre l'impact microclimatique de la structure du peuplement (Savary *et al.*, 1995) pourrait encore agir sur le cycle épidémique une fois l'infection réalisée, et ce plus particulièrement sur les F2, qui sont au milieu du couvert. D'autre part, il n'y avait pas d'effet de la conduite agricole sur la teneur azotée des feuilles cette année-là. Par contre la teneur des F2 était nettement inférieure à celle des F1 au moment de l'inoculation, et les F2 sont beaucoup moins exposées aux forts rayonnements ou températures ponctuels. Or la maladie s'est développée significativement plus tard et plus lentement sur les F1, et pour celles-ci plus tard et plus lentement sous 2009.2. L'effet de la conduite agricole 2009.2 est difficile à interpréter; en effet ce peuplement est intermédiaire du point de vue densité et teneur azotée, et son effet n'est observé que pour la F1. Il pourrait s'agir d'un artefact dû à la réussite de l'inoculation dans ce cas. Or la zone finalement infectée est la même partout, mais est sensible à la taille de la zone inoculée. Cela suggère que la pénétration des spores a été comparable sur les plantes de toutes les parcelles, donc s'il y a eu un problème expérimental, il serait intervenu plus tard, peut-être le 22 Mai, dix jours après l'infection quand les plantes ont été bâchées en plein soleil. Ce jour-là toutes les plantes ont subi un stress (al-Khatib et Paulsen, 1984) de quelques minutes, mais qui n'était pas forcément homogène. La même remarque pourrait s'appliquer à la différence de développement des maladies sur les F1 en comparaison des F2. Ces feuilles étaient plus exposées et elles ont clairement été plus stressées le 22 Mai. Cependant d'autres explications pourraient aussi être avancées dans ce cas, concernant l'environnement microclimatique des F1, leur teneur azotée (Gate, 1995), mais aussi leur statut dans la plante (ce sont des feuilles plus éclairées, plus actives métaboliquement (Simpson *et al.*, 1983), plus soumises aux stress oxydatifs (Reynolds *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006). Notre observation justifie donc des études complémentaires.

Le deuxième point abordé par cette étude concernait l'influence du développement de la maladie sur la sénescence apicale. L'expérimentation en serre avait conclu à l'absence d'effet significatif, mais cette expérience restait critiquable pour deux raisons. D'abord un problème a été décelé sur les témoins, apparemment moins avancés en sénescence que les inoculés dès le jour du traitement. Si l'on n'avait pas tenu compte de ce défaut, on aurait conclu à un effet très significatif de l'inoculation sur la sénescence apicale; donc malgré nos arguments, il restait un doute. D'autre part, on avait cherché à ce que la maladie se développe lentement, et c'est ce qui est arrivé. Cependant la maladie a vraiment été très tardive, avec des points d'inflexion entre 800 et 1000 djI. Le résultat c'est que la maladie ne s'est que partiellement développée avant d'être rejointe par la sénescence apicale. Donc on pouvait objecter que l'absence d'effet soit due au stade trop précoce de la maladie. Il est en effet logique de supposer que plus la maladie se développe, plus elle est susceptible d'influencer la sénescence apicale. C'est un peu ce que décrit la bibliographie quand des inoculations massives provoquent une sénescence explosive (Robert, 2003). L'observation de l'épidémie naturelle en 2008 n'a pas permis de progresser sur ce point. En effet, la répartition aléatoire des sites d'infections faisait que le dernier point valide arrivait trop tôt avant que la maladie n'ait pu se développer. Par contre l'inoculation au champ en 2009 a été réalisée une année où l'épidémie naturelle était trop faible pour être gênante. La maladie s'est ensuite développée assez rapidement, avec des points d'inflexion entre 150 et 450 djI (400-600 djA) suffisamment précoces pour éclater la gamme de variabilité des sévérités au moment du dernier point valide. Malgré cela, et malgré une bonne gamme de conduites agricoles, on n'a pu observer que des effets assez limités pour être recouverts par le bruit expérimental entre plantes. Donc on pourrait considérer que les parties de la feuille non touchées par la maladie ne sont guère affectées par celle-ci. Cela conforte donc les résultats obtenus en 2007 (Ben Slimane *et al.*,

2009), où des interventions sévères (emballage ou ablation des F2 et F3) n'avaient provoqué aucune réaction de la part des autres feuilles.

Dans une perspective de modélisation de la nuisibilité de la septoriose, on pourrait raisonnablement négliger l'impact de la maladie sur le métabolisme général de la plante pour n'étudier que l'aspect de réduction des surfaces vertes autour des zones d'infection.

Références bibliographiques

- Al-Khatib K, Paulsen GM** (1984). Mode of high temperature injury to wheat during grain development. *Physiologia Plantarum* **61**: 363-368.
- Ben Slimane R, Bancal P, Bancal M-O** (2009). Regulation of grain nitrogen accumulation in wheat. In F Feldmann, DV Alford and C Furk (eds), Crop resistance to biotic and abiotic factors. Proceedings of the 3rd international symposium on plant protection and plant health in Europe Berlin, Germany, pp 198-208
- du Cheyron P, Moris P** (2010). Dossier variétés de blé tendre. *Perspectives Agricoles* **367**: 17-60.
- Gate P** (1995). Ecophysiologie du blé. T Doc./Lavoisier, (eds) 423 p
- Leitch MH, Jenkins PD** (1995). Influence of nitrogen on the development of *Septoria* epidemics in winter wheat. *The Journal of Agricultural Science* **124**: 361-368.
- Lovell D, Parker S, Hunter T, Royle D, Coker R** (1997). Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* **46**(1): 126-138.
- Olesen JE, Jorgensen LN, Petersen J, Mortensen JV** (2003). Effects of rates and timing of nitrogen fertilizer on disease control by fungicides in winter wheat.
1. Grain yield and foliar disease control. *Journal of Agricultural Science* **140**: 1-13.
- Olesen JE, Jorgensen LN, Petersen J, Mortensen JV** (2003). Effects of rates and timing of nitrogen fertilizer on disease control by fungicides in winter wheat.
2. Crop growth and disease development. *Journal of Agricultural Science* **140**: 15-29.
- Reynolds MP, Delgado B MI, Gutiérrez-Rodríguez M, Larqué-Saavedra A** (2000). Photosynthesis of wheat in a warm, irrigated environment: I: Genetic diversity and crop productivity. *Field Crops Research* **66**(1): 37-50.
- Robert C** (2003). Etude et modélisation du fonctionnement d'un couvert de blé attaqué par le complexe parasitaire *Puccinia triticina*- *Mycosphaerella graminicola*. Thèse de doctorat. INAPG, Paris. 135 p.
- Savary S, Castilla NP, Elazegui FA, McLaren CG, Ynalvez MA, Teng PS** (1995). Direct and indirect effects of nitrogen supply and disease source structure on rice sheath blight spread. *Phytopathology* **85**(9): 959-965.
- Simon MR, Cordo CA, Perpello AE, Struik PC** (2003). Influence of nitrogen on the susceptibility of wheat to *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology* **151**: 283-289.
- Simpson RJ, Lambers H, Dalling MJ** (1983). Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.)
- IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. *Plant Physiology* **71**: 7-14.
- Talukder ZI, McDonald AJS, Price AH** (2005). Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL × environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. *New Phytologist* **168**: 455-464.
- Tiedemann AV** (1995). Single and combined effects of nitrogen fertilization and ozone on fungal leaf diseases on wheat. *Journal of Plant Disease and Protection* **103**(4): 409-419.

Tompkins DK, Fowler DB, Wright AT (1993). Influence of agronomic practices on canopy microclimate and septoria development in no-till winter wheat produced in the Parkland region of Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Science* **73**(1): 331-344.

van Den Berg F, van Den Bosch F, Powers SJ, Shaw MW (2008). Apical leaf necrosis as a defence mechanism against pathogen attack: effects of high nutrient availability on onset and rate of necrosis. *Plant Pathology* **57**(6): 1009-1016.

Walters DR, Bingham IJ (2007). Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Annals of Applied Biology* **151**(3): 307-324.

Yang X, Chen X, Ge Q, Li B, Tong Y, Zhang A, Li Z, Kuang T, Lu C (2006). Tolerance of photosynthesis to photoinhibition, high temperature and drought stress in flag leaves of wheat: A comparison between a hybridization line and its parents grown under field conditions. *Plant Science* **171**(3): 389-397.

Chapitre 4

Métabolisme azoté et remplissage en azote des grains chez le blé d'hiver (*Triticum aestivum*) attaqué au champ par la septoriose foliaire (*Mycosphaerella graminicola*)

Introduction

Comme déjà souligné dans l'introduction bibliographique, les interactions azote × maladie sont largement documentées. Elles sont souvent abordées de deux points de vue: les effets de la fertilisation azotée sur le développement des champignons et les effets du développement du champignon sur le métabolisme azoté des organes attaqués; ces deux approches pouvant être menées de l'échelle de la molécule à celle de la parcelle.

Ainsi, de larges variations de fertilisation azotée se traduisent par de larges gammes d'indices foliaires, qui ont pour conséquence de favoriser un microclimat favorable à l'infection et à la propagation du champignon par contact (Savary *et al.*, 1995), mais également limiter l'énergie cinétique des pluies assurant le transfert de l'inoculum du sol vers le haut du couvert (Lovell *et al.*, 2004). La fertilisation azotée a pour deuxième conséquence de faire varier la teneur en azote foliaire, substrat nutritif pour le champignon en croissance dans les tissus (Solomon *et al.*, 2003; Divon *et al.*, 2007) et pour sa sporulation (Robert *et al.*, 2002; 2004a). Il existe donc une modulation importante du cycle des champignons phytopathogènes par la fertilisation azotée, dont le sens varie selon le type d'interaction avec la plante: les biotrophes et hémibiotrophes bénéficient d'une augmentation de la teneur azotée (Hoffland *et al.*, 2000) alors que les nécrotrophes ont des réponses à l'azote foliaire variables (Solomon *et al.*, 2003). Par ailleurs, la sénescence foliaire, souvent liée à la remobilisation de l'azote vers les grains en période reproductrice, est elle aussi modulée par la fertilisation azotée. Or cette sénescence progresse de l'apex vers la base d'une feuille en éliminant au fur et à mesure des sites déjà infectés et potentiellement infectables à de nouvelles infections par les agents pathogènes (Lers, 2007). Il en résulte des sévérités variables à l'échelle de la feuille, de la plante et de la parcelle, en fonction des modifications de microclimat, de phylloclimat et de substrat nutritif générés (Chelle, 2005). Cet aspect a été traité dans le chapitre III et ne sera pas repris ici.

De la même manière, les agents phytopathogènes modifient le métabolisme azoté de la plante (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008) à la manière de stress abiotiques (Pageau *et al.*, 2006). Des études sur l'expression des gènes impliqués dans le cas de la tomate infectée par *Cladosporium fulvum* (Pérez-García *et al.*, 1995, 1998) ou du haricot infecté par *Colletotrichum lindemuthianum* (Tavernier *et al.*, 2007) suggèrent qu'il y a une transition des activités d'assimilation de l'azote (NR, GS2, GOGAT) vers celles de remobilisation (GS1, GDH, Protéases). Dans le cas des champignons hémibiotrophes, cette transition peut être concomitante à l'entrée en phase nécrotrophe, qui correspond à un accès à une gamme plus grande de substrats azotés consommables par le champignon et se produirait lors d'une limitation en substrats azotés pour sa croissance (Tavernier *et al.*, 2007; Snoeijers *et al.*, 2000). Si cette transition est bien étudiée à l'échelle de la cellule ou de l'organe malade, son lien avec les bilans d'azote absorbé et remobilisé est loin d'être réalisé. Cependant, les études récentes de Kichey *et al.* (2006; 2007) ont tenté cette intégration pour rendre compte de la variabilité génétique existant dans l'acquisition et la répartition de l'azote chez le blé en cours de remplissage des grains. Ces auteurs proposent un certain nombre d'indicateurs physiologiques du fonctionnement azoté des plantes saines reposant sur l'activité d'enzymes impliqués dans le métabolisme azoté ainsi que sur les contenus en métabolites liés à ces mêmes activités. Une telle démarche n'a pas été menée à notre connaissance sur des plantes atteintes par des maladies foliaires, et c'est ce que nous allons faire.

En conditions naturelles, les effets sur les flux d'azote de la septoriose, maladie due au champignon phytopathogène hémibiotrophe *Mycosphaerella graminicola*, seront quantifiés et mis en relation avec les indicateurs du métabolisme azoté précédemment étudiés pour les plantes saines. Ils seront également reliés à la baisse de surface verte induite par cette maladie foliaire tardive. De plus, les résultats seront analysés à la lumière des résultats de l'essai de 2007 détaillé dans le chapitre I. Cet essai, réalisé sur plantes saines, a consisté en un emballage ou une ablation d'une partie des feuilles. En 2007, les expérimentations avaient été réalisées en l'absence d'absorption azotée tardive, permettant ainsi de mesurer finement les perturbations des flux de remobilisation des organes végétatifs vers le grain. En 2008, des conduites agricoles contrastées ont été choisies afin de générer des états contrastés des peuplements à la floraison, mais également afin de minimiser ou maximiser l'absorption d'azote post-floraison dans un souci d'extrapolation des résultats précédents. Les flux nets mesurés sont analysés à la lumière des variations temporelles des activités enzymatiques d'assimilation et de remobilisation de l'azote. Les conséquences en termes de modélisation des flux d'azote chez les plantes malades seront discutées.

Matériels et méthodes

L'expérimentation a pour objectif d'évaluer l'effet de la septoriose sur les déterminants du remplissage des grains en N, pour deux variétés de blé d'hiver (Soissons, Bastide) conduites à des fertilisations azotées contrastées. Des conduites agricoles (ITK) combinant des densités de semis et des dates d'apport d'azote différentes ont été choisies afin d'obtenir des structures de couvert à la floraison et des répartitions d'azote entre organes contrastées. Trois traitements fongicides contre la septoriose sur une moitié de l'essai permettent l'obtention de témoins sains pour chaque modalité, l'autre moitié restant non traitée contre la septoriose. Pour assurer une sévérité minimale de septoriose, une inoculation artificielle a été effectuée dans la partie non traitée par les fongicides.

1. Le matériel végétal

a. Caractérisation des variétés utilisées

Le classement variétal réalisé le CTPS puis modifié par Arvalis (tableau 4-1) montre les caractéristiques des deux variétés utilisées. Bastide et Soissons ont été choisis en raison d'une même précocité épiaison et montaison, pour synchroniser au mieux leur développement et donc leur phase de sensibilité à l'épidémie. Soissons est un peu plus résistant à la septoriose mais plus sensible à la rouille brune que Bastide, de manière à maximiser les chances d'observer un effet. Ces variétés présentent en outre une assez forte teneur en protéines vu leur rendement potentiel élevé. On peut donc s'attendre à des flux de carbone et d'azote importants.

Tableau 4-1: Caractéristiques des variétés Soissons et Bastide (de Cheyron et Morris, 2010)

Critères	Bastide	Soissons	Note CTPS modifiée Arvalis
Aptitude au Semis précoce	5	4	de 0, très précoce à 6, tardif
Alternativité	3,5	3	de 1, très hiver à 8, printemps
Précocité Epiaison	7	7	de 4, tardive à 8, très précoce
Précocité Montaison	4	4	de 0, ultra tardive à 6, très précoce
Teneur Protéique	4,5	5,5	de 1, très faible à 9, très élevée
Sensibilité R. brune	3	2	de 1, sensible à 9, résistant
Sensibilité R. jaune	7	6	de 1, sensible à 9, résistant
Sensibilité <i>S. nodorum</i>	6	5	de 1, sensible à 9, résistant
Sensibilité <i>S. tritici</i>	4	5	de 1, sensible à 9, résistant

b. Modalités expérimentales**Tableau 4-2:** Désignation des modalités expérimentales croisant deux variétés (Soissons et Bastide), trois conduites agricoles (2008.1, 2008.2 et 2008.3) et deux couvertures fongicide (Traité et Non Traité).

		2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	S1t	S2t	S3t
	Non Traité	S10	S20	S30
Bastide	Traité	B1t	B2t	B3t
	Non Traité	B10	B20	B30

La conduite agricole des essais a déjà été exposée en page 99 dans le chapitre III traitant des essais sur Soissons en 2008 et 2009; on indiquera juste ici la dénomination des modalités expérimentales (tableau 4-2)

c. Traitements phytosanitaires

Des traitements phytosanitaires de base ont été appliqués à l'échelle de toute la parcelle, notamment le traitement début montaison contre les maladies de pied (UNIX 0,8 kg/ha le 18 Avril), connues pour fortement perturber les flux d'azote dans la plante, et le traitement aux herbicides suivants: LEGACY DUO 2.4 L/ha, PRIMUS + ATLANTIC WG + HARMONY EXTRA + ACTRIOB B à 0,1 L/ha +0,4 kg/ha + 45 g/ha + 1 L/ha.

En ce qui concerne les maladies foliaires, chaque train est divisé en deux dans le sens de la longueur. Une moitié est traitée par les fongicides suivants INPUT PACK 0.8L+0.8 L/ha, SOLEIL 1,2 L/ha et OPUS TEAM 1,5 L/ha, essentiellement à base de triazoles, les strobilurines étant exclues en raison de leur rôle connu ou suspecté sur la durée de vie verte et le métabolisme azoté. L'autre moitié est restée non traitée, et dans celle-ci une zone de 20 m² a été inoculée artificiellement pour assurer la maladie comme détaillé dans le chapitre III. En fait cette inoculation n'a produit aucun effet visible par rapport à l'épidémie naturelle qui était nette cette année-là.

2. Les prélèvements et mesures réaliséesa. Prélèvements de placettes

A trois reprises pendant le remplissage, on a réalisé dans chaque parcelle un prélèvement de 5 rangs sur 50 cm de long, soit une surface de 0,44 m². Les plantes prélevées (cents à deux cents par placette) ont été fractionnées en maîtres brins et talles, et ces brins ont été comptés, pesés et séchés à l'étuve pour une estimation du nombre d'épis et de la matière sèche par m².

Auparavant on avait mis à part 15 maîtres brins moyens représentatifs de la placette d'après leur poids frais individuel égal au poids frais moyen des brins prélevés (pour le premier prélèvement à l'épiaison) ou d'après la longueur de leur épi (pour les autres prélèvements). Ces quinze brins ont ensuite été disséqués comme indiqué dans la section suivante.

A l'épiaison, la longueur de l'épi des brins moyens a été mesurée pour chaque conduite agricole et chaque variété (maïs sans différencier les zones traitée et non traitée de la parcelle). Sur la base des longueurs moyennes des épis mesurées à l'épiaison, 300 épis ont été marqués au champ pour chacune des modalités expérimentales.

b. Prélèvements de brins moyens

Des prélèvements de 30 brins marqués ont été réalisés toutes les semaines de la floraison à la fin du remplissage du grain. Quinze brins sur les 30 prélevés ont été conservés comme étant

les plus proches de la moyenne; ils ont été répartis en trois lots qui constituent les répétitions expérimentales et disséqués en épi, tige+gainnes et limbes (désignées comme ‘feuilles’ par facilité de langage). Les feuilles de chaque lot ont été scannées (format non compressé Tiff; 300 ppp; couleurs brutes) sur fond bleu. Puis les feuilles ont été réparties par étage foliaire numéroté de 1 à 5 en partant de la feuille drapeau. Deux des lots ont été directement séchés, tandis que les feuilles du troisième ont été coupées en tronçons de 1 cm pour en prélever un aliquote de 150 mg, qui a été conservé à -80°C en vue d'extractions enzymatiques. Le reste de l'échantillon a été congelé puis lyophilisé.

Après séchage, les gainnes ont été séparées des tiges, ainsi que les grains de la balle. Les grains ont ensuite été comptés, puis séchés à nouveau. Tous les échantillons secs ont ensuite été pesés. Après broyage, un aliquote compris entre 7 et 10 mg a été analysé pour déterminer l'azote total de chaque organe par méthode Dumas (1836).

c. Mesure des surfaces foliaires

Les surfaces vertes ont été quantifiées grâce au logiciel Assess (Lamari, L., 2002) qui à partir d'une mesure de la teinte de chaque pixel permet de distinguer les parties vertes ($101 < H < 171$) et sénescents ($31 < H < 101$) des feuilles du fond qu'on avait chois bleu pour un contraste maximal. Les pixels ainsi distingués ont été sommés par le logiciel, puis convertis en cm² d'après la résolution du scanner. Les surfaces vertes et sénescents ont ensuite été exprimées soit en cm², soit en % de la surface foliaire totale.

d. Mesure des activités enzymatiques liées au métabolisme azoté pendant le remplissage du grain

Les activités des nitrate réductase (NR), Glutamate déhydrogenase aminante (GDHa) et désaminante (GDHd), Glutamine synthetase (GS) et endoprotéases ont été mesurées dans les trois étages foliaires supérieurs de chaque modalité expérimentale, tant qu'ils restaient partiellement verts. L'extraction enzymatique a été réalisée à 4°C, après broyage sous azote liquide, en utilisant un tampon MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid). Les protocoles utilisés sont rapportés dans le chapitre I concernant l'expérimentation au champ de 2007. Les activités enzymatiques sont exprimées en nkat/feuille pour les NR, GDH et GS et en UA/feuille pour les endoprotéases

3. Traitement des données et analyses statistiques

a. Normalisation des données par le NGE

Une analyse de variance multifactorielle a été réalisée à partir du nombre de grains dans les échantillons prélevés tout au long du remplissage. Les conduites agricoles (ITK) ont eu un effet significatif ($P < 10^{-4}$) sur les nombre de grains par épi (NGE) avec $2008.1 < 2008.2 < 2008.3$. Il y avait aussi un effet variété (CV), le NGE étant plus important pour Bastide (de 52 à 75) que pour Soissons (de 46 à 55). On constate par ailleurs l'absence d'effet des fongicides (FON) pour la variété Soissons, alors que pour la variété Bastide les épis des brins non traités portaient 2 à 3 grains de plus que ceux des brins traités ($P < 10^{-3}$). Néanmoins, on ne constate pas d'évolution du NGE entre la floraison et la maturité ($P > 5\%$), suggérant l'absence d'effet des maladies sur la taille du puits épi. L'effet FON constaté résulterait soit d'un biais de sélection, soit d'une hétérogénéité de la parcelle.

Tableau 4-3: NGE moyen (moyenne \pm écart type) par modalité expérimentale (les ITK sont décrits en p.99)

CV:	FON:	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	47 \pm 2	50 \pm 2	54 \pm 4
	Non Traité	46 \pm 4	50 \pm 3	55 \pm 2
Bastide	Traité	52 \pm 3	65 \pm 4	74 \pm 4
	Non Traité	55 \pm 3	68 \pm 4	78 \pm 5

De petites variations de NGE entre dates de prélèvement sont par contre significatives pour chaque couple CV \times ITK. Afin de limiter le bruit lié à ces variations aléatoires d'échantillonnage entre dates de prélèvement, les résultats présentés ont été normalisés par le NGE moyen de chaque modalité expérimentale présenté dans le tableau ci-dessus.

b. Interpolations selon le temps depuis l'anthèse

La date de floraison a été déterminée par passages quotidiens dans la parcelle; elle variait légèrement entre variétés et conduites agricoles. En conséquence, on a réalisé des interpolations polynomiales d'ordre 4 des différentes mesures (biomasse et contenu en azote des différents organes) afin de pouvoir comparer les différentes modalités expérimentales aux mêmes sommes de températures depuis la floraison (djA), et aussi pour calculer des flux d'azote, lorsque les contenus n'évoluaient pas de façon linéaire.

Les cinétiques d'évolution des surfaces vertes n'ont pas été ajustées à une polynomiale, mais à une loi logistique inverse, dont l'équation est la suivante: $s = S / [1 + e^{r \cdot (T-t)}]$

Avec s , surface verte à l'instant t (en djA)

S , asymptote supérieure de la logistique (surface verte initiale)

r , taux de décroissance initial (à $t = -\infty$)

T , temps au point d'inflexion

On définira aussi D comme la durée entre 5% et 95% de sénescence; d'après l'équation de la logistique $D = -2 \cdot \ln(19)/r$ D est donc proportionnel à l'inverse de r . L'ajustement est répété trois fois pour chaque modalité expérimentale (une fois par lot). Les analyses statistiques seront effectuées sur ces quatre paramètres (S , r , T , D).

c. Calcul de l'efficacité d'utilisation de la lumière (RUE)

L'interception efficace de la lumière RIE a été calculée à chaque instant t et pour chaque étage foliaire i selon Bancal *et al.* (2007):

$$RIE_i(t) = \sum_{i=0}^{i=t} \left\{ \sum_{j=0}^{j=i-1} [\exp(-k \times LAI_j)] - \sum_{j=0}^{j=i} [\exp(-k \times LAI_j)] \times \frac{GLAI_i(t)}{LAI_i} \right\}$$

où k est la constante d'interception selon la loi de Beer Lambert, LAI_j représente l'indice de l'étage foliaire j en m^2/m^2 , et $GLAI_j(t)$ son indice vert en m^2/m^2 à l'instant t .

Cette formule revient à appliquer la loi de Beer Lambert à chaque étage foliaire en considérant (1) que le rayonnement incident chaque étage est celui qui n'a pas été intercepté par les étages supérieurs et (2) que l'interception efficace par cet étage est le produit de son interception physique et de son % vert.

Concrètement, le rapport $GLAI_j(t)/LAI_j$ est donné par l'ajustement logistique du % de vert de l'étage foliaire j . On calcule donc pour chaque jour RIE(t), puis le PAR (rayonnement photosynthétiquement actif) absorbé ce jour d'après les données météorologiques de rayonnement quotidien. Il ne reste plus qu'à cumuler ce résultat depuis la floraison jusqu'à chaque jour de prélèvement. On obtient alors une relation dont l'abscisse est un cumul de PAR absorbé et l'ordonnée une MS des parties aériennes rapportée au m^2 . La pente de cette relation est l'efficacité d'utilisation de la lumière (RUE) qui estime la quantité de MS que la culture photosynthétise par unité de PAR absorbé dans les parties vertes des feuilles.

d. Analyse statistique

Des analyses de variance à 3 facteurs (CV, ITK, FON) ont été réalisées date par date sur le flux d’N dans tous les organes en mg/brin (StatGraphics3: Manugistics, Inc., Maryland, USA). Dans le cas des activités enzymatiques, des analyses de variance à 4 facteurs ont été réalisées en incluant les dates de prélèvement. Des analyses de variance supplémentaires ont été réalisées sur les activités enzymatiques et sur le contenu en protéines en fonction de la date du changement de l’allure des cinétiques du flux d’N des feuilles saines et malades, divisant ainsi la cinétique en deux parties.

Résultats

Généralités

- L’indice de nutrition azoté mesuré à l’épiaison permet une caractérisation de l’effet des traitements azotés et variétaux en début de remplissage du grain. Les valeurs obtenues sont les suivantes (tableau 4-4):

Tableau 4-4: INN à l’épiaison (moyenne \pm écart type) par modalité expérimentale (les ITK sont décrits en p.99)

CV:	FON:	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	0,76 \pm 0,01	0,76 \pm 0,02	1,10 \pm 0,02
	Non Traité	nd	nd	nd
Bastide	Traité	0,77 \pm 0,04	0,88 \pm 0,01	1,05 \pm 0,08
	Non Traité	nd	nd	nd

Une analyse de variance à 2 facteurs CV et ITK met en évidence l’effet des conduites agricoles ($P < 10^{-4}$), avec le classement suivant des ITK: 08.1 < 08.2 < 08.3. Une interaction significative CV \times ITK est également trouvée ($P < 1\%$): les ITK 08.1 et 08.2 ne sont différents que chez Bastide. Par contre il n’y avait pas de différence variétale significative pour l’INN à épiaison ($P > 5\%$). En conséquence, les résultats seront dans la suite discutés pour les deux variétés, mais figurés préférentiellement pour la variété Soissons. On comparera d’une part l’effet des ITK pour les plantes traitées (S1t, S2t, S3t), d’autre part l’effet des maladies pour un ITK (S3t, S30).

- Les résultats ci-dessous sont rapportés au brin moyen; néanmoins on devra se reporter au m² pour les mesures de GLAI et pour calculer le rayonnement intercepté pendant le remplissage du grain. Or l’étude du nombre de brins moyens /m² a indiqué que celui-ci évoluait au cours du temps, la régression des talles n’étant pas terminée à l’épiaison, ce dont on a tenu compte en interpolant le résultat des trois prélèvements placette pour chaque date de prélèvement brin.

1. Etat des capteurs photosynthétiques

a. Cinétique des surfaces vertes totales

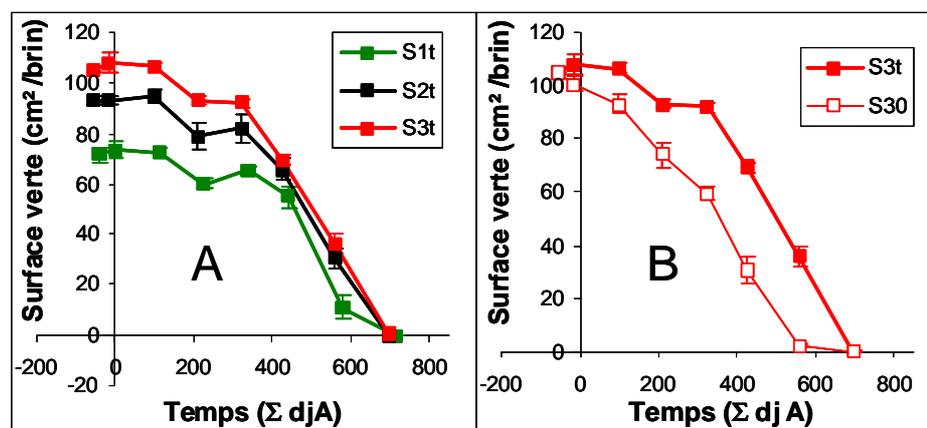


Figure 4-1: Evolution des surfaces vertes, en cm²/brin, chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B) en fonction du temps thermique en degrés jours post anthèse (ΣdjA). Chaque point représente la moyenne et l'écart-type de trois répétitions. Le code couleur des ITK est le suivant: 2008.1: vert, 2008.2: noir, 2008.3 rouge (les ITK sont décrits en p.99). Les symboles pleins indiquent les données des parcelles traitées et les symboles vides celles des parcelles non traitées.

L'évolution des surfaces vertes a été mesurée jusqu'à 710 djA, date à laquelle les dernières feuilles ont tourné au jaune. La figure 4-1 montre des évolutions de la surface verte totale par brin exprimée en cm²/brin et en pourcentage de la surface totale pour la variété Soissons. Ces évolutions peuvent être ajustées à des logistiques décroissantes, sur les paramètres desquelles on a réalisé des analyses de variance. Les moyennes et écart-types obtenus par les ajustements logistique de la surface verte (cm² /brin) selon les différentes modalités expérimentales sont présentées en annexe XIII.

Tableau 4-5: ANOVA multifactorielle des effets de la variété (Cv), des conduites agricoles (ITK) et des fongicides (Fon) sur les paramètres obtenus par ajustement logistique de la surface verte par brin (S: surface verte maximale, T: temps au point d'inflexion, r: taux initial de décroissance, D = $-2\text{Ln}(19)/r$: durée de décroissance): *** $P < 10^{-4}$; ** $P < 10^{-3}$; * $P < 1\%$; NS: non significatif ($P > 5\%$)

	S	T	r	D
CV	***	***	NS	-
ITK	***	***	***	***
Fon	*	***	-	-
CV × ITK	**	NS	NS	NS
CV × Fon	NS	-	NS	NS
ITK × Fon	NS	-	NS	NS

- Le paramètre S indique la surface verte maximale qui à peu de chose près est celle observée à la floraison L'effet le plus marquant est celui des conduites agricoles ($P < 10^{-4}$) avec $08.1 < 08.2 < 08.3$, la surface par brin étant augmentée de près de 50% entre le premier et le dernier. Un effet variétal léger mais très significatif est également mis en évidence ($P < 10^{-4}$), la surface moyenne par brin à la floraison est plus forte de 7% pour Bastide que pour Soissons. L'interaction ITK × CV ($P < 10^{-3}$) vient de ce que Bastide répond plus fortement au traitement 08.2 que Soissons, mais le classement entre ITK reste le même. Enfin un effet FON significatif ($P < 1\%$) de 5% a été observé; il indique un

début de maladie dès la floraison. Si l'on exprime la surface verte en pourcentage de la surface totale, on constate que les feuilles 1 et 2 ne sont pas encore atteintes, et que l'effet n'est net que sur les feuilles 4 et 5 (donnée non figurée).

- Le paramètre T, temps au point d'inflexion de la sigmoïde, caractérise le mieux l'effet des fongicides. Un effet très significatif ($P < 10^{-4}$) est mis en évidence pour les facteurs variété (Bastide < Soissons), ITK (08.3 < 08.2 = 08.1) et fongicide (NT < T); mais alors que les effets ITK et variété restent inférieurs à 60 dj, l'effet des fongicides est supérieur à 100 dj. Une interaction ITK × Fon faiblement significative ($P < 5\%$) montre que les différences entre ITK sont plus importantes en l'absence de fongicide.
- Enfin les paramètres r (taux initial de décroissance) et D (durée de décroissance) sont moins bien ajustés et répondent surtout à l'ITK. L'effet très significatif de la conduite agricole ($P < 10^{-4}$) est le même que pour la surface verte maximale avec 08.1 < 08.2 < 08.3. Les autres effets observés sont à peine significatifs ($P < 5\%$): la durée de sénescence est plus courte chez Soissons et chez les plantes traitées: en présence de maladie la sénescence commence donc nettement plus tôt, mais dure un peu plus longtemps.

b. Sénescence des différents étages foliaires

Les cinétiques de diminution du pourcentage de surface verte ont ensuite été analysées pour les trois dernières feuilles, et en particulier l'effet des traitements sur le point d'inflexion de chacune des feuilles (Tableau 4-6).

Les traitements ont des effets différents avec l'étage foliaire. Dans le cas de la feuille 1, primordiale dans le remplissage du grain, aucun effet de la variété n'a été trouvé. On met par contre en évidence un effet significatif des ITK et fongicides ($P < 10^{-4}$). L'effet des ITK reste faible (40 dj au maximum; 08.3 < 08.2 = 08.1) par rapport à celui du fongicide, qui varie de 70 à 140 dj. Une interaction significative CV × FON montre par ailleurs que l'anticipation de la sénescence entre brins traités et non traités est plus importante chez Soissons que chez Bastide, différence qui varie de 10 à 40 dj. Enfin, on constate également une interaction significative ITK × FON: l'effet de l'ITK ne s'exprime que chez les brins traités.

Tableau 4-6: Point d'inflexion en degrés jours après anthèse (djA) des trois feuilles supérieures par modalité expérimentale (ITK en colonne, variété et traitement fongicide en lignes). Les ITK sont décrits en p.99. Moyenne ± écart type de trois ajustements.

		2008.1	2008.2	2008.3
Feuille F1				
Soissons	Traité	563 ± 18	586 ± 5	591 ± 11
	Non Traité	456 ± 7	460 ± 11	456 ± 11
Bastide	Traité	531 ± 11	588 ± 20	579 ± 15
	Non Traité	463 ± 12	472 ± 4	460 ± 2
Feuille F2				
Soissons	Traité	527 ± 16	561 ± 28	511 ± 12
	Non Traité	406 ± 8	470 ± 13	363 ± 8
Bastide	Traité	495 ± 19	516 ± 22	474 ± 7
	Non Traité	378 ± 7	368 ± 5	341 ± 5
Feuille F3				
Soissons	Traité	488 ± 13	471 ± 29	381 ± 15
	Non Traité	366 ± 6	367 ± 24	258 ± 14
Bastide	Traité	379 ± 7	412 ± 4	350 ± 13
	Non Traité	293 ± 51	277 ± 12	124 ± 16

Les feuilles 2 et 3 montrent un comportement similaire entre elles, avec un effet très significatif ($P < 10^{-4}$) de tous les facteurs. Les effets variété et fongicide sont les mêmes que pour la feuille drapeau, mais l'effet ITK est différent avec une perte de surface verte nettement plus précoce sous 2008.3 que sous les deux autres conduites agricoles. Si les effets variété et ITK restent faibles dans le cas de la feuille 2 (de 15 à 45 dj) devant ceux des fongicides (de 120 à 150 dj), ce n'est plus le cas pour la feuille 3 où les différents effets sont du même ordre. Enfin, pour cette feuille 3, des interactions Cv \times FON et ITK \times FON ont été trouvées, avec un sens de variation inverse à celui précédemment montré pour la feuille 1: les effets Cv et ITK ne s'expriment pas chez les brins traités.

En conclusion, les modalités expérimentales ont permis de générer une variabilité des cinétiques de surface verte totale par brin, mais également entre feuilles d'un même brin. L'effet des fongicides est supérieur à celui des variétés et ITK, tant au niveau de la plante qu'à celui de la feuille. Les interactions entre facteurs permettent d'augmenter la gamme d'évolution des surfaces vertes en période post-floraison.

c. Chlorophylle des feuilles

Le contenu en chlorophylle des feuilles est la mesure de référence de la sénescence dans la littérature. Or on constate une corrélation serrée ($R^2 = 0,9$) entre la surface verte et le contenu en chlorophylle pendant le remplissage (Figure 4-2A). Il n'y a pas d'effet significatif ($P > 5\%$) de la variété, de l'ITK ou des fongicides ni sur la pente ni sur l'ordonnée à l'origine de cette relation. L'ordonnée à l'origine n'est d'ailleurs pas significativement différente de zéro ($P > 5\%$), et il y a donc proportionnalité entre chlorophylle et surface verte au niveau du brin pendant tout le remplissage, avec un rapport de $30,8 \pm 0,7$ cm² vert /mg de chlorophylle. La surface verte est également très corrélée à l'azote des feuilles (Figure 4-2B), mais la relation est non linéaire et ne passe pas par l'origine. De plus le résidu d'azote varie entre feuilles traitées ou non.

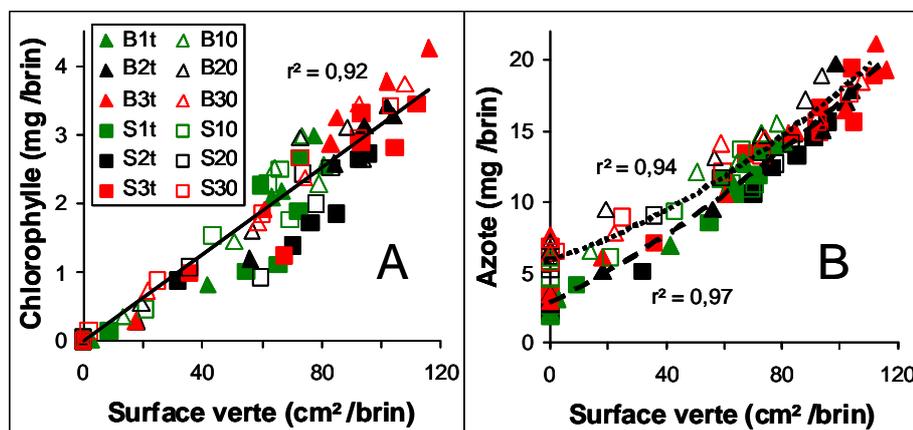


Figure 4-2: Corrélation obtenues en 2008 entre surface verte (cm² /brin) et chlorophylle (mg/brin) (A), ou contenu en azote (mg/brin) (B). Le code couleur des ITK est le suivant: 2008.1: vert, 2008.2: noir, 2008.3 rouge. Les ITK sont décrits en p.99. Les symboles pleins (moyenne et écart-types pour trois répétitions) indiquent les données des parcelles traitées et les symboles vides celles des parcelles non traitées. La variété Soissons est représentée par des carrés et Bastide par des triangles. Lorsqu'une seule corrélation est obtenue pour tous les points, elle est en trait plein. Lorsque deux corrélations sont obtenues, les brins traités sont en tirets et les non traités en pointillés.

2. Effet des traitements sur les cinétiques de matière sèche

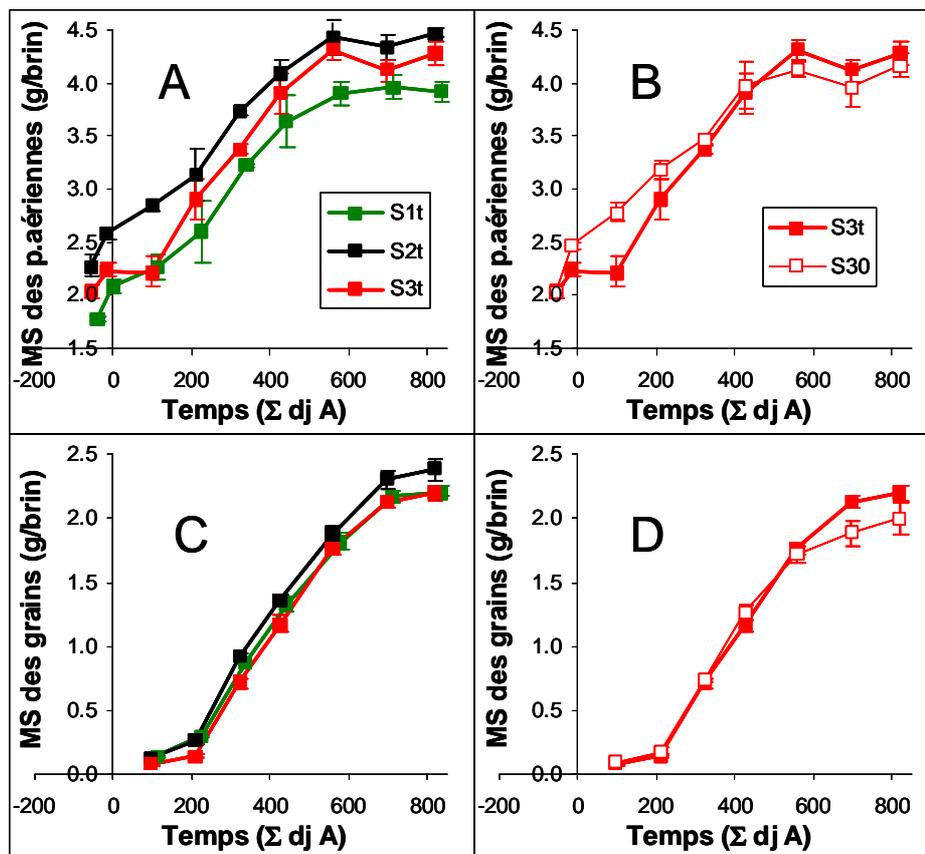


Figure 4-3: Evolution de la MS en g/brin des parties aériennes (A, B) et des grains (C, D) en fonction du temps thermique en degrés jours post anthèse (ΣdjA) chez Soissons selon l'ITK traité (A, C) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B, D). Chaque point (symboles comme en figure 4-1) représente la moyenne et l'écart-type de trois répétitions normalisées par le NGE.

L'évolution de la matière sèche (MS) des parties aériennes et des grains a été mesurée de l'épiaison à la pleine maturité pour l'ensemble des traitements (Figure 4-3). On a ensuite calculé des vitesses sur la phase de croissance linéaire, respectivement entre 0 et 600 djA et 200 à 550 djA. Des analyses de variances multifactorielles ont ensuite été effectuées sur les MS finales et les vitesses. Les effets des variétés et conduites agricoles, puis ceux des fongicides seront analysés successivement.

a. Effets de la variété et de la conduite agricole

La variété a toujours un effet très significatif ($P < 10^{-4}$) sur la MS des parties aériennes (MSa) et des grains (MSg), Bastide conduisant systématiquement à des valeurs finales plus élevées de 0,5 à 1,5 g/brin que Soissons. De la même manière, les ITK ont généré des différences significatives ($P < 10^{-4}$) de MSa et MSg, mais avec une gamme de variation plus faible (0,2 à 1,3 et 0,1 à 0,7 g/brin pour MSa et MSg respectivement). La MSa est plus faible sous 08.1 que sous 08.3 et 08.2, sans qu'il y ait de différence significative entre ces deux ITK. Le classement des ITK est le même pour la MSg, mais tous les trois sont significativement différents du moins chez Bastide (il y a une interaction $Cv \times ITK$: $P < 10^{-3}$).

Tableau 4-7: Vitesse de croissance en MS ($\text{mg}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$) des parties aériennes et des grains pendant la phase linéaire par modalité expérimentale (ITK en colonne, variété et traitement fongicide en lignes). Les ITK sont décrits en p.99. Moyenne \pm écart type de trois ajustements

CV:	FON:	V_{MS} p. aériennes ($\text{mg}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$)			V_{MS} grains ($\text{mg}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$)		
		2008.1	2008.2	2008.3	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	3,46 \pm 0,38	3,39 \pm 0,36	4,00 \pm 0,27	4,36 \pm 0,29	4,55 \pm 0,30	4,92 \pm 0,39
	Non Traité	2,90 \pm 0,27	3,40 \pm 0,47	3,04 \pm 0,12	4,34 \pm 0,04	4,41 \pm 0,10	4,49 \pm 0,04
Bastide	Traité	3,92 \pm 0,14	5,02 \pm 0,15	4,00 \pm 0,36	4,91 \pm 0,60	5,63 \pm 0,38	5,06 \pm 0,58
	Non Traité	2,80 \pm 0,27	3,79 \pm 0,21	3,75 \pm 0,40	4,47 \pm 0,05	5,63 \pm 0,57	5,92 \pm 0,25

Les vitesses de croissance de MSa et MSg indiquent les mêmes effets (Tableau 4-7). La variété et les ITK ont donc affecté la photosynthèse nette par brin et la vitesse de remplissage des grains. D'autre part, on a calculé l'absorption de la lumière par les parties vertes des différents étages foliaires (voir en matériel et méthodes). On peut donc représenter l'évolution de MSa en fonction du PAR absorbé par le brin pendant la période de remplissage du grain (figure 4-4). La pente de ces courbes permet d'estimer l'efficacité biologique de conversion ou RUE. Les valeurs moyennes obtenues varient de 3,1 à 3,2 g/MJ sans aucun effet significatif de la variété ou de l'ITK ($P > 5\%$).

b. Effets des fongicides

Malgré l'allure chahutée des courbes de MSa (figure 4-3), on voit que la MS finale est toujours plus faible ($P < 10^{-4}$) chez les plantes non traitées sauf Bastide sous 2008.3. La différence finale (de l'ordre de 0,2 g/brin) semble s'établir progressivement, ce qui suggère une baisse d'assimilation nette de 0 à 1,2 $\text{mg}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$. La figure 4-4 suggère que la relation entre MSa et le cumul de PAR absorbé post-floraison n'est pas modifiée: l'effet des fongicides joue sur l'abscisse (cumul de PAR absorbé) plus que sur la pente (RUE). La comparaison statistique des pentes de régression pour l'ensemble des données montre l'absence d'effet fongicide sur la RUE ($P > 5\%$); ainsi la RUE est en moyenne de $3,2 \pm 0,4$ g/MJ pour l'ensemble des traitements. La photosynthèse des parties vertes n'est donc pas affectée chez les brins non traités. Enfin, aucune interaction entre fongicide et variété ou ITK n'a été mise en évidence ($P > 5\%$).

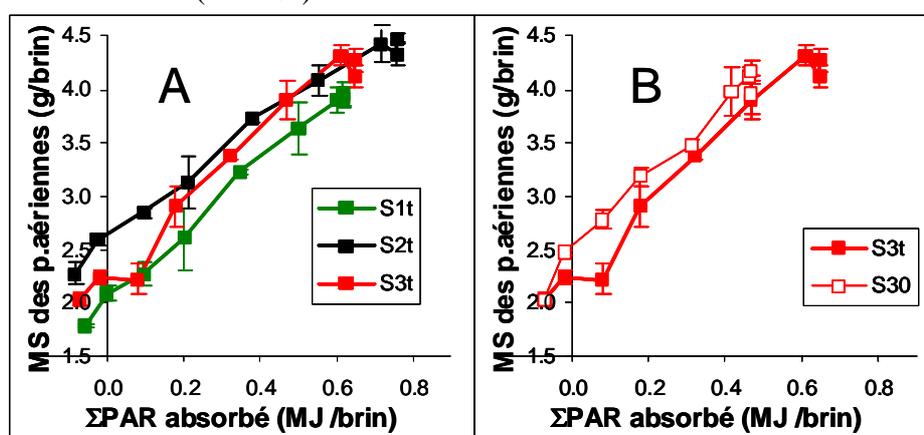


Figure 4-4: Evolution de la MS des parties aériennes (g/brin) en fonction du rayonnement photosynthétiquement actif intercepté (MJ/brin) chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B). Chaque point (symboles comme en figure 4-1) représente la moyenne et l'écart-type de trois répétitions normalisées par le NGE.

La MSg finale est significativement ($P < 10^{-4}$) plus élevée chez les brins traités aux fongicides, sauf chez Bastide sous 2008.3. Dans les autres modalités expérimentales la différence entre traités et non traités varie de 0,2 à 0,4 g/brin, soit le déficit d'accumulation dans les parties aériennes. Or la MSg augmente linéairement de 200 à 550 djA, mais les régressions linéaires entre ces deux dates montrent que la vitesse de remplissage du grain n'est pas significativement affectée par les fongicides ($P > 5\%$). Ceci suggère que le remplissage du grain est écourté chez les brins non traités, mais que le flux de MS s'est maintenu auparavant en utilisant les réserves de la plante. Cela n'est pas très net sur les données de MS des parties végétatives (données non figurées) à cause du bruit expérimental. Il serait intéressant d'effectuer un dosage de sucres sur ces échantillons.

3. Effet des traitements sur les cinétiques d'azote

a. Azote des parties aériennes et absorption post floraison

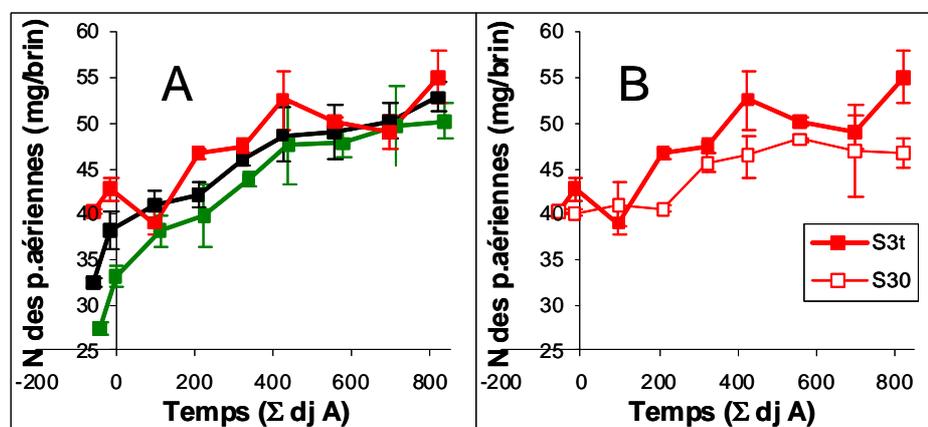


Figure 4-5: Evolution de l'azote total (mg /brin) des parties aériennes chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B) en fonction du temps thermique en degrés jours post anthèse (ΣdjA). Chaque point (symboles comme en figure 4-1) représente la moyenne et l'écart-type de trois répétitions normalisées par le NGE.

Dès l'épiaison, les brins de la variété Bastide sont moins nombreux et plus gros que ceux de la variété Soissons, donc l'azote de leurs parties aériennes (N_a) est plus important. D'autre part la dernière fertilisation a été importante et tardive sous les ITK 2008.1 et 2008.2, aussi les brins concernés montrent une augmentation importante de N_a jusqu'à la floraison et même au-delà tandis que les brins sous 2008.3, plus riches en N au départ, sont plus stables ensuite (figure 4-5). Si l'on considère les ajustements polynomiaux obtenus sur N_a , on remarque que le bilan entre 0 et 800 djA est significativement ($P < 10^{-3}$) plus faible sous 2008.3 que sous les autres ITK. La différence entre variété est beaucoup moins nette (Bastide < Soissons; $P < 5\%$) En confondant toutes les variétés et ITK, les brins non traités ont absorbé 2,3 mg de moins que les traités. Mais la mesure est imprécise et l'effet des fongicides n'est significatif ($P < 5\%$) que sous l'ITK 2008.1: c'est seulement dans ce cas qu'on est sûr que les plantes non traitées absorbent moins d'azote. Comme l'absorption évolue de façon non linéaire pendant le remplissage, on a calculé sa vitesse moyenne sur deux périodes: de 0 à 200 djA, puis de 200 à 800 djA (tableau 4-8).

Tableau 4-8: Vitesse d'absorption d'azote ($\mu\text{g}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$) par les parties aériennes selon la période pour chaque modalité expérimentale (ITK en colonne, variété et traitement fongicide en lignes). Les ITK sont décrits en p.99. Moyenne \pm écart type de trois ajustements

CV:	FON:	dNa/dt 0-200 djA ($\mu\text{g}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$)			dNa/dt 200-800 djA ($\mu\text{g}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$)		
		2008.1	2008.2	2008.3	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	45 \pm 8	33 \pm 1	21 \pm 3	16 \pm 10	12 \pm 3	11 \pm 2
	Non Traité	42 \pm 2	37 \pm 12	10 \pm 2	8 \pm 0	13 \pm 6	10 \pm 4
Bastide	Traité	41 \pm 11	43 \pm 3	23 \pm 12	11 \pm 6	8 \pm 2	5 \pm 4
	Non Traité	41 \pm 8	46 \pm 5	28 \pm 16	1 \pm 4	5 \pm 6	4 \pm 7

On vérifie bien que la vitesse d'absorption pendant la première période étant beaucoup plus importante que pendant la seconde, l'absorption cumulée de 0 à 200 djA représente entre un tiers et la moitié du total chez les brins traités. L'effet de l'ITK n'est significatif ($P < 10^{-4}$) que pendant la première période, le temps que l'azote apporté à la troisième fertilisation soit absorbé. Par contre l'effet de la variété ($P < 1\%$) et celui des fongicides ($P < 5\%$), ne sont clairs que pendant la seconde période. Cela suggère que la maladie quand elle s'installe nuit à l'absorption d'azote.

b. Azote des parties végétatives et remobilisation

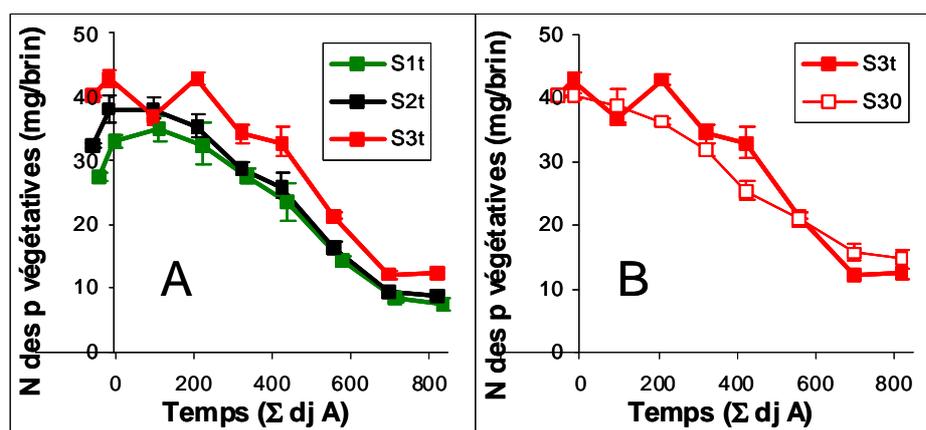


Figure 4-6: Evolution de l'azote total des parties végétatives (mg/brin) chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B) en fonction du temps thermique en degrés jours post anthèse (ΣdjA). Chaque point (symboles comme en figure 4-1) représente la moyenne et l'écart-type de trois répétitions normalisées par le NGE.

La quantité d'azote présente dans les parties végétatives augmente jusqu'à la floraison puis diminue lentement jusque vers 200 à 400 djA chez les brins traités, mais nettement plus fort chez les brins non traités (figure 4-6). Comme les brins de la variété Bastide sont plus gros que ceux de la variété Soissons, la remobilisation par Bastide entre 0 et 800 djA est plus élevée de 7 à 12 mg/brin ($P < 10^{-4}$). De même, les brins sous 2008.1 ont remobilisé en moyenne 4 mg/brin de moins que ceux sous les autres ITK ($P < 10^{-4}$). Enfin les brins traités ont remobilisé en moyenne 3,6 mg/brin de plus que les non traités ($P < 10^{-4}$).

Tableau 4-9: Azote remobilisé entre 0 et 800 djA depuis les parties végétatives en mg/ brin et en % de l'azote présent à la floraison selon les modalités expérimentales (ITK en colonne, variété et traitement fongicide en lignes). Les ITK sont décrits en p.99. Moyenne \pm écart type de trois ajustements

CV:	FON:	Azote remobilisé (mg /brin)			Azote remobilisé (%)		
		2008.1	2008.2	2008.3	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	24,3 \pm 1,4	28,6 \pm 1,1	30,0 \pm 0,2	77 \pm 3	78 \pm 1	73 \pm 1
	Non Traité	20,9 \pm 1,1	22,9 \pm 0,8	25,6 \pm 0,3	64 \pm 2	66 \pm 1	64 \pm 3
Bastide	Traité	31,8 \pm 1,7	37,2 \pm 0,6	36,8 \pm 2,8	81 \pm 1	79 \pm 0	77 \pm 2
	Non Traité	30,1 \pm 2,3	35,0 \pm 0,7	32,6 \pm 0,8	70 \pm 2	71 \pm 0	68 \pm 1

D'autre part, l'ITK affecte fortement le résidu d'azote dans les parties végétatives à la fin du remplissage ($P < 10^{-4}$) avec $08.1 < 08.2 < 08.3$. Le résidu est également sensible à la variété (Soissons < Bastide; $P < 5\%$) et aux fongicides ($P < 10^{-4}$). On peut considérer que les plantes non traitées ont abandonné en moyenne 4 mg/brin que les plantes traitées ont remobilisées. Donc si on calcule l'efficacité de la remobilisation par le rapport entre azote végétatif à 0 et 800 djA, on constate que celle-ci est inférieure chez Soissons ($P < 10^{-4}$) et sous l'ITK 2008.3 ($P < 10^{-3}$). L'efficacité de remobilisation de l'azote passe de 77% en moyenne chez les plantes traitées à 67% seulement chez les plantes non traitées ($P < 10^{-4}$). Il n'y avait pas d'interaction entre les facteurs étudiés ($P > 5\%$).

c. Azote des grains et remplissage

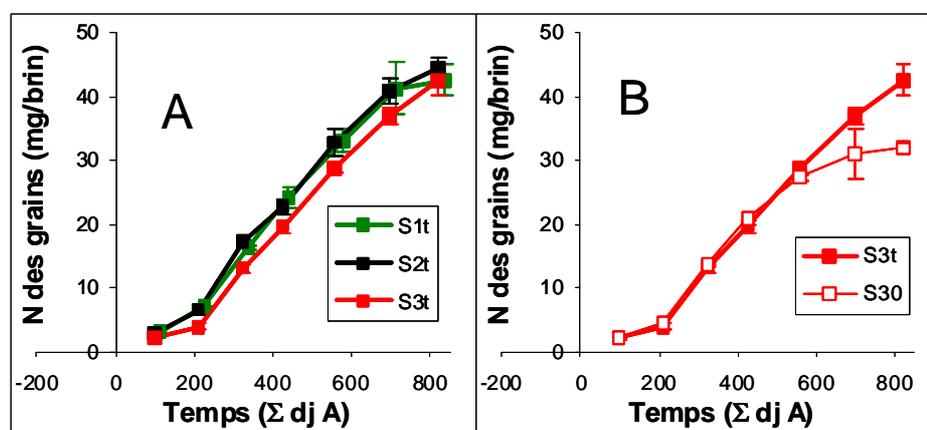


Figure 4-7: Evolution de l'azote total des grains (mg /brin) chez Soissons selon l'ITK traité (A) ou sous 2008.3 selon le traitement fongicide (B) en fonction du temps thermique en degrés jours post anthèse (Σ djA). Chaque point (symboles comme en figure 4-1) représente la moyenne et l'écart-type de trois répétitions normalisées par le NGE.

L'azote s'accumule dans les grains jusque vers 800 djA chez les brins traités, mais le remplissage semble s'arrêter beaucoup plus tôt chez les non traités (figure 4-7). Par conséquent, on a réalisé des ajustements polynomiaux sur N_g de 100 à 800 dj et calculé la vitesse au début (de 200 à 400 djA) et à la fin (de 600 à 800 djA) du remplissage (tableau 4-10). Pendant la première phase le remplissage est quasiment linéaire dans tous les cas. Seul Bastide montre une réponse à l'ITK ($P < 1\%$): dans le cas de B2t et B20 le remplissage atteignait en moyenne $93 \pm 13 \mu\text{g}\cdot\text{dj}^{-1}$ /brin, alors qu'il valait seulement $73 \pm 7 \mu\text{g}\cdot\text{dj}^{-1}$ /brin

autrement. Il n'y avait pas d'effet significatif des fongicides à ce stade précoce. En fin de remplissage au contraire, la vitesse a fortement décru dans tous les cas, sans effet de la variété ni de l'ITK ($P > 5\%$), mais avec un effet très significatif des fongicides ($P < 10^{-4}$) puisque le remplissage conserve encore $46 \pm 13\%$ de sa vitesse initiale chez les brins traités, tandis qu'il a chuté à $18 \pm 14\%$ chez les non traités.

Tableau 4-10: Vitesse de remplissage des grains en azote entre 200 et 400 djA en $\mu\text{g}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$, puis vitesse entre 600 et 800 djA en % de la précédente selon les modalités expérimentales (ITK en colonne, variété et traitement fongicide en lignes). Les ITK sont décrits en p.99. Moyenne \pm écart type de trois ajustements

CV:	FON:	dNg/dt 200-400 djA ($\mu\text{g}\cdot\text{dj}^{-1}/\text{brin}$)			dNg/dt 600-800 djA (%)		
		2008.1	2008.2	2008.3	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	72 ± 4	73 ± 9	70 ± 7	50 ± 18	57 ± 6	37 ± 7
	Non Traité	74 ± 4	76 ± 1	74 ± 2	10 ± 10	25 ± 19	10 ± 5
Bastide	Traité	81 ± 1	90 ± 9	65 ± 14	45 ± 12	49 ± 17	39 ± 16
	Non Traité	66 ± 5	97 ± 17	77 ± 7	33 ± 9	14 ± 19	13 ± 9

A maturité par conséquent l'azote des grains est plus élevé ($P < 10^{-4}$) de 2 à 14 mg/brin chez la variété Bastide. Cependant les grains de Soissons étant nettement plus petits, leur teneur azotée est plus élevée de 0,2 %MS en moyenne ($P < 10^{-4}$). Il y a 5 mg/brin d'azote en plus sous 2008.2 par rapport aux autres ITK ($P < 10^{-3}$) et 6,7 mg/brin en moins chez les plantes non traités ($P < 10^{-4}$).

d. Effet des fongicides sur l'azote des différents organes végétatifs

- On a vu que les parties végétatives remobilisent significativement moins d'azote chez les brins non traités: cette baisse de remobilisation correspond pour 80% à une diminution significative de remobilisation de l'azote des feuilles non traitées ($P < 10^{-4}$) où l'on constate un blocage de l'azote entre 450 et 550 djA alors que l'azote foliaire des brins traités diminue jusqu'à maturité (Figure 4-8A). La cinétique de l'azote foliaire des brins non traités montre deux phases qui la différencient de celle des brins traités: de 100 à 450 djA, une sortie d'azote des feuilles plus précoce est observée, suivie après 450 à 500 djA, d'une stagnation en contenu en azote dans les feuilles. Entre 100 et 450 djA, la pente de la régression de l'azote foliaire est significativement plus élevée de 2% à 176% chez les brins non traités par comparaison aux traités. Cette vitesse de remobilisation précoce des feuilles est très significativement plus élevée pour Soissons ($P < 10^{-3}$), mais moins pour Bastide ($P < 5\%$).
- L'azote contenu dans les gaines des feuilles représente à peu près la moitié de celui des limbes à la floraison (figure 4-8B). Il reste stable jusque vers 400 djA, puis diminue fortement permettant de remobiliser de $3,9 \pm 0,8$ mg/brin chez Soissons contre $5,3 \pm 0,6$ mg/brin chez Bastide ($P < 10^{-4}$). Aucun effet significatif des ITK ni des fongicides n'a été détecté ($P > 5\%$). La différence de plateau qu'on peut observer sur la figure est un artefact qui ne se reproduit pas dans les autres modalités expérimentales.
- L'azote des tiges proprement dites commence par augmenter jusque vers 200 djA, puis diminue continument jusqu'à 700 djA (figure 4-8C). La remobilisation nette varie entre 4 et 10 mg/brin, avec des effets très significatifs ($P < 10^{-4}$) de la variété et de l'ITK, eux-mêmes en interaction ($P < 5\%$). Par contre la quantité d'azote remobilisé par les tiges n'est pas trouvée significativement différente entre brins traités ou non ($P > 5\%$). A maturité, comme pour les gaines, aucune différence significative d'azote résiduel n'est trouvée entre brins traités ou non ($P > 5\%$).
- L'évolution du contenu en N des balles ne diffère pas entre brins traités ou non: de la floraison à 200 djA, il reste stable pour décroître ensuite jusqu'à 700 djA. La

remobilisation nette moyenne vaut $5,8 \pm 0,6$ et $7,2 \pm 1,0$ mg/brin Soissons et Bastide respectivement sous 2008.1 ou 2008.2, contre $6,1 \pm 0,5$ et $9,1 \pm 1,5$ mg/brin pour Soissons et Bastide respectivement sous 2008.3. L'azote résiduel trouvé dans les balles à la récolte est légèrement plus élevé de 0,1 à 0,7 mg/brin dans les brins non traités ($P < 5\%$). Mais cela ne suffit pas à faire une différence et l'azote remobilisé par les balles n'est pas significativement différent entre brins traités et non traités ($P > 5\%$).

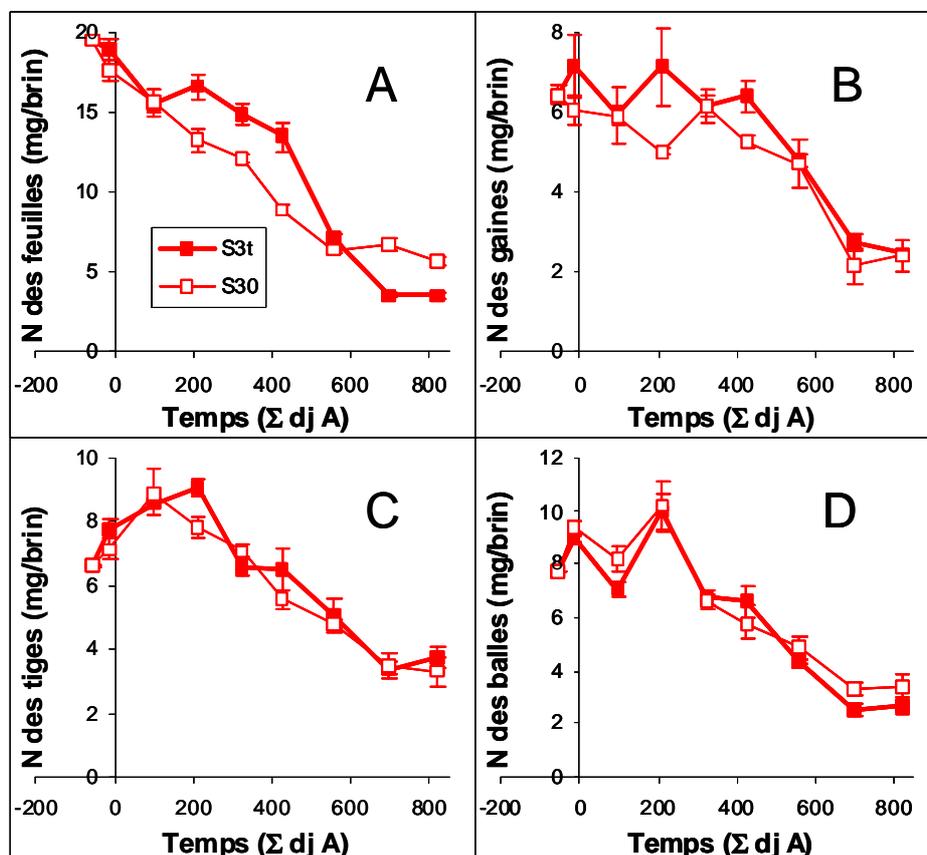


Figure 4-8: Evolution de l'azote total (mg/brin) en fonction du temps thermique en degrés jours post anthèse (ΣdjA) dans les différents organes des parties végétatives chez Soissons sous 2008.3 selon le traitement fongicide: limbes des feuilles (A), gaines des feuilles (B), tige (C) et balle de l'épi (D). Chaque point (symboles comme en figure 4-1) représente la moyenne et l'écart-type de trois répétitions normalisées par le NGE.

4. Effet des fongicides sur les flux d'azote et activités enzymatiques des feuilles

On va étudier séparément les trois derniers étages foliaires, les plus importants pour le remplissage du grain et à la durée de vie verte du couvert. En effet, les dynamiques de surface verte sont affectées par le traitement fongicide différemment selon l'étage foliaire. Une ANOVA générale montre au préalable l'effet global des différents facteurs: date, feuille, variété, conduite agricole et fongicide sur les différentes activités enzymatiques et contenu en protéines; l'effet FON est ensuite analysé isolément par comparaison d'échantillons appariés (il n'y a pas de répétition pour les dosages métaboliques).

a. Evolution du contenu en azote des feuilles 1, 2 et 3 selon le traitement fongicide

La figure 4-9 montre dans le cas de Soissons sous 2008.3 l'évolution du contenu en azote des feuilles de rang 1, 2 et 3 selon le traitement fongicide. La feuille 1 est toujours la plus chargée en azote (dans des proportions qui dépendent de la variété et de l'ITK), suivie de la feuille 2 et de la feuille 3. Pour chacune des trois feuilles, on constate une évolution en trois phases

similaire à celle précédemment décrite pour l'ensemble des feuilles: une première phase courte de plateau, suivie d'une phase de décroissance rapide du contenu en azote qui se termine par un arrêt de sortie d'azote. Les trois rangs foliaires se distinguent simplement pour les plantes traitées par une avancée de chaque phase avec le rang foliaire. L'évolution du contenu en azote des feuilles non traitées montre également ces trois mêmes phases, mais de manière anticipée par rapport aux plantes traitées. Le plateau initial est écourté, de même que l'arrêt de sortie d'azote des feuilles, de l'ordre de 100 à 150 dj en fonction des traitements. Il en résulte que des différences notables entre feuilles traitées ou non s'installent au cours du développement de la maladie. Autour de la floraison les contenus en N sont similaires chez les feuilles traitées ou non, puis le contenu en N devient significativement inférieur chez les feuilles non traitées (entre 200 et 500 djA selon le rang foliaire), l'arrêt de vidage des feuilles en azote aboutissant à des contenus résiduels en N supérieurs chez les plantes non traitées. Ces différentes phases seront plus particulièrement comparées entre feuilles traitées ou non. Les analyses de variance par date sont présentées en annexe XIV.

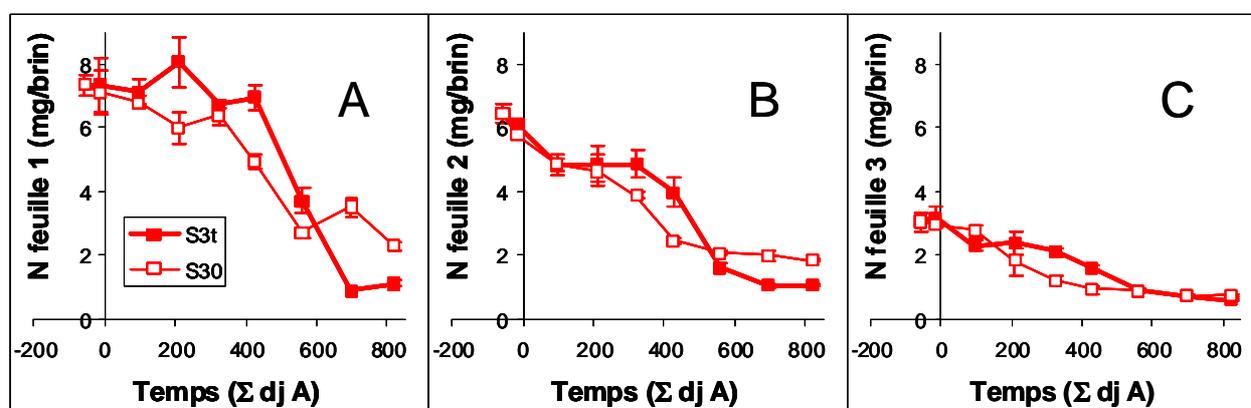


Figure 4-9: Evolution de l'azote total (mg/brin) en fonction du temps thermique en degrés jours post anthèse (ΣdjA) dans les limbes des feuilles chez Soissons sous 2008.3 selon le traitement fongicide: feuilles de rang 1(A), 2 (B), et 3 (C). Chaque point (symboles comme en figure 4-1) représente la moyenne et l'écart-type de trois répétitions normalisées par le NGE.

b. Activités enzymatique par feuille et par unité de chlorophylle

Les contenus en chlorophylle, protéines, et azote nitrique ainsi que les activités enzymatiques (nkat) liées à l'assimilation de l'azote (Nitrate réductase: NR; Glutamate dé-hydrogénase aminante: GDHa ou NAD-GDH), à sa remobilisation (Glutamate dé-hydrogénase désaminante: GDHd ou NADH-GDH) ou mixte (Glutamate synthase: GS) et enfin à la dégradation protéique (Endoprotéases: EndoP) ont été mesurés chaque semaine jusqu'à 600 djA dans les feuilles de rangs 1, 2 et 3, pour chaque modalité expérimentale. Ces contenus et activités sont exprimés ici par feuille, mais les résultats exprimés par rapport à la MS montrent les mêmes tendances (données non montrées).

Analyse globale.

Le Tableau 4-11 montre les résultats de l'analyse de variance générale réalisée sur ces variables et le texte spécifie les grandes tendances pour chacune. Le dispositif n'étant pas totalement équilibré, le test de Bonferroni à 5% est utilisé pour comparer les moyennes.

Excepté dans le cas des endoprotéases dont l'activité ne varie pas, l'ensemble des autres contenus en métabolites ou activités enzymatiques diminuent au cours du remplissage. Si le contenu en chlorophylle ne diminue qu'à partir de 400 djA, dans les autres cas cette baisse est plus progressive et aboutit à 600 djA à des pertes d'activité totales (NR, GS) ou seulement partielles (GDH; de 15 à 75% selon la strate foliaire). Un effet variétal est parfois trouvé pour

les nitrates, la NR et les endoprotéases, mais pas dans les autres cas. Excepté dans le cas de la NR, l'ITK a toujours un effet significatif tant sur les métabolites que sur les activités enzymatiques: dans tous les cas, les feuilles sous 2008.1 ont toujours des contenus ou des activités enzymatiques inférieurs à celles sous 2008.3, les résultats du traitement 2008.2 se rapprochant tantôt de ceux de 2008.1 (nitrates et GDHa et GDHd), tantôt de 2008.3 (protéines et GS) ou restant intermédiaire dans les autres cas. Excepté dans le cas des endoprotéases dont l'activité ne semble pas varier selon l'étage foliaire, on trouve toujours un effet très significatif de celui-ci sur les indicateurs mesurés. La feuille 1 est moins concentrée en nitrates que les deux autres, mais plus forte en NR. Pour tous les autres indicateurs, les contenus ou activités diminuent avec le rang foliaire. Enfin, excepté dans le cas de l'activité GS, le traitement fongicide a un effet significatif pour toutes les autres variables. Dans le cas des activités GDHa et EndoP, les feuilles non traitées montrent des valeurs supérieures. Pour tous les autres indicateurs, les feuilles non traitées ont des contenus en métabolites ou des activités enzymatiques inférieures aux feuilles traitées.

Tableau 4-11: ANOVA multifactorielle des effets de la date de prélèvement (Pt), de la variété (CV), des conduites agricoles (ITK), des fongicides (Fon) et de l'étage foliaire (Str) sur les contenus en chlorophylle (Chl), protéines solubles et nitrates et les activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme de l'azote (NR, GDHd, GDHa, GS, Endoprotéases) au cours du remplissage du grain: *** $P < 10^{-4}$; ** $P < 10^{-3}$; * $P < 1\%$; ns: non significatif ($P > 5\%$)

	Chl	Protéine	Nitrates	NR	GDHd	GDHa	GS	EndoP
Pt	***	***	***	***	***	***	***	ns
CV	*	ns	***	*	**	*	ns	***
ITK	***	*	***	ns	***	***	**	*
Fon	***	*	***	-	**	-	ns	***
Str	***	***	***	***	***	***	***	ns

Analyse par période.

Tableau 4-12: Analyse des différences entre brins traités ou non pour les contenus en chlorophylle (Chl), protéines solubles et nitrates et les activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme de l'azote (NR, GDHd, GDHa, GS, Endoprotéases) au cours du remplissage du grain, par comparaison d'échantillons appariés selon la période et l'étage foliaire (F1, F2 et F3). Le sens de variation entre brins traités (T) ou non (NT) est donné lorsqu'une différence significative à 5% est trouvée (test de student ou du rang)

	Chl	Protéine	Nitrates	NR	GDHd	GDHa	GS	EndoP
Période1								
F1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	T < NT
F2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	T < NT
F3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	T < NT
Période2								
F1	ns	NT < T	T < NT	ns	NT < T	T < NT	NT < T	T < NT
F2	NT < T	NT < T	ns	NT < T	NT < T	T < NT	NT < T	ns
F3	NT < T	NT < T	ns	NT < T	ns	T < NT	NT < T	ns
Période3								
F1	ns	NT < T	ns	ns	NT < T	ns	ns	ns
F2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
F3	ns	ns	ns	ns	NT < T	ns	ns	ns

Dans un deuxième temps, l'analyse a été focalisée sur la comparaison des feuilles traitées ou non de chaque étage foliaire en distinguant trois périodes significatives: de 0 à 100 djA, aucune différence significative n'est encore notable sur le flux d'azote. Pendant la deuxième période, de 200 à 500 djA selon la strate foliaire, les feuilles non traitées se vident plus vite en

azote que les traitées. Enfin, au-delà de 500 djA, l'azote n'évolue plus dans les feuilles non traitées alors qu'il continue à descendre dans les feuilles traitées. Ici encore, des résultats similaires sont obtenus quand les variables sont exprimées par gMS ou par feuille. Les résultats des tests appariés par feuille sont synthétisés dans le tableau 4-12

La première période se caractérise par une activité NR importante qui disparaîtra ensuite, mais cette activité ne dépend pas encore des traitements fongicides. Seule l'activité des endoprotéases des feuilles 1 et 2 est trouvée différente avec le traitement fongicide: avant même l'expression des symptômes de maladie, les feuilles non traitées ont une activité protéolytique supérieure aux feuilles traitées.

En deuxième période, s'expriment un maximum de différences entre feuilles traitées et non traitées d'une part, et rang foliaire d'autre part. Ainsi, les contenus en chlorophylle et protéines ainsi que les activités NR, GDHd et GS sont inférieures chez les feuilles non traitées alors que le contenu en nitrates et les activités GDHa et endoprotéases sont supérieures. Cependant cette différence n'est pas toujours significative. Dans le cas des F3, même les différences significatives le sont faiblement ($P > 1\%$).

En période 3 enfin, les différences significatives disparaissent globalement pour toutes les variables mesurées; subsiste une très légère différence de contenu en chlorophylle ($P < 5\%$) chez les F3 et de l'activité GDHd ($P < 5\%$) dans le cas des F1 et les F3.

Les activités enzymatiques ont ensuite été rapportées au contenu en chlorophylle. A part la GDHd dont la différence devient significative (plus faible chez les non traités) pour la F3 en période 2, tous les résultats précédents sont conservés. Ceci suggère qu'ils ne dépendent pas simplement de la diminution des surfaces vertes, mais qu'il y a une variation de fonctionnement des surfaces restant vertes quand la maladie s'installe.

c. Relations entre flux d'azote et indicateurs métaboliques

Afin d'approfondir la comparaison entre brins traités ou non, le contenu en azote des feuilles a été mis en relation avec les indicateurs de fonctionnement azoté des feuilles, contenu en métabolites et activités enzymatiques. Ces relations sont montrées sur la somme des trois dernières feuilles, après vérification que les mêmes tendances sont retrouvées strate par strate (données non montrées).

Les relations entre azote foliaire et indicateurs métaboliques sont généralement linéaires, sauf pour la GS où le meilleur ajustement trouvé est une fonction puissance. Les plus fortes corrélations avec l'azote foliaire ($r^2 > 0,7$) sont trouvées pour la chlorophylle, les protéines, la GS et la GDHd (fig. 4-10). Les relations sont moins nettes dans les autres cas (fig. 4-11), voire non significatives pour les endoprotéases et la NR ($P > 5\%$). Les relations obtenues ne diffèrent significativement ni avec le traitement fongicide, ni avec la variété ou la conduite agricole, exception faite de la relation entre azote foliaire et GDHa pour laquelle on trouve un effet fongicide très légèrement significatif ($P < 5\%$) pendant les deux premières périodes. Dans les autres cas, la maladie n'induit pas d'effet significativement distinct de celui de la perte d'azote foliaire. Ce résultat est paradoxal au moins pour la période 3 dans laquelle les feuilles sont mortes ou presque, mais avec un résidu azoté très différent.

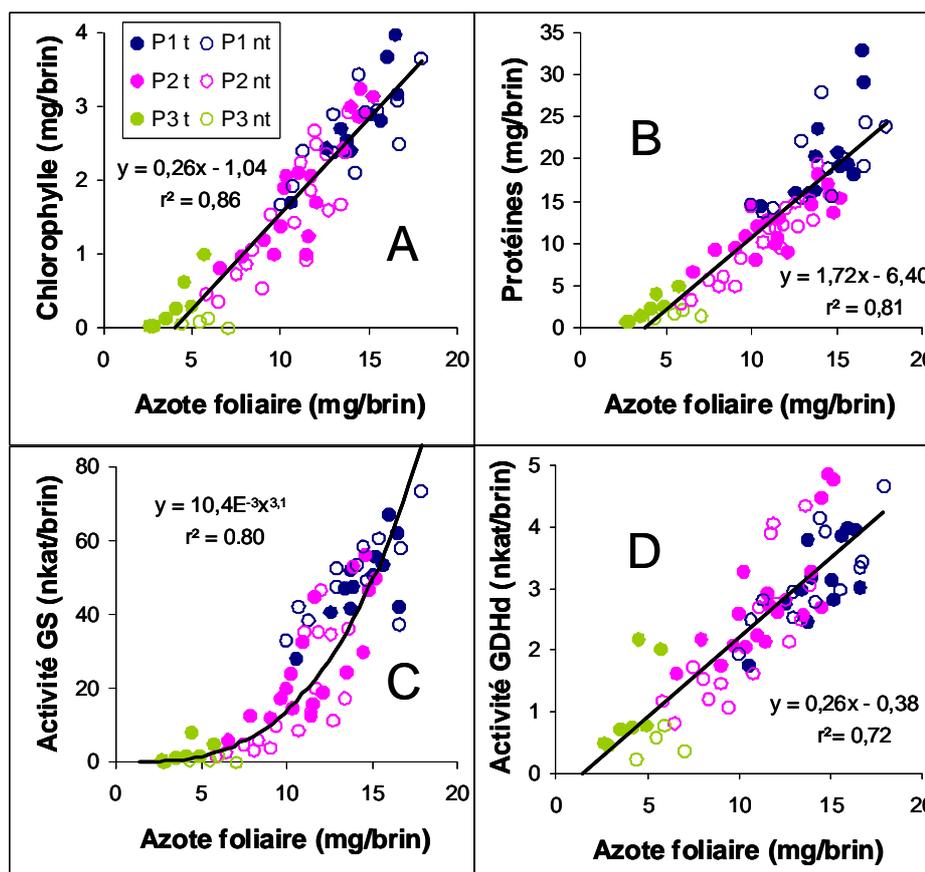


Figure 4-10: Relation entre contenu en azote des feuilles et indicateurs métaboliques fortement corrélés: chlorophylle (A), protéines par dosage Bradford (B), activité GS (C), et GDHd (D) pendant les périodes 1 (en bleu), 2 (en rose) et 3 (en vert). Chaque point (symboles fermés pour les brins traités, ouvert pour les brins non traités) représente une date et un traitement pour la somme des trois dernières feuilles (variétés et conduites agricoles confondues). La corrélation générale est indiquée.

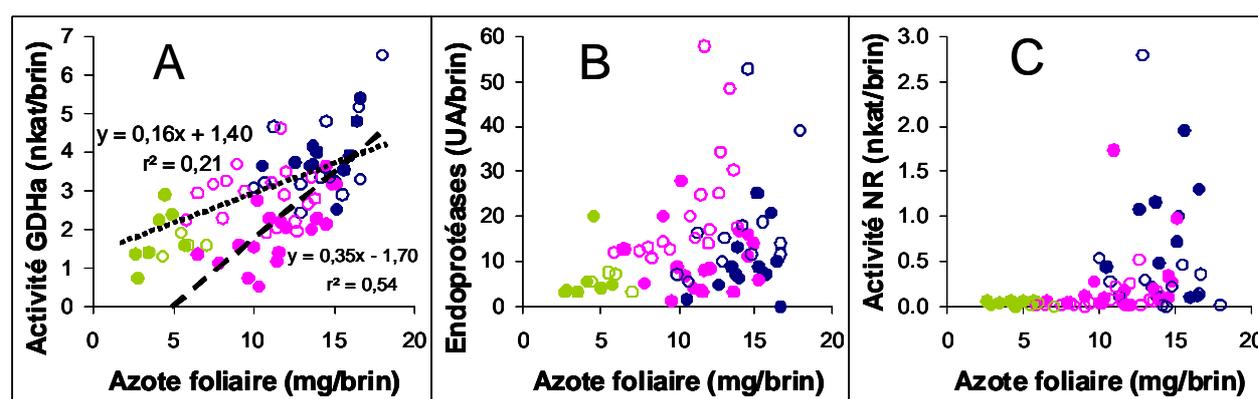


Figure 4-11: Relation entre contenu en azote des feuilles (mg/brin) et indicateurs métaboliques peu ou pas corrélés: GDH aminante (A), endoprotéases (B) et NR (C). Chaque point (symboles comme en figure 4-10) représente une date et un traitement pour la somme des trois dernières feuilles (variétés et conduites agricoles confondues). Dans le cas de la GDHa, les corrélations (périodes 1 et 2) sont indiquées, en tirets pour les brins traités et en pointillés pour les brins non traités.

d. Indicateurs intégrés

Les différentes activités enzymatiques foliaires ont ensuite été intégrées sur leur période active entre 0 à 600 djA, et on a mis le résultat en relation avec le bilan d'azote absorbé et remobilisé pendant le remplissage. Nous avons constaté dans un premier temps l'absence d'effet de la variété et de l'ITK sur l'origine ou la pente de ces relations ($P > 5\%$; données non montrées). En conséquence, seul l'effet du traitement fongicide est présenté ci-dessous.

Curieusement, les variations d'absorption d'azote entre modalités expérimentales ne sont pas corrélées aux variations d'activité NR intégrée sur la période de remplissage du grain (fig. 4-12). Cela semble dû à la forte variabilité d'activité NR, notamment chez Soissons: l'intégration sur un pas de temps hebdomadaire est alors trop imprécise. Par contre, on trouve une corrélation négative significative entre l'absorption d'azote et chacune des activités GDH. Dans les deux cas, la corrélation générale est améliorée en forçant une pente commune aux brins traités ou non, mais une origine différente. La corrélation devient alors $r^2 = 0,51$ ($P < 5\%$) pour la GDHd et $r^2 = 0,83$ ($P < 1\%$) pour la GDHa.

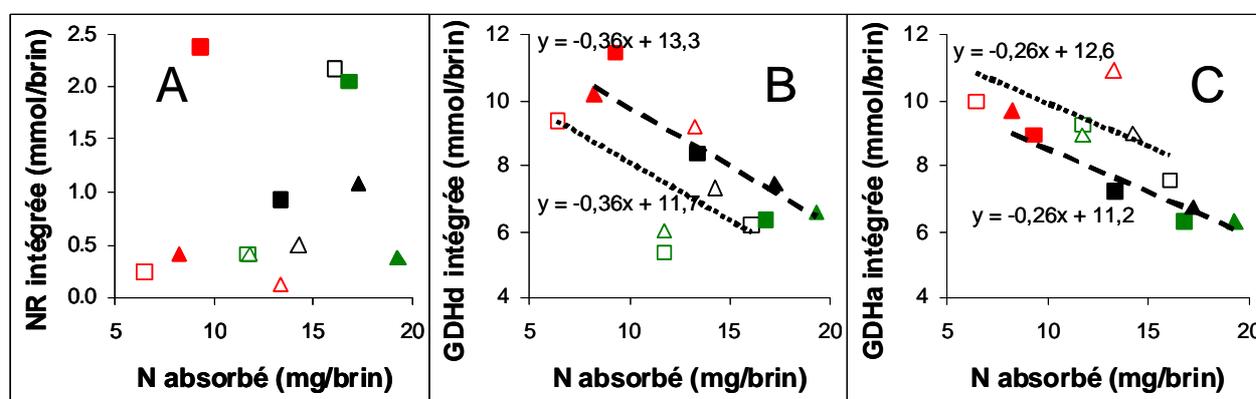


Figure 4-12: Relation entre azote absorbé pendant le remplissage et intégration, des activités enzymatiques NR (A), GDH dé-aminante (B) et GDH aminante (C), sur leur période active entre 0 à 600 djA. Les symboles représentent les modalités expérimentales comme en figure 4-2. Lorsque deux corrélations de pente commune sont obtenues, les brins traités sont en tirets et les non traités en pointillés. Pour une meilleure lisibilité, les axes ne passent pas par l'origine.

L'azote remobilisé depuis les feuilles est bien corrélé avec les activités intégrées de plusieurs enzymes (fig. 4-13). La GS et de la GDHd sont significativement corrélées si on prend en compte toutes les données ($r^2 = 0,70$ et $0,62$; $P < 1\%$), mais on n'a pas mis en évidence d'effet significatif du traitement fongicide sur ces corrélations ($P > 5\%$). Par contre les activités intégrées des endoprotéases et de la GDHa ne sont pas du tout corrélées à l'azote remobilisé depuis les feuilles quand tous les traitements sont pris en compte ensemble ($r^2 = 0,00$; $P > 5\%$), alors que si l'on force la relation pour une même pente mais des origines différentes entre brins traités ou non, on obtient des corrélations très significatives ($r^2 = 0,74$ et $0,56$; $P < 1\%$). La double liaison des GDH à l'azote absorbé et à l'azote remobilisé depuis les feuilles ne provient pas d'une corrélation entre azote absorbé et remobilisé, car ces deux variables sont indépendantes ($r^2 = 0,04$; $P > 5\%$). Si l'on considère l'azote remobilisé par l'ensemble du brin, les corrélations avec les GDH intégrées disparaissent, alors que celles avec la GS ou les endoprotéases sont conservées au même degré de signification.

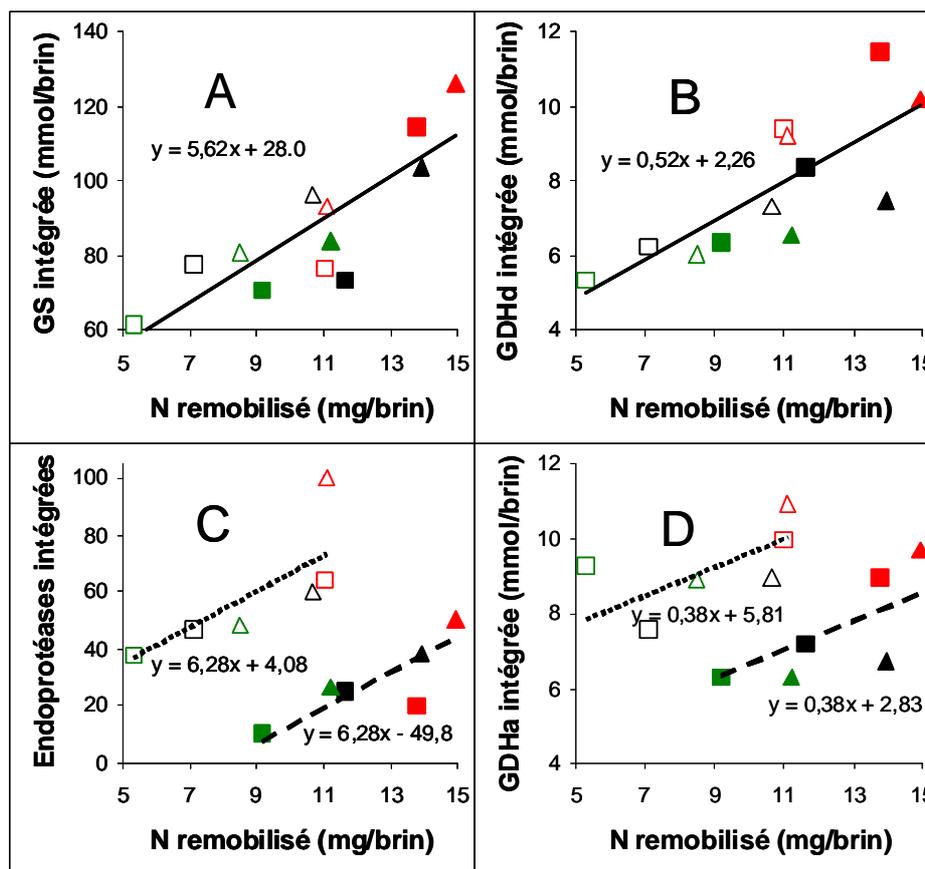


Figure 4-13: Relation entre azote remobilisé depuis les feuilles (mg/brin) et intégration des activités enzymatiques GS (A), GDH dé-aminante (B) endoprotéases (C), et GDH aminante (D) en mmol/brin sur leur période active entre 0 à 600 djA. Les symboles représentent les modalités expérimentales comme en figure 4-2. Lorsqu'une seule corrélation est obtenue pour tous les points, elle est en trait plein. Lorsque deux corrélations de pente commune sont obtenues, les brins traités sont en tirets et les non traités en pointillés. Pour une meilleure lisibilité, les axes ne passent pas par l'origine.

Discussion

Cette expérimentation avait pour objectif d'étudier l'effet de la septoriose sur les déterminants du remplissage des grains en azote avec des gammes d'état du couvert en début de remplissage du grain plus larges que celles antérieurement analysées dans la littérature (Gooding *et al.*, 2005; Bancal *et al.*, 2008). Les expérimentations antérieures reposent effectivement sur des conduites agricoles courantes ou prospectives visant à maximiser le rendement et la teneur en protéines des grains. L'état de nutrition azotée à la floraison y est en général optimisé dans cette perspective, ce qui aboutit à une faible variabilité du potentiel de remobilisation de l'azote pour le remplissage des grains (Bancal *et al.*, 2008). En conséquence, ces études ne permettent pas d'analyser correctement la perturbation de la remobilisation de l'azote par les maladies aériennes foliaires en lien avec la sénescence des feuilles. Ainsi notre choix de fractionner très différemment une même quantité d'azote apportée a permis de générer des couverts contrastés à floraison. Le traitement 2008.1, semé très dense et de faibles apports précoces, aboutit à un peuplement de maître-brins carencés en N à floraison (INN = 0,75) où la remobilisation est faible tandis que la fertilisation tardive peut être particulièrement efficace pour le remplissage en azote du grain. A l'autre extrême, le

traitement 2008.3, où l'azote est apporté précocement, conduit à un fort tallage et aboutit à un INN floraison proche de 1,1 qui suggère une consommation 'de luxe', permettant une forte remobilisation, mais une faible absorption post-floraison. La contribution de la remobilisation à l'azote des grains est ainsi estimée à 83% chez B3t, contre 60% chez S1t. Nos variations représentent donc la gamme généralement proposée dans le cas du blé: de 90 à 60% (Hirel *et al.*, 2007; Kichey *et al.*, 2007; Barbottin *et al.*, 2005). D'un autre côté, le rapport entre azote remobilisable et nombre de grains varie peu dans nos essais: entre 0,7 et 0,8 mg/grain chez les brins traités; et les ITK n'ont pas eu d'effet sur ce ratio ($P > 5\%$). Donc, bien que les ITK aient abouti à la floraison à de larges variations d'azote par brin, les pools d'azote par grain restent eux peu variables. La variabilité que nous avons générée est d'ailleurs très en deçà de la variabilité interannuelle: de 0,6 à 1,2 mg/grain (Bancal *et al.*, 2008). Malheureusement la variabilité interannuelle est largement incomprise, et la littérature souligne plutôt que la corrélation entre azote à la floraison et nombre de grains est difficile à casser hormis par ablation d'organes (Bancal, 2009). Dans notre cas, la corrélation entre azote des grains et azote remobilisé atteint $r^2 = 0,67$ ($P < 1\%$), et elle est conservée entre brins sains et malades. Par contre l'azote des grains n'est pas corrélé significativement à l'azote absorbé post-floraison ($P > 5\%$). Ce résultat confirme l'importance d'analyser l'impact des maladies foliaires sur l'absorption et la remobilisation séparément. En effet les gammes de variation des pools d'azote absorbés et remobilisés chez les couverts sains orientent les lois générales d'action des maladies aériennes.

Ceci étant posé, ce chapitre vise à préciser les deux questions suivantes:

- Premièrement, la septoriose, en diminuant précocement la surface verte, affecte-t-elle les flux d'azote au niveau de la plante entière comme les traitements chirurgicaux présentés au chapitre I ? Est-elle comparable à un emballage, qui libère de manière accélérée l'azote vers les autres organes, ou bien à une ablation, dont la conséquence est juste une diminution du pool d'azote disponible pour le grain ?
- Deuxièmement, comment la septoriose modifie-t-elle le fonctionnement azoté des feuilles malades par rapport aux témoins traités? Les corrélations entre indicateurs de fonctionnement et flux précédemment établies chez des feuilles saines sont-elles conservées chez des feuilles malades?

1. Comparaison des expérimentations 2007 et 2008

Le tableau 4-13 ci-dessous fait un récapitulatif des variations associées au métabolisme de la sénescence dans le cas présenté dans ce chapitre. La septoriose des feuilles, champignon hémibiotrophe, dont la conséquence est de diminuer la surface verte, y est comparée aux manipulations chirurgicales effectuées sur les feuilles 2 et 3 en 2007 (chapitre I). L'ablation, de ces feuilles supprimait une source conséquente d'azote et de photosynthèse pour le grain, tandis que leur emballage diminuait la photosynthèse au même titre que l'ablation, mais accroissait brutalement et transitoirement la disponibilité en azote remobilisé.

Du point de vue des flux de MS, la diminution de surface verte est beaucoup plus progressive en 2008 qu'en 2007. Cependant si l'on intègre les mesures sur la période de remplissage, les effets sont très comparables: le cumul de PAR intercepté diminue de 20 à 40% en 2007, de 22 à 38% en 2008. Cette diminution suffit les deux années à expliquer la baisse d'assimilation nette intégrée pendant le remplissage. Ni en 2007, ni en 2008 les modalités expérimentales n'entraînent de variation de la RUE. La MS finale des grains est affectée les deux années, mais les manipulations de 2007 se traduisent par une baisse significative de la vitesse de remplissage des grains, alors que ce n'est pas le cas en 2008. Cela pourrait résulter d'une diminution de surface verte trop progressive en 2008 pour mettre en évidence des différences significatives.

Du point de vue des flux d'azote, la comparaison est compliquée par l'existence en 2008, mais pas en 2007, d'une absorption post-floraison très significative chez les témoins. L'un des effets de la maladie en 2008 est précisément une baisse très significative de l'absorption. Or nos mesures ne permettent que des bilans entre entrée et sortie d'azote depuis chaque organe. On est donc dépendant des hypothèses formulées sur la répartition de cet azote nouvellement absorbé.

Tableau 4-13: Comparaison des variations par rapport au témoin des éléments déterminant les flux de carbone et d'azote dans les grands processus (absorption, remobilisation, remplissage), ainsi que des marqueurs du métabolisme azoté au cours des expériences de 2007 et 2008.

	Ablation 2007	Emballage 2007	Maladie 2008
Surface vertes et Chlorophylle	Suppression des feuilles manipulées; pas d'effet sur les autres feuilles	Chute rapide chez les feuilles manipulées; pas d'effet sur les autres feuilles	Diminution lente chez les feuilles atteintes; pas d'autres feuilles

Éléments du métabolisme carboné

Interception (cumul pendant le remplissage)	Diminution de 20 à 40%	Diminution de 20 à 40%	Diminution de 22 à 38%
RUE	pas d'effet: 3,5 g/MJ	pas d'effet: 3,5 g/MJ	pas d'effet: 3,2 g/MJ
MS finale pa	diminuée	diminuée	diminuée
Vitesse MS pa	diminuée	diminuée	diminuée
MS finale grains	diminuée	diminuée	diminuée
Vitesse MS grains	diminuée	diminuée	constante

Éléments du métabolisme azoté

Absorption	Nulle donc pas d'effet	Nulle donc pas d'effet	diminuée
Vitesse de remobilisation des feuilles	Suppression des feuilles manipulées; V diminuée des autres feuilles	V très accélérée des feuilles manipulées; V diminuée des autres feuilles	V accélérée des feuilles atteintes; pas d'autres feuilles
Arrêt de la remobilisation et résidu des feuilles	Feuilles supprimées	Arrêt très précoce; résidu légèrement augmenté	Arrêt précoce; résidu très augmenté
Remobilisation des autres p.vég.	Constante	Retardée (tige+gainnes) ou constante	Constante
Vitesse N grains	Diminution immédiate	Constante	Constante (au début)
N final grains	Diminué	Constant	Diminué (arrêt précoce et progressif)

Marqueurs du métabolisme N dans les feuilles emballées (2007), ou malades (2008)

Nitrates		Constants	Constants
A aminés		Pic transitoire	<i>non déterminés</i>
Protéines		Diminue	Diminue
NR		Nulle donc pas d'effet	Diminue
GS		Diminue	Diminue
GDHd		Diminue	Diminue
GDHa		Pic transitoire	Stable (diminue chez témoin)
Endoprotéases		Augmente	Augmente précocement puis rattrapé par témoin

En 2008, la cinétique de vidage des feuilles non traitées montre trois périodes. Pendant la première l'azote est identique à celui des témoins traités. Pendant la deuxième période les feuilles malades se vident plus vite que les témoins. Enfin la troisième période correspond à un blocage de l'azote dans les tissus nécrosés, l'azote résiduel étant finalement nettement supérieur à celui des témoins. La diminution plus précoce du contenu en azote des feuilles malades en période 2 de 2008 ressemble au cas des feuilles emballées de 2007. Cependant en 2007 l'azote du reste de la plante augmente alors transitoirement par rapport au témoin, et ce surplus d'azote disponible est stocké dans les tiges et gaines. En 2008, l'azote du reste de la plante n'est pas augmenté par la maladie des feuilles, car le surplus d'azote libéré par les feuilles malade est compensé par la baisse d'absorption par la plante. De fait l'azote du compartiment tige+gaines n'est absolument pas affecté par les maladies des feuilles. On peut donc faire l'hypothèse que le bilan plus favorable des feuilles traitées vient de ce qu'elles remobilisent autant que les malades, mais compensent cette remobilisation par l'incorporation d'azote nouvellement absorbé. Les plantes à feuilles emballées de 2007 comme les plantes malades de 2008 en période 2, présentent une vitesse de remplissage N des grains identique à celle des témoins correspondants.

Plus tard, vers la fin du remplissage, l'emballage des feuilles augmente un peu leur azote résiduel, mais les quantités concernées restent négligeables par rapport à la plante entière et l'azote final des grains reste comparable à celui des témoins. Au contraire, les feuilles malades conservent une partie importante de leur azote qui reste bloqué en période 3 de la maladie, et ce blocage peut être mis en relation avec le rendement N plus faible des plantes malades. L'effet de la maladie pour le reste de la plante en période 3 de 2008 est plutôt comparable à celui de l'ablation de feuilles en 2007: dans ce cas, on constate une réduction immédiate de la vitesse de remplissage N des grains. Ce n'est pas le cas en 2008, sans doute parce que la transition de la période 2 à la période 3 s'effectue à des moments différents selon l'étage foliaire, et plutôt en fin de saison. C'est pour cela qu'on a constaté un arrêt progressif du remplissage entre 550 et 750 djA, plutôt qu'une diminution brutale de sa vitesse.

Pour finir on va reprendre l'ensemble des comparaisons entre les deux années 2007 et 2008 et construire un schéma interprétatif des flux d'azote entre organes. La présence de septoriose n'est jamais accompagnée d'une modification dans l'évolution de l'azote des autres organes végétatifs. Bancal *et al.* (2008) avaient fait les mêmes constatations en analysant la variabilité interannuelle d'essais beaucoup moins variés à la floraison. Cela suggère que la vitesse de remobilisation d'azote de chaque organe est probablement fixée précocement à l'échelle du brin. Cette vitesse étant fixée, l'apparition progressive d'une surface malade ne la modifie pas. Par contre la maladie affecte les cinétiques d'azote des feuilles atteintes et la décroissance de l'azote foliaire est plus précoce chez les plantes non traitées. Cela aboutit à un maintien de la vitesse de remplissage N des grains pendant les périodes 1 et 2 de la maladie. La fourniture d'azote aux grains n'est affectée que tardivement, lorsque l'azote foliaire est bloqué dans les tissus nécrosés. On retrouve ici aussi la littérature antérieure (Bancal *et al.*, 2008; Bancal et Huet 1998; Garry *et al.*, 1995; Robert *et al.*, 2004b). La diminution précoce de teneur azotée des feuilles malades peut être comprise en termes de bilan. Avant la nécrose totale des feuilles, l'évolution de leur contenu en azote résulte du bilan net entre une entrée d'azote issue de l'absorption post-floraison et d'une sortie d'azote, la remobilisation vers les autres organes, en particulier les grains. On peut donc formuler l'hypothèse que chez les plantes saines, l'absorption post-floraison est incorporée dans les feuilles. L'effet de cette incorporation s'oppose à celui de la remobilisation, avec pour conséquence le bilan net positif parfois observé jusqu'à 200 djA. Chez les plantes malades, l'absorption est beaucoup plus faible, ce qui aboutit à un bilan rapidement négatif de l'azote des feuilles atteintes, sans modification de leur flux d'exportation. A l'échelle macroscopique, la septoriose jouerait donc précocement sur l'absorption d'azote post-floraison, puis sur la rétention d'azote dans les tissus

prématurément nécrosés par la maladie. La maladie n'aurait par contre pas d'effet sur la vitesse de remobilisation d'azote, ni par les tissus atteints ni par les autres. Le suivi d'azote marqué dans la plante malade pourrait confirmer cette hypothèse. On peut déjà noter que la pente de la relation entre chlorophylle et azote foliaire n'est pas affectée par la présence de maladie, ce qui va dans le sens d'une vitesse d'exportation de l'azote des feuilles inchangée par la sénescence qu'elle soit naturelle ou due à la septoriose. En 2007, on n'a observé aucun effet de l'ablation ou de l'emballage sur les autres feuilles non manipulées, ce qui suggère une fois encore l'indépendance des différents organes vis-à-vis de leur remobilisation azotée. Dans le cas de plantes malades comme en 2008, des mesures d'activités enzymatiques sur les tiges et les gaines pourraient être effectuées pour rechercher de petites variations de métabolisme azoté, mais cela n'a pas été le cas dans notre travail.

Un dernier point doit être clarifié: on a parlé des flux azotés internes à la plante, mais qu'en est-il de l'exportation par la sporulation du champignon ? Les chiffres présentés dans ce chapitre indiquent que les pertes d'absorption et de rendement azoté sont en moyenne de 2,3 et 6,7 mg/brin, on en déduit par différence l'ordre de grandeur de l'azote exporté dans les spores, soit 0,7 mg/brin. La littérature ne rapporte pas d'ordre de grandeur pour la septoriose. Dans le cas de la rouille brune Robert *et al.* (2004a) indiquent une teneur azotée des spores de l'ordre de 3,6 %MS et une masse émise estimée à quelques % du rendement. Dans notre cas, cela représenterait quelques mg/brin, donc légèrement supérieur à notre estimation de l'azote exporté dans les spores de septoriose. Ce chiffre, bien entendu très approximatif, est comparable à l'erreur expérimentale. On peut donc le négliger sans invalider notre conclusion qui demanderait à être vérifiée par exemple sur des peuplements sans absorption d'azote pendant le remplissage du grain.

Les résultats suggèrent que dans la plante malade comme dans la plante saine, la vitesse de remobilisation de l'azote foliaire serait fixée précocement et que les modifications source-puits ultérieures *via* des stress biotiques ne l'affecteraient pas ou peu.

2. Comparaison plantes saines et malades: le fonctionnement azoté des feuilles atteintes par la septoriose est-il très modifié par rapport aux feuilles saines ?

La section précédente a abouti à la conclusion que le fonctionnement N du reste de la plante n'est pas affecté par la maladie des feuilles, au moins jusqu'au blocage de l'azote dans les tissus nécrosés. Cette proposition repose sur l'hypothèse que la feuille malade continue à exporter son azote à un rythme inchangé malgré la progression de la maladie. On va donc chercher ici à préciser le fonctionnement de la feuille malade, notamment *via* nos analyses de marqueurs du métabolisme N, et en utilisant encore une fois le parallélisme entre les feuilles malades de 2008 avec les feuilles emballées de 2007.

Les activités liées à l'assimilation d'azote (GS et GDHd) s'effondrent dans les feuilles emballées de 2007, tout comme elles diminuent précocement dans les feuilles malades de 2008. En 2008, ces activités peuvent être mises en relation avec l'azote foliaire soit ponctuellement, soit après intégration sur tout le remplissage. Dans les deux cas, la relation est la même chez les plantes malades et les témoins. On peut en conclure que ces deux activités enzymatiques sont des marqueurs de l'état de sénescence des feuilles quelle que soit l'origine de cette sénescence (naturelle, pathologique ou chirurgicale). Le contenu en nitrates (Meyer et Stitt, 2001) et l'activité NR (Kichey *et al.*, 2006, 2007) sont classiquement reliés à l'assimilation d'azote, mais ne sont pas modifiés en 2007 parce que les conditions expérimentales placent ces deux indicateurs à zéro en l'absence d'absorption post-floraison. En 2008, la maladie n'a d'effet visible qu'à partir de la période 2, alors que l'activité NR est sur le point de s'achever. On a quand même le temps de voir que la NR diminue dans les

feuilles 2 et 3, les plus précocement atteintes. Ces variations d'activités enzymatiques et de contenu en métabolites vont donc dans le même sens que les conclusions faites sur les flux: les autres organes ne 'voient' pas que les feuilles sont malades, et les activités d'assimilation d'azote chutent prématurément chez celles-ci.

Enfin on a aussi caractérisé des activités enzymatiques marqueurs de la remobilisation de l'azote (GDHa et endoprotéases). Ces activités augmentent par rapport aux témoins dans les feuilles emballées en 2007 comme dans les feuilles malades en 2008. Ce point est en contradiction avec (1) leur exportation finale d'azote moindre, (2) notre hypothèse que les activités de remobilisation ne sont pas affectées par la maladie, et (3) la conclusion des chapitres II et III comme quoi la sénescence apicale n'est que marginalement affectée par la maladie. La contradiction est d'abord un problème d'échelle: c'est le comportement de la feuille entière qui ne change pas ou peu. Puisque des zones sont inactivées par la nécrose, il faut bien que d'autres soient suractivées. Cependant puisque la sénescence apicale n'est que marginalement affectée par la maladie, on peut en conclure que le catabolisme N reste sous contrôle même dans la feuille malade.

Les mesures ponctuelles d'activité chez les témoins n'établissent cependant pas de relation claire entre les endoprotéases et l'azote de la feuille, sa surface verte ou sa chlorophylle. Cela suggère que contrairement aux enzymes d'assimilation de l'azote, l'activité endoprotéase ne dépend pas de l'état N de la feuille. Dans le cas de la GDHa, on observe des corrélations assez mauvaises, ce qui pose le problème de leur validité. En effet les GDH sont des enzymes réversibles (Aubert *et al.*, 2001; Oaks, 1995), et leur sens aminant ou désaminant est seulement une orientation préférentielle (Masclaux, comm.pers.). Autrement dit les mesures de GDHa sont fatalement 'polluées' par les enzymes GDHd et vice versa. Bref il est possible que la faible corrélation constatée entre GDHa et état de la feuille soit un artefact lié aux GDHd. Quoi qu'il en soit, l'activité GDHa peut être rapprochée des endoprotéases parce que ses mesures ponctuelles d'activité sont mal prédites par l'état de la feuille. Ces constatations faites sur les feuilles témoins s'appliquent aussi sur les feuilles malades.

Si on intègre l'activité de la GDHa et des endoprotéases sur tout le remplissage, on constate alors une corrélation avec l'azote remobilisé par la feuille pendant cette période. Il s'agit là sans doute d'un simple problème de taille d'organe: une grosse feuille remobilisera plus d'azote et utilisera pour cela plus d'activité enzymatique. Il est intéressant de constater qu'on obtient la même pente pour la relation entre activités intégrées et azote chez les plantes saines ou malades. Le maintien de la pente suggère que les activités mesurées dans les feuilles malades ont encore quelque chose à voir avec ce qui est observé chez les témoins. Mais d'autre part les feuilles malades présentent un décalage d'origine très important par rapport au témoin. Dans un premier temps on a pensé que puisqu'une partie de l'azote est bloqué dans les feuilles malades, la relation s'appuie uniquement sur l'azote 'actif'. Cependant cette hypothèse doit être rejetée pour deux raisons. (1) Le même phénomène de décalage d'origine entre feuilles traitées ou non s'observe si on met en relation les activités intégrées avec la chlorophylle ou la surface verte. Or il y a blocage d'azote, mais pas de chlorophylle ou de surface verte. (2) Si on quantifie le décalage d'origine, on constate qu'il correspond à environ 7 mg d'azote foliaire, deux fois plus que la quantité effectivement bloquée.

Il n'est pas impossible en fait qu'une partie de ces activités enzymatiques ne proviennent pas de la plante, mais du champignon (Snoeijers *et al.*, 2000). Nos méthodes ne font pas la différence entre enzymes d'origine fongique ou végétale. Cette hypothèse peut s'appuyer sur le fait que les activités endoprotéases augmentent dès la période 1, avant même que les bilans N des feuilles ne changent (mais alors que des plages de nécroses ont déjà commencé à apparaître). Dans la relation entre azote de la feuille et activité intégrée, la présence d'une activité fongique se traduirait par un décalage d'origine sans modification de la pente, mais

avec une augmentation du bruit lié à la variabilité de la maladie. Ce dernier point demanderait à être vérifié par des mesures plus nombreuses que celles dont nous disposons.

Si les enzymes du catabolisme N sont fortement induites par la maladie (Pageau *et al.*, 2006; Perez-Garcia *et al.*, 1998; Tavernier *et al.*, 2007), voire synthétisées par le champignon lui-même (Snoeijers *et al.*, 2000), on peut se poser la question de leur impact. On a vu que, avec de larges variations liées à la variété et à l'ITK, l'absence de traitement induit un blocage dans les feuilles nécrosées de 3,6 mg/brin en moyenne, soit 20 à 50% de l'azote remobilisable chez les témoins. On pense généralement que l'azote est bloqué dans des tissus morts (Bancal et Huet, 1998; Garry *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 2004b; van den Berg *et al.*, 2007), mais il est possible aussi qu'il ait été incorporé dans le mycélium (van den Berg *et al.*, 2007) après avoir été libéré par les endoprotéases et la GDHa. Nous n'avons pas connaissance de quantification proposée par la littérature à ce sujet, mais d'après Tavernier *et al.* (2007), le champignon *Colletotrichum lindemuthianum* utilise préférentiellement la glutamine libérée par le haricot qu'il infecte. Selon notre hypothèse, il y aurait dans les zones non infectées de la feuille malade une large augmentation de la disponibilité en azote ! Cette hypothèse paradoxale expliquerait pourquoi (1) la sénescence apicale n'est que marginalement affectée par la maladie et (2) les métabolismes d'absorption et d'assimilation s'effondrent. Le maintien de la vitesse d'exportation d'azote remobilisé serait aussi en bon accord avec les observations de 2007 où on a bien noté qu'un surplus d'azote disponible ne se traduit pas par une modification de leurs exportations vers le grain.

En perspective, l'infection de plantes en l'absence d'absorption post-floraison permettrait de confirmer cette analyse dans un cadre plus simple. Nos hypothèses sur l'implication directe du champignon dans l'émission d'activités enzymatiques du catabolisme N et dans le blocage de l'azote ainsi libérés ne pourront être testées que par les outils de la biologie moléculaire, et en particulier la qPCR (Guo *et al.*, 2006). L'idée d'une large disponibilité en azote dans les feuilles malades est confortée par l'augmentation de l'ammoniac et des acides aminés dans ces tissus rapportée par la littérature (Solomon *et al.*, 2003; Walters et Bingham, 2007). On pourra aisément la vérifier sur le reliquat de nos échantillons.

Les résultats suggèrent que dans la feuille malade le métabolisme d'assimilation d'azote est prématurément remplacé par un métabolisme de dégradation. Le maintien des vitesses de sénescence apicale et d'exportation N par la feuille pourraient être expliqué en supposant que l'augmentation du catabolisme N conduit à une large disponibilité en azote dans la feuille malade. Celle-ci expliquerait aussi la disparition des activités d'assimilation d'azote.

Références bibliographiques

- Aubert S, Bligny R, Douce R, Gout E, Ratcliffe RG, Roberts JKM** (2001). Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Journal of Experimental Botany* **52**(354): 37-45.
- Bancal MO, Huet P** (1998). Fonctionnement d'un peuplement de blé d'hiver soumis à une attaque tardive de rouille brune (*Puccinia recondita*). In INRA-Editions, Les colloques, (eds), Fonctionnement des peuplements végétaux sous contraintes environnementales. Paris, pp 515-528
- Bancal MO, Roche R, Bancal P** (2008). Late foliar diseases in wheat crops decrease nitrogen yield through N uptake rather than through variations in N remobilization. *Annals of Botany* **102**(4): 579-590.
- Bancal M-O, Robert C, Ney B** (2007). Modelling wheat growth and yield losses from late epidemics of foliar diseases using loss of green leaf area per layer and pre-anthesis reserves. *Annals of Botany* **100**: 777-789.
- Bancal P** (2009). Decorrelating source and sink determinism of nitrogen remobilization during grain filling in wheat. *Annals of Botany* **103**: 1315-1324.
- Barbottin A, Lecomte C, Bouchard C, Jeuffroy M-H** (2005). Nitrogen remobilization during grain filling in wheat: genotypic and environmental effects. *Crop Science* **45**: 1141-1150.
- Ben Slimane R, Bancal P, Bancal M-O** (2009). Regulation of grain nitrogen accumulation in wheat. In F Feldmann, DV Alford and C Furk (eds), Crop resistance to biotic and abiotic factors. Proceedings of the 3rd international symposium on plant protection and plant health in Europe Berlin, Germany, pp 198-208
- Chelle M** (2005). Phylloclimate or the climate perceived by individual plant organs: What is it? How to model it? What for? *New Phytologist* **166**(3): 781-790.
- Divon HH, Fluhr R** (2007). Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiology Letters* **266**(1): 65-74.
- Garry G, Tivoli B, Jeuffroy MH, Citharel J** (1996). Effects of Ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on the translocation of carbohydrates and nitrogenous compounds from the leaf and hull to the seed of dried-pea. *Plant Pathology* **45**(4): 769-777.
- Gooding MJ, Gregory PJ, Ford KE, Pepler S** (2005). Fungicide and cultivar affect post-anthesis patterns of nitrogen uptake, remobilization and utilization efficiency in wheat. *Journal of Agricultural Science* **143**: 503-518.
- Guo J-R, F. Schnieder, Verreet J-A** (2006). Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development in wheat using a real-time PCR assay. *FEMS Microbiology Letters* **262**: 223-229.
- Hirel B, le Gouis J, Ney B, Gallais A** (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2369-2387.
- Hoffland E, Jeger MJ, van Beusichem ML** (2000). Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant and Soil* **218**: 239-247.
- Kichey T, Heumez E, Pocholle D, Pageau K, Vanacker H, Dubois F, Gouis JI, Hirel B** (2006). Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat highlight a central role for glutamine synthetase. *New Phytologist* **169**(2): 265-278.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, le Gouis J** (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* **102**(1): 22-32.
- Lers A** (2007). Environmental regulation of leaf senescence. In. S Gan, (eds) Senescence processes in plants. Annual plant reviews **26**, pp 108-144.

- Lovell DJ, Parker SR, Hunter T, Welham SJ, Nichols AR** (2004). Position of inoculum in the canopy affects the risk of *Septoria tritici* blotch epidemics in winter wheat. *Plant Pathology* **53**: 11-21.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M** (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology* **10**(s1): 23-36.
- Meyer C, Stitt M** (2001). Nitrate reduction and signalling. In: PJ Lea and JF Morot-Gaudry, (eds) Plant Nitrogen. pp 37-59.
- Oaks A** (1995). Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. *Canadian Journal of Botany* **73**(7): 1116-1117.
- Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry J-F, Masclaux-Daubresse C** (2006). The two senescence-related markers, *GSI* (cytosolic glutamine synthetase) and *GDH* (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* **57**(3): 547-557.
- Pérez-García A, Canovas F, Gallardo F, Hirel B, De Vicente A** (1995). Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 96-103.
- Pérez-García A, Pereira S, Pissarra J, Gutiérrez AG, Cazorla FM, Salema R, de Vicente A** (1998). Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta* **206**: 426-434.
- Robert C, Bancal M-O, Lannou C** (2002). Wheat leaf rust uredospore production and carbon and nitrogen export in relation to lesion size and density. *Phytopathology* **92**(7): 762-768.
- Robert C, Bancal M-O, Lannou C** (2004). Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: influence of leaf nitrogen content and *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* **94**(7): 712-721.
- Robert C, M-O. Bancal, Nicolas P, Lannou C, Ney B** (2004). Analysis and modelling of effects of leaf rust and *Septoria tritici* blotch on wheat growth. *Journal of Experimental Botany* **55**(399): 1079-1094.
- Savary S, Castilla NP, Elazegui FA, McLaren CG, Ynalvez MA, Teng PS** (1995). Direct and indirect effects of nitrogen supply and disease source structure on rice sheath blight spread. *Phytopathology* **85**(9): 959-965.
- Simon MR, Cordo CA, Perpello AE, Struik PC** (2003). Influence of nitrogen on the susceptibility of wheat to *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology* **151**: 283-289.
- Snoeijers SS, Pérez-García A, Joosten MHJ, De Wit PJGM** (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 493-506.
- Solomon PS, Tan K-C, Oliver RP** (2003). The nutrient supply of pathogenic fungi: a fertile field for study *Molecular Plant Pathology* **4**(3): 203-210.
- Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Lauge R, Reisdorf-Cren M, Langin T, Masclaux-Daubresse C** (2007). The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of Experimental Botany* **58**(12): 3351-3360.
- van Den Berg F, Robert C, Shaw MW, van Den Bosch F** (2007). Apical leaf necrosis and leaf nitrogen dynamics in diseased leaves: a model study. *Plant Pathology* **56**(3): 424-436.
- Walters DR, Bingham IJ** (2007). Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Annals of Applied Biology* **151**(3): 307-324.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générales et perspectives

Ce travail se trouve au carrefour des disciplines d'écophysiologie, d'agronomie et de pathologie végétale. L'équipe où il a été réalisé cherche à modéliser les interactions plante × pathogènes et notamment à évaluer la nuisibilité quantitative et qualitative des maladies foliaires du blé. L'objectif à court terme de mon travail était de mieux comprendre l'impact de la septoriose, causée par un champignon hémibiotrophe (*Mycosphaerella graminicola*), sur le remplissage d'azote chez le blé tendre. A plus long terme il servira pour alimenter un modèle de flux d'azote dans les plantes malades.

L'hypothèse centrale de l'équipe est que la compréhension des flux d'azote dans les plantes malades doit passer par la compréhension de leur régulation dans les plantes saines. Par conséquent, mon travail repose sur l'hypothèse que les relations de cause à effet entre le métabolisme azoté et la sénescence foliaire sont les mêmes chez les plantes saines et les malades.

Chez une plante saine, la sénescence des parties végétatives permet le remplissage des grains en azote grâce au processus de remobilisation. Cependant cette sénescence aboutit aussi à détruire les capteurs de la plante et donc à limiter l'acquisition de nouvelles ressources (assimilation nette de carbone et absorption post-floraison d'azote). La bibliographie penche plutôt pour un déterminisme de la remobilisation par les sources, mais dont les détails sont mal connus. D'autre part, la maladie entraînant une dégradation précoce des surfaces vertes, source d'azote importante, il restait à évaluer dans quelle mesure la régulation du remplissage était affectée dans ce cas. Enfin dans une perspective de modélisation de la nuisibilité, le lien restait à établir pour aller de l'expression de symptômes, variable de sortie des phytopatologistes à la baisse de surface verte, variable d'entrée des écophysiologistes.

Cette thèse comporte quatre chapitres.

➤ Dans le premier chapitre, des traitements chirurgicaux (ablation ou emballage de feuilles) ont été appliqués à des plantes saines pendant le remplissage. Les conditions étaient telles que l'absorption post-floraison était négligeable, ce qui a permis de se focaliser sur les flux de remobilisation. Les traitements appliqués reproduisent de façon extrême les perturbations apportées par la maladie: blocage de l'azote de certains tissus (ablation) ou sénescence accélérée (emballage). L'ablation diminue la disponibilité en azote dans la plante, ce qui n'est compensé par aucun autre organe végétatif, ni d'après les bilans d'azote totaux, ni au vu du métabolisme N dans les tissus. Le résultat est une diminution immédiate de la vitesse de remplissage correspondant au flux de remobilisation que les organes supprimés subissent chez les témoins. L'emballage enclenche une sénescence accélérée des feuilles concernées. Les perturbations du métabolisme N ressemblent extérieurement à celles qu'on constatera chez une feuille malade (chapitre IV). Pour la plante il s'ensuit une augmentation temporaire de la disponibilité en azote. Cependant cette disponibilité supplémentaire ne bénéficie pas aux grains dont le remplissage reste inchangé par rapport aux témoins. Le surplus temporaire d'azote est capté temporairement par les tiges et gaines dont la sénescence est légèrement retardée. Ce chapitre confirme donc que le déterminisme du remplissage est piloté par les parties végétatives, mais celles-ci ne se comportent pas exclusivement en source. D'autre part la littérature ne proposait que des conclusions basées sur des bilans, alors que mon travail s'est intéressé à des flux et a suivi en dynamique les conséquences de leur perturbation. En absence d'absorption la vitesse de remobilisation semble définie au niveau de chaque organe indépendamment de la disponibilité en azote. La façon dont cette vitesse est fixée nécessiterait un travail complémentaire.

- Dans les deux chapitres suivants, on a suivi l'évolution de la surface verte de feuilles septoriées, en distinguant la sénescence apicale de celle située autour des sites d'infection. La littérature aboutit à la conclusion générale que la sénescence est accrue par les maladies foliaires. Toutefois, ce résultat est déduit de la baisse de surface verte, ce qui prête à la confusion entre les symptômes de la maladie, et la sénescence naturelle *per se*. Ceci soulève la question de la notation de la maladie d'une part et des origines de la baisse de surface verte d'autre part. Les deux chapitres centraux de ma thèse sont construits sur l'hypothèse que trois types de sénescences sont juxtaposés chez les feuilles malades. (1) Autour des sites d'infections, la transition nécrotrophe du champignon aboutit à l'apparition d'une zone nécrosée développant des pycnides. (2) Les plages de sénescences débordent de cette zone à pycnides, ce qui suppose l'existence d'une sénescence locale induite. (3) Enfin ces feuilles restent soumises à la sénescence naturelle, qui chez les graminées progresse à partir de la pointe des feuilles (sénescence apicale). En inoculant à la base des feuilles on peut donc supposer que leur sénescence apicale reste indemne d'effet direct du champignon. L'objectif central des chapitres II et III est l'analyse comparée des différents types de sénescence. Ces chapitres comparent des inoculations en conditions contrôlées (chapitre II), et l'évolution de la maladie au champ, soit après inoculation, soit par l'épidémie naturelle (chapitre III). Dans le chapitre II on a fait varier l'intensité de la maladie en jouant sur les combinaisons génétiques entre variété de plantes et isolats de champignon. Dans le chapitre III c'est plutôt la gamme de sénescence apicale qu'on a explorée en jouant sur la conduite agricole des couverts infectés. Dans les deux cas, la sénescence apicale semble peu et tardivement affectée par la maladie. Les effets ne semblent pas significatifs dans l'expérience en conditions contrôlées, tandis qu'au champ, les corrélations obtenues sont faibles de l'ordre de $r^2 = 0,3$ et les pentes peu importantes. On pourrait donc négliger l'effet de la maladie sur la sénescence apicale, du moins avant la coalescence des surfaces malades avec la sénescence apicale. Cela simplifierait considérablement les perspectives de modélisation, car la sénescence apicale est celle qui est liée à la remobilisation d'azote par la feuille. Donc si la sénescence apicale n'est pas affectée par la maladie avant la coalescence, cela suggère que les flux d'azote remobilisés depuis une feuille infectée sont équivalents à ceux d'une plante saine. L'importance de la surface malade n'interviendrait que tardivement, quand celle-ci coalesce avec la surface apicale: il est probable que c'est le moment où l'azote des limbes reste bloqué (voir conclusion sur le chapitre IV).

Plus d'information reste cependant requis sur l'évolution de la surface malade. En effet, aussi bien les bilans d'azote en dépendent, mais aussi les flux de carbone qui sont directement liés à la baisse de surface verte. Nos données indiquent que la surface malade s'ajuste soit à une exponentielle en épidémie naturelle, soit à une sigmoïde après inoculation. Dans ce cas la zone finalement contaminée est toujours légèrement supérieure à la zone inoculée, ce qui suggère que l'influence du champignon ne s'étend qu'assez peu au-delà des sites d'infection. Nos photos de feuilles ne nous permettent pas de distinguer la zone à pycnides de la sénescence locale induite. Or la bibliographie suggère que ces deux éléments de la surface malade ont un déterminisme différent. Notre travail demanderait donc à être prolongé en utilisant des photos à haute résolution et des dosages de champignon par qPCR.

- Dans le dernier chapitre, on a tenté de caractériser le métabolisme de la feuille malade et ses répercussions sur les flux dans la plante entière en s'appuyant sur la comparaison avec les données du chapitre I. D'après l'évolution de son azote, on a d'abord distingué trois périodes dans l'évolution d'une feuille infectée. Pendant la première période, bien que la surface verte commence à décroître, l'azote ne semble pas encore affecté. La deuxième période correspond à une baisse du contenu en azote des feuilles malades nettement plus rapide que chez le témoin. Enfin la troisième période correspond à un blocage d'azote dans

la feuille malade, alors que le témoin continue à se vider jusqu'à atteindre des résidus très inférieurs en fin de remplissage. Le traitement individuel de tous les étages foliaires, montre que ces différentes périodes sont légèrement décalées entre feuilles, comme le sont maladie et sénescence apicale. La vitesse de remplissage des grains ne semble pas affectée pendant les deux premières périodes, car l'accélération du vidage des feuilles malades coïncide avec une diminution équivalente de l'absorption par les plantes. Le passage des feuilles en période 3 s'accompagne d'un arrêt du remplissage plus progressif et plus précoce que chez le témoin. Ces résultats suggèrent que dans la plante malade comme dans la plante saine, la vitesse de remobilisation de l'azote foliaire serait fixée précocement et que les modifications source-puits ultérieures *via* des stress biotiques ne l'affecteraient pas ou peu.

Une originalité du chapitre IV réside dans le suivi des activités des enzymes majeures caractérisant l'assimilation et la remobilisation d'azote afin de fournir une description plus fine du flux d'azote à partir des différents étages foliaires en post-floraison. La perturbation métabolique la plus précoce est une augmentation des endoprotéases (fongiques et/ou végétales) dès la période 1. On observe ensuite dans les feuilles malades en période 2 une transition précoce d'un métabolisme orienté vers l'assimilation d'azote à un métabolisme orienté vers la dégradation. Les données métaboliques confirment les observations tirées des bilans d'azote totaux. C'est la disparition de l'activité NR qui entraîne l'arrêt de l'absorption et explique la chute de la teneur azotée qui caractérise la période 2. Le maintien des vitesses de sénescence apicale et d'exportation N par la feuille malade malgré sa réduction de surface verte pourrait être expliqué en supposant que l'augmentation du catabolisme N conduit à une large disponibilité en azote dans la feuille malade. En effet on a vu au chapitre I que lorsque la disponibilité azotée augmente, la vitesse d'exportation reste constante.

La transition vers la période 3 s'accompagne d'un blocage d'azote important dans les feuilles. Les données du chapitre I indiquent qu'une sénescence très accélérée (dans le cas des feuilles emballées) augmente à peine le résidu non remobilisé. Donc on peut exclure que le blocage d'azote dans les feuilles malades soit lié à leur accélération de sénescence. Une hypothèse serait que cet azote ne soit pas remobilisable par la plante parce qu'il a été assimilé par le champignon. On pourrait vérifier cette hypothèse en réalisant des dosages comparatifs de l'azote résiduel dans la zone malade en comparaison de la zone morte par sénescence apicale.

Du point de vue méthodologie, une perspective intéressante, à court terme, serait de revisiter les archives de photos de feuilles malades scannées (expérimentations de MO. Bancal depuis 1995) notamment pour les trois dernières feuilles qui sont très importantes pour le remplissage du grain et dont une ébauche de résultats est déjà fournie dans ce travail. Cette procédure permettrait de s'assurer au niveau de la plante que la transition en période 2 s'accompagne systématiquement de l'arrêt de l'absorption, et au niveau de la feuille que la transition en période 3 coïncide avec la coalescence des surfaces mortes.

Dans cette même ligne, une autre perspective urgente est l'amélioration du dispositif de prise de photos pour une meilleure netteté pour pouvoir distinguer les pycnides. Cette méthode sera complétée à long terme par des qPCR, qui est fortement corrélée au nombre de pycnides, sur des échantillons de feuilles malades, afin de pouvoir aborder la question du déterminisme des deux types de surfaces malades, à pycnides ou non.

L'amélioration du dispositif expérimental pour l'inoculation au champ s'impose aussi, afin de mieux rapprocher les témoins des plantes malades. Ceci concerne aussi bien l'hétérogénéité de la parcelle, qui perturbe la comparaison de zones traitées ou non par les fongicides, que les conditions d'inoculation suspectes d'effets indésirables sur la sénescence foliaire.

Concernant le dosage de marqueurs métaboliques, d'autres expérimentations sont nécessaires pour confirmer les résultats obtenus. Dans ce même contexte, nous avons dosé l'activité de la GS totale, alors que la remobilisation N est corrélée avec la GS1. Par conséquent, il serait judicieux de compléter ces dosages par une northern blot pour analyser les ARNm de la GS1. Enfin, une dernière perspective à long terme sera de modéliser le flux d'azote chez les plantes malades en tenant compte de la non-accélération de la sénescence apicale, et après confirmation des résultats obtenus sur les activités enzymatiques. Cette modélisation sera le moyen d'hierarchiser les processus impliqués directement ou indirectement dans la réponse à la septoriose.

ANNEXES

Ben Slimane R, Bancal P, Bancal M-O; Regulation of Grain N Accumulation in Wheat. In: Feldmann F, Alford DV, Furk C: Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors (2009), 198-208; ISBN 978-3-941261-05-1; © Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Germany

3-42 Regulation of Grain N Accumulation in Wheat

Ben Slimane R, Bancal P, Bancal M-O
 INRA, UMR 1091 INRA/INAPG Environnement et Grandes Cultures, F-78850 Thiverval
 Grignon, France
 Email: bancal@grignon.inra.fr

ABSTRACT

Grain filling regulation is disturbed when late crop management or pest attacks occur, because of source/sink ratio variation. In order to strongly modify fluxes of remobilized nitrogen (N) during grain filling, leaf blades 2 and 3 were either wrapped with aluminium foil or cut one week after anthesis. The evolution of green area, dry matter (DM), and N in all organs were followed from heading to full maturity in wheat crops managed under two levels of N fertilization in field.

Both leaf treatments resulted in an immediate two third loss of green area, without affecting either the green area of untreated leaves (flag leaf and lower leaves) or their green duration. Net assimilation rate was also reduced similarly, and grain DM filling rate declined immediately to the same extent.

N uptake was very low in control and not affected by leaf treatments, which differed in the fate of remobilized N from leaf blades 2 and 3. This N was 15% of final grain N in control; it was lost in cutting treatment, whereas N from wrapped blades was suddenly released and accumulated in stems and sheaths. Conversely these organs didn't compensate for the lack of remobilized N from cut leaves. Therefore grain N filling rate remained unchanged after wrapping treatment as compared to control, while it was immediately reduced after cutting treatment. It is concluded that grain filling by remobilized N was up-regulated by stem and sheaths, without on-line control by grains.

INTRODUCTION

Grain protein content (GPC) is one of the main determinants of wheat international market price. Late nitrogen (N) fertilization is the common practice used to produce a high GPC. However this goal can be achieved only by ensuring crop protection through high levels of pesticides. A major challenge of modern agriculture is to limit the excessive use of chemicals and at the same time to improve grain quality without affecting yield. Attention should thus be

paid to N remobilization, the process by which nutrients are translocated from vegetative organs to grains during the post-anthesis period. In wheat, up to 60-90% of grain nitrogen is provided by N remobilization during grain filling, while a lesser fraction comes from post-anthesis N absorption (Kichey *et al.*, 2007). Thus, it is clear that N remobilization is highly involved in grain filling, but it is disturbed when late crop management or pest attacks occur (Bancal *et al.*, 2008).

Late foliar diseases indeed primarily induce early green surface inactivation, but perhaps also an accelerated senescence of surrounding tissues, thus temporarily increasing N availability and severely affecting source/sink ratio in crops. Late fertilization effects are not straighter, as vegetative organs are not only sources, but also temporary sinks. Indeed ¹⁵N labeling studies indicate that N absorbed after anthesis is competitively incorporated in vegetative parts (Oscarson, 1996; Kichey *et al.*, 2007). Late fertilization commonly results in a delayed (Martre *et al.*, 2006) or reduced N remobilization (Gooding *et al.*, 2007). To improve plant N economy it is thus needed to clarify the relative roles of vegetative organs as both source for N remobilization and temporary sink for N either derived from senescing tissues or from late N uptake. However, N fluxes changing with time should be studied, not only N balances from anthesis to maturity.

In many previous works that dealt with manipulating sinks or sources, only the source/sink ratio was considered, assuming that a reduction of source availability was equivalent to an increase of sink demand and reciprocally. However, according to Bancal & Soltani (2002), the response curve relating sink and source activities is non linear, and consequently the source/sink ratio could be a misleading index. Therefore sinks and sources should be manipulated independently. This paper studied the regulation of grain N filling, avoiding any variation in post-anthesis absorption while varying N availability through manipulating N remobilization of vegetative plant organs. This was achieved by wrapping or cutting both second and third leaf blades at the start of rapid grain filling. These two leaves were important sources for both dry matter (through photosynthesis) and N (through remobilization) during grain filling. Leaf cutting resulted in the sudden loss of these sources, whereas leaf wrapping induced an accelerated senescence of tissues, and thus a temporarily exaggeration of these sources. However, other vegetative plant parts, such as the first untreated leaf, the stem and the chaff might counteract the induced variation in N availability, the extent of which was estimated in this study.

MATERIALS AND METHODS

Field experiment

Winter wheat (*Triticum aestivum*) cv. Cap Horn was sown on October 26th, 2006 in an experimental field of INRA at Thiverval-Grignon, France at a density of 250 seeds /m². Two levels of nitrogen fertilization were applied before flowering thus leading to a nitrogen nutrition index (NNI) at 0.5 and 0.8 respectively around anthesis. Six treatments were

conducted, where a treatment is a combination of two factors: nitrogen fertilization and abiotic stress applied post-anthesis (leaf wrapping, partial defoliation or control).

Leaves were numbered downward from 1 to 4. On May, 23th, 2007 (121 °Cd after anthesis), 300 shoots per treatment were tagged based on their ear length close from the main shoot average, as previously measured in plots. Then, treatments were applied: leaf blades 2 and 3 were either wrapped in aluminium foil, or cut at the ligule, or saved as control.

Plant sampling and assessments

Fifteen plants were sampled weekly from heading (-79 °Cd) to full grain maturity (949 °Cd) and shared into three replicates, from which organs were separated in leaf blades, stems plus surrounding sheaths, and ears. The leaf blades, when still green, were scanned and then total and green leaf areas were measured by image analysis. The leaf blades were recuperated and lyophilized. Ears were also lyophilized, whereas the stems were oven dried. Dry matter (DM) was weighed from all organs. Once ears had been lyophilized, chaff and grains were separated and weighed, and grain numbers determined. Finally, all organs were lyophilized again and ground to a fine powder in preparation for subsequent analyses of the total N content, using the Dumas combustion method.

RESULTS

Evolution of green leaf area as well as DM and N amount in all organs were assessed from -79 °Cd till 949 °Cd. Two way ANOVA was calculated for each organ at each sampling date. The effect of crop NNI was commonly very significant, while the effect of leaf treatments appeared only in some cases (never before 138 °Cd, one day after they were done), and interactions between crop NNI and leaf treatments almost never occurred.

Green leaf area evolution

At anthesis, the green blade areas were 81 ± 5 cm² per shoot in the NNI 0.5 plot vs. 105 ± 4 cm² per shoot in the NNI 0.8 plot, from which blades 2+3 contributed one half in both cases. ANOVA (table 1) indicated that until 337 °Cd green leaf area remained significantly higher in the NNI 0.8 plot than in the NNI 0.5 plot. At 138 °Cd, one day after treatment started, the wrapped leaves not yet differed from the control. One week later, wrapped leaves had a yellow-green color which was assessed as green by the image analysis; therefore no significant difference to control appeared (Figure 1). Later, green area in wrapped leaves decreased sharply until 337 °Cd, while it continued to decline smoothly until 720 °Cd in untreated leaves. Therefore green area was significantly lower ($P < 0.1\%$) in wrapped leaves 2+3 from 337 °Cd to 599 °Cd (table 1). In the other, untreated, leaf blades (flag leaf and lower leaves) leaf treatments of blades 2+3 had no significant effect ($P > 1\%$) at any sampling date. Thus the green duration of untreated blades was neither accelerated nor slowed down by both leaf treatments.

Table 1. Effect of NNI and leaf treatments on the evolution of green areas.

Sampling Date (°Cd)	NNI Effect		Treatment Effect		Interaction N×T	
	Green area of blades 2+3	Green area of other blades	Green area of blades 2+3	Green area of other blades	Green area of blades 2+3	Green area of other blades
-79	***	***	NS	NS	NS	**
12	**	***	NS	NS	NS	NS
138	***	***	NS	NS	NS	NS
227	*	**	NS	NS	NS	NS
337	*	*	***	NS	NS	NS
470	NS	NS	***	NS	NS	NS
599	NS	***	**	NS	NS	NS
720	NS	NS	NS	NS	NS	NS
840	nd	nd	nd	nd	nd	nd
949	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Multiple factor ANOVA was carried out at each sampling date fully crossing crop NNI (N) and leaf treatment (T) effects. First order interaction between factors was examined (N×T). A probability lower than 1% denotes a significant effect of a treatment or an interaction, with *: 0.1% < p < 1%; **: 0.01% < p < 0.1%; ***: p < 0.01%; NS denotes non significant effects. nd refers to data not available (green areas later than 720 °Cd after anthesis).

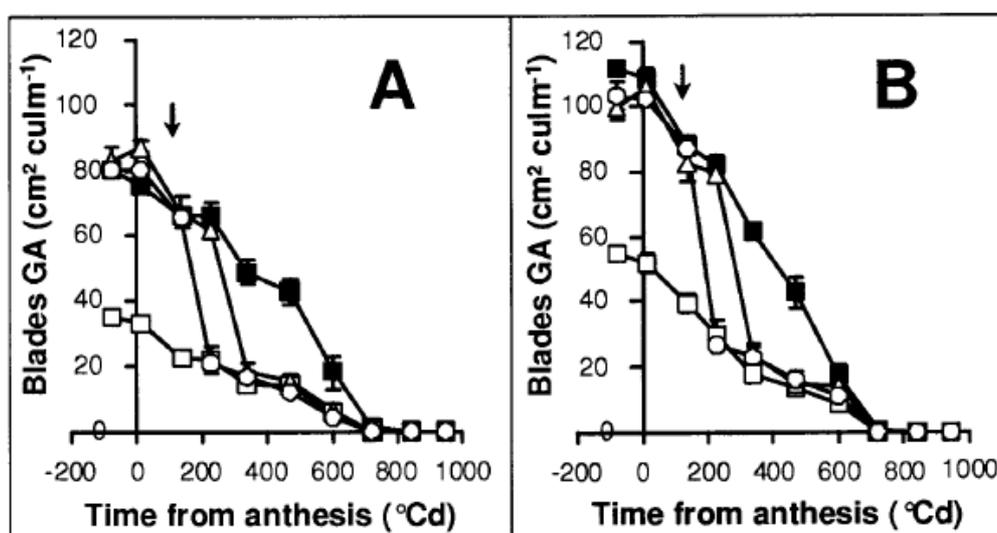


Figure 1. Evolution of total Green Area (GA) of the leaf blades in the NNI 0.5 plot (A) and in the NNI 0.8 plot (B). Controls are indicated by filled squares. One week after anthesis leaf blades 2 and 3 were either wrapped with aluminum foil (open triangle or cut at the ligule (open circles). The GA of upper and lower leaves (excluding blades 2+3) in control is reported by open squares. Arrows indicated the time of treatments. Bars are standard deviations of plotted means of triplicates

Total above-ground plant parts

The DM of above ground parts was $2.9 \pm 0.2 \text{ g-culm}^{-1}$ at heading and increased later, becoming higher in the NNI 0.8 plot than in the NNI 0.5 plot from 337 °Cd (table 2). DM was also higher in control than in leaf treated plants from 599 °Cd, without interaction between NNI and leaf treatment. No significant differences were recorded between wrapping and cutting treatment. In the NNI 0.8 plot, DM increased quite linearly from 138 °Cd to 720 °Cd and a mean rate for net assimilation was calculated. This rate was statistically higher ($P < 1\%$) in control than in either wrapping or cutting treatment, which did not differ together (2.4 ± 0.3 vs. $1.8 \pm 0.2 \text{ mg-culm}^{-1}\cdot\text{°Cd}^{-1}$, respectively).

Table 2. Two way ANOVA for the effect of NNI and leaf treatments on above ground DM and N at the varying sampling dates.

Sampling Date (°Cd)	NNI Effect		Treatment Effect		Interaction N×T	
	Above ground DM	Above ground N	Above ground DM	Above ground N	Above ground DM	Above ground N
-79	**	***	NS	NS	NS	NS
12	NS	***	NS	NS	NS	NS
138	NS	***	NS	NS	NS	NS
227	NS	***	NS	NS	NS	NS
337	*	***	NS	NS	NS	NS
470	NS	***	NS	NS	NS	NS
599	**	***	*	NS	NS	NS
720	**	***	**	NS	NS	NS
840	***	***	*	NS	NS	NS
949	*	***	*	NS	NS	NS

At heading, the N amount in above ground parts was $29 \pm 1 \text{ mg-culm}^{-1}$ in the NNI 0.5 plot. It was very significantly higher at $40 \pm 1 \text{ mg-culm}^{-1}$ in the NNI 0.8 plot ($P < 0.01\%$), and this difference was maintained until 720°Cd, when N in above ground parts stabilized. Conversely, leaf treatments never had an effect ($P > 1\%$), and no interaction was shown. Regression lines of N with time were obtained from 138 °Cd until 720 °Cd, and statistical comparison of their slopes did not indicate any significant effect of leaf treatments ($P > 10\%$). The average rate of net N uptake was therefore $8 \pm 1 \mu\text{g-culm}^{-1}\cdot\text{°Cd}^{-1}$ in the NNI 0.5 plot vs. $10 \pm 1 \mu\text{g-culm}^{-1}\cdot\text{°Cd}^{-1}$ in the NNI 0.8 plot.

Nitrogen amount evolution in vegetative parts

Within control plants, leaf blades 2+3 lost N quite linearly from 138°Cd to full maturity (Figure 2A). The mean rate for remobilization was $-6 \pm 0.2 \mu\text{g}\cdot\text{culm}^{-1}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ in the NNI 0.5 plot vs. $-11 \pm 1 \mu\text{g}\cdot\text{culm}^{-1}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ in the NNI 0.8 plot. The direct N lack by cutting treatment on grain filling was thus not negligible, representing 10 to 15% of the final grain N. The N amount decreased abruptly in wrapped leaves 2+3 from the start of treatment leading to a very significant effect of wrapping ($P < 0.01\%$) by ANOVA after 237 °Cd (table 3). Interactions with NNI of the crop were observed only after 599 °Cd, when leaves were N-depleted. The maximum rates of N remobilization occurred during the first week after wrapping: it reached $-26 \pm 3 \mu\text{g}\cdot\text{culm}^{-1}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ in the NNI 0.5 plot vs. $-41 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{culm}^{-1}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ in the NNI 0.8 plot, around four fold more ($P < 0.01\%$) than in control. Therefore wrapping treatment resulted in an earlier N release from leaves 2+3, thus increasing N availability in other plant parts. But this enhancement was transient (figure 2A), as N amount stabilized rapidly in wrapped leaves 2+3, while it still declined at a constant rate in control. After 599 °Cd, control leaves were slightly more N-depleted than wrapped leaves. Since the difference was significant only in the NNI 0.8 plot, interactions were observed between NNI and leaf treatment (table 3).

Table 3. Two way ANOVA for the effect of NNI and leaf treatments on the evolution of N in leaf blades 2+3, in mixed stem and sheaths, and in other vegetative parts (VP).

Date (°Cd)	NNI Effect			Treatment Effect			Interaction N×T		
	Blades 2+3	Stem + sheaths	Other V.P.	Blades 2+3	Stem + sheaths	Other V.P.	Blades 2+3	Stem + sheaths	Other V.P.
	N	N	N	N	N	N	N	N	N
-79	***	***	***	NS	NS	NS	*	NS	NS
12	***	***	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS
138	***	***	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS
227	**	***	***	***	**	NS	NS	NS	NS
337	***	***	***	***	**	NS	NS	NS	NS
470	***	***	***	***	*	NS	*	NS	NS
599	***	***	***	***	**	*	NS	NS	*
720	***	**	***	**	NS	NS	***	NS	NS
840	***	***	***	***	NS	*	NS	NS	*
949	***	***	*	***	NS	NS	**	NS	NS

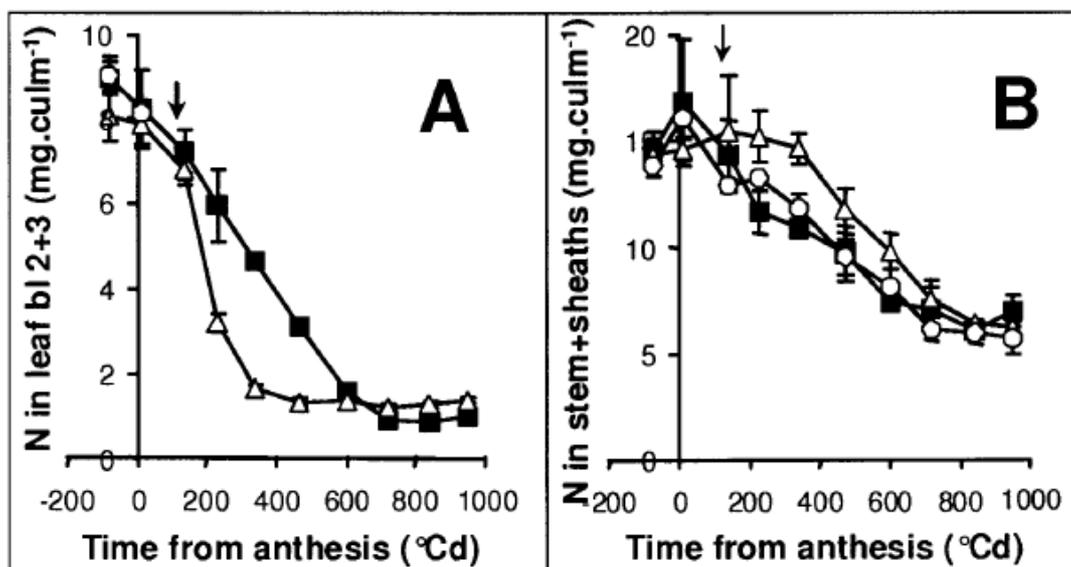


Figure 2. Evolution of Nitrogen in leaf blades 2+3 (A), and in stem + sheaths (B) within the NNI 0.8 plot. Symbols are as in figure 1. No open circles could be plotted on figure 2A after the cutting treatment was done

In stem and sheaths N was remobilized less rapidly after leaf wrapping (figure 2B), and its amount was higher ($P < 0.1\%$) than that of control from 227 until 599 °Cd. The N amount then declined rapidly in stem and sheaths of wrapped leaf treatment, lastly stabilizing at the same level as in the other treatments. Stem and sheaths could then be regarded as temporary reservoirs for N released from wrapped leaves 2+3. Conversely stem and sheaths did not compensate for the lack of remobilized N from cut leaves 2+3, as no difference was found to control on any sampling date (table 3). The other vegetative parts (upper and lower untreated leaf blades and chaff), were not significantly affected by treatments ($P > 1\%$).

Grains

The effect of NNI on grain N was significant at each sampling date, while the effect of leaf treatment appeared at 337 °Cd without interactions with NNI (table 4). Final grain N yield in control was 28 ± 2 mg.culm⁻¹ in the NNI 0.5 plot vs. 38 ± 2 mg.culm⁻¹ in the NNI 0.8 plot, respectively. N accumulated quite linearly in grains until 720 °Cd, and the mean grain N filling rate was not different ($P > 10\%$) in control and wrapping treatment, at 36 ± 1 $\mu\text{g.culm}^{-1}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ within NNI 0.5 plot vs. 51 ± 1 $\mu\text{g.culm}^{-1}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ within NNI 0.8 plot. In cut leaf treatment, grain N filling rate was significantly lower than in control ($P < 0.01\%$) at 28 ± 1 $\mu\text{g.culm}^{-1}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ in the NNI 0.5 plot vs. 41 ± 1 $\mu\text{g.culm}^{-1}\cdot^{\circ}\text{Cd}^{-1}$ in the NNI 0.8 plot. Thus cutting leaves 2+3 likely reduced immediately the grain N filling rate whereas wrapping those leaves did not have significant effect at any time on the grain N.

Unlike observed for N, no difference was identified throughout in grain DM between wrapped and cut leaf treatments. At 470 °Cd and later, the DM of grains from leaf-treated plants was

very highly significantly ($P < 0.01\%$) lower than that of control plants. The difference at maturity reached $0.2 \pm 0.1 \text{ g-culm}^{-1}$ in the NNI 0.5 plot vs. $0.3 \pm 0.1 \text{ g-culm}^{-1}$ in the NNI 0.8 plot, respectively. In the 0.8 NNI plot, grain DM increased quite linearly from 138 °Cd until 720 °Cd, and grain DM filling rate was very significantly ($P < 0.1\%$) higher in control than in either cutting or wrapping treatment (3.8 ± 0.1 vs. $3.2 \pm 0.1 \text{ mg-culm}^{-1}\cdot\text{°Cd}^{-1}$). Thus the decrease in rate of grain DM filling was the same as the decrease in net assimilation rate, what was suggested by the absence of effect of leaf treatments on the DM of vegetative parts. Actually apart of the grain, only the treated leaves 2+3 were significantly affected in their DM by treatments. But DM variation in those leaves amounted less than 3% of final grain DM, and therefore their effect on grain filling was not detectable.

Table 4. Two way ANOVA for the effect of NNI and leaf treatments on grain DM and N at the varying sampling dates.

Sampling Date (°Cd)	NNI Effect		Treatment Effect		Interaction N×T	
	Grain DM	Grain N	Grain DM	Grain N	Grain DM	Grain N
-79	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
138	NS	*	NS	NS	**	***
227	NS	*	NS	NS	NS	NS
337	*	***	*	*	NS	NS
470	*	***	NS	*	NS	NS
599	***	***	***	***	**	*
720	***	***	***	***	NS	NS
840	***	***	***	**	NS	NS
949	**	***	**	*	NS	NS

“nd” refers to data not available (grains earlier than 138 °Cd after anthesis).

DISCUSSION

In wheat, after anthesis, literature identified one main N sink (grain filling), and two main N sources (N remobilization and post-anthesis N uptake), but there are some indications that vegetative organs may also be temporary N sinks, thus competing with grain filling. In this paper, a more clear understanding of the way grain N filling is regulated was investigated by altering only N remobilization through either leaf wrapping or leaf cutting. The experiment was moreover carried out at low crop N nutrition in order to minimize post anthesis N uptake. Two levels of crop nutrition, with NNI at 0.8 and 0.5 respectively, were studied to look on their possible interaction with treatments, *i.e.* to assess if N shortage induced qualitative changes in N partitioning. The ANOVA indicated that the extent of N shortage did not change qualitatively the results of leaf treatments. However, as 0.8 NNI crops could remobilize more N than 0.5 NNI crops, the trends in data were clearer in the first case.

Effects of leaf treatments on DM fluxes

The two treatments (leaf cutting or wrapping) were not different from a DM point of view. Carbon net assimilation was reduced following both treatments by one third as compared to control. The reduction of net assimilation was not compensated by DM remobilization from vegetative organs. Consequently grain DM filling rate declined immediately after leaf treatments were applied, and to the same extent as net assimilation decrease. No compensatory change in grain filling duration was observed, and final grain DM was then significantly lower than that of the control, which was commonly observed in both defoliation or shading experiments (Martinez-Carasco & Thorne, 1979; Guitman *et al.*, 1991; Ma *et al.* 1996).

Effects of leaf treatments on N fluxes

In our experiment, N uptake was very low, amounting less than 20% of final grain N, approximately the same level as N remobilization from the roots (Andersson & Johansson, 2006). The part of true N absorption in N uptake was thus likely at zero because of the low N availability in the soil. Therefore the path of N remobilized from organs was not hidden by any variation in N absorption, which may explain paper discrepancies with previous studies. For instance, N uptake was neither accelerated nor slowed down by our leaf treatments whereas N absorption is frequently reduced when flag leaf is removed (Guitman *et al.*, 1991).

In defoliation experiments, N from excised leaves is lost, and obviously final grain N is always lowered. Literature suggests that moreover N remobilization in remaining organs could be impaired. Guitman *et al.* (1991) reported that both N and soluble protein decreased later in remaining leaves following flag leaf excision. Ma *et al.* (1996) indicated that following a complete defoliation, the nitrogen concentration at grain maturity was higher in chaff and stem. In spite of this, when leaves 2 and 3 were cut in our experiment, neither remaining leaves nor stem or chaff exhibited either lower or delayed N remobilization. However, N remobilization from vegetative tissues is actually the balance between N input and output from N uptake. In defoliation studies where N absorption was not nil, the part of N uptake available for removed leaves could be re-allocated to the remaining organs, thus delaying the time for net N decrease in these receiving vegetative organs. In our study, the weakness of N uptake allowed exhibiting that vegetative organs did not react to defoliation by any change in their N output. As a result, the rate of grain N filling immediately declined after leaf cutting. Moreover it did it at the same extent as N remobilization rate from control leaves 2 and 3, which clearly advocated against a sink regulation of grain N filling.

In wrapping treatment, N from darkened leaves 2 and 3 was suddenly released, thus temporarily increasing the fluxes of remobilized N. However this increased N availability did not result in any change in grain N filling. Released N was instead entrapped for a while in stem or in sheaths. This N was further remobilized from stem plus sheaths, so that the final grain N was the same as in control. It might suggest a sink regulation of grain N filling rate in opposition with defoliation results. Data could however be interpreted in the frame of source regulation, providing "source" would be segmented: stem and sheaths were downstream as compared to wrapped leaves (actually blades). Following wrapping treatment, stem and

sheaths received enhanced N inputs, and as commonly observed following late fertilization, they were able to temporarily incorporate them, resulting in a delayed net remobilization pattern. However, late fertilizations also result in an enhanced rate of grain N filling, what we did not observe, even for a while. It could be hypothesized that in our study the fluxes of remobilized N were small enough to be fully entrapped by stem and sheaths, which would be overflowed under high fertilization. Indeed, the extra-flux of remobilized N amounted $30 \mu\text{g } ^\circ\text{Cd}^{-1}$ during the first week after wrapping in the 0.8 NNI plot, far below N uptakes reached under high fertilization (around $100 \mu\text{g } ^\circ\text{Cd}^{-1}$).

Conclusion

Under our experimental conditions, without post anthesis N uptake, N released by leaf senescence seemed delivered to grains with up-regulation by stem or sheaths. Lowering of N availability resulted in lower grain filling rate, whereas increase of N availability was leveled through temporary storage. Paper suggests that any variation in N remobilization by diseased leaves would not modify the senescence of other leaves. Variation in DM yield could thus be obtained from decrease in green surface. As this experiment thus mimicked part of fungus-induced disorders -i.e. induced senescence-, although in an accelerated way and without pure pathogenic effects, further works are needed to precise variations in N yield, concerning possible accelerated remobilization from infected organs, and also the impact of disease on post anthesis absorption.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mrs. J Jean-Jacques and M. P Belluomo for technical assistance in the trials work undertaken.

REFERENCES

- Andersson A; Johansson E (2006). Nitrogen partitioning in entire plants of differing spring wheat cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* 192, 121-131.
- Bancal M O; Roche R; Bancal P (2008). Late foliar diseases in wheat crops decrease nitrogen yield through N uptake rather than through variations in N remobilization. *Annals of Botany* 102, 579-590.
- Bancal P; Soltani F (2002). Source-sink partitioning. Do we need Münch? *Journal of Experimental Botany* 53, 1919-1928.
- Gooding M J; Gregory P J; Ford K E; Ruske R E (2007). Recovery of nitrogen from different sources following applications to winter wheat at and after anthesis. *Field Crop Research* 100, 143-154.
- Guitman M R; Arnozis P A; Barneix A J (1991). Effect of source-sink relations and nitrogen nutrition on senescence and N remobilization in the flag leaf of wheat. *Physiologia Plantarum* 82, 278-284.

- Kichey T; Hirel B; Heumez E; Dubois F; Le Gouis J (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic and nitrogen physiological markers. *Field Crop Research* 102, 22-32.
- Martinez-Carrasco R; Thorne G N (1979). Physiological factors limiting grain size in wheat. *Journal of Experimental Botany* 30, 669-679.
- Ma Y Z; MacKown C T; Van Sanford D A (1996). Differential effects of partial spikelet removal and defoliation on kernel growth and assimilate partitioning among wheat cultivars. *Field Crop Research* 47, 201-209.
- Martre P; Jamieson P D; Semenov M A; Zyskowski R F; Porter J R; Tribouï E (2006). Modelling protein content and composition in relation to crop nitrogen dynamics for wheat. *European Journal of Agronomy* 25, 138-154.
- Oscarson P (1996). Transport of recently assimilated ¹⁵N nitrogen to individual spikelets in spring wheat grown in culture solution. *Annals of Botany* 78, 479-488.

INRA Regulation of Grain N Filling in Wheat

Ben Slimane R., Jean Jacques J., Bancal P., Bancal M.O.



Context:

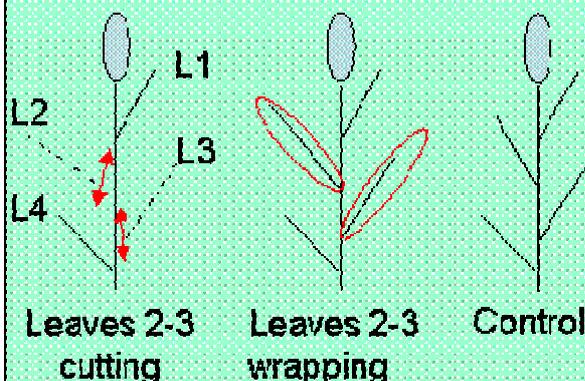
- Modeling the response of grain N filling to stress needs to account for the regulation of N fluxes in plant.
- N remobilization is highly involved in grain N filling and thus altered by late pest attacks

Objective:

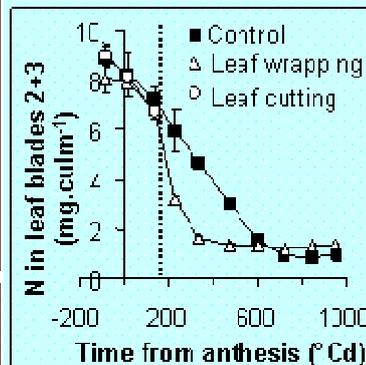
Studying the regulation of grain N filling while varying the availability of N remobilized from vegetative organs

Materials and methods

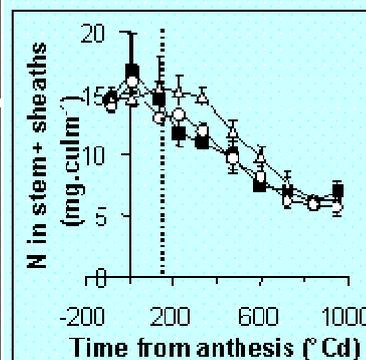
- Variety: Cap Horn
- 2 nitrogen nutrition levels (NNI 0.5, NNI 0.8)
- No post-anthesis N uptake
- 3 treatments at 200 °Cd post anthesis



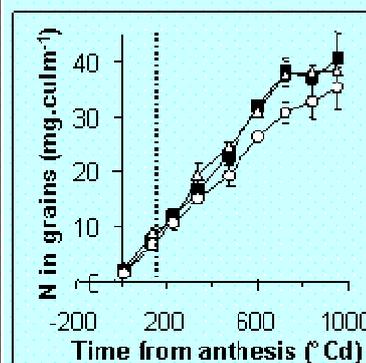
Results: N pattern in NNI 0.8 plot



N release from wrapped leaves increased N availability for the other plant parts while N from cut leaves was lost



N immediately accumulated in stems and sheaths following leaf 2-3 wrapping, while it wasn't affected after leaf cutting



Grain N filling rate immediately reduced by leaves 2-3 cutting, while it wasn't affected by leaf wrapping

Conclusions

Grain filling by remobilized N was up controlled by stem and sheaths not by grains.

↓ N availability ≈ Leaf cutting → Grain filling rate immediately reduced
N remobilization not affected

↑ N availability ≈ Leaf wrapping → Grain N filling not affected,
temporary storage in stems and sheaths



Impact of septoria disease on apical senescence in wheat



Ben Slimane R., Suffert F., Jean Jacques J., Bancal P., Bancal M.O.

Context. Septoria (*S.tritici*), the most damaging wheat disease in north Europe causes yield and grain quality loss through the loss of green leaf area. This should be decorrelated into symptoms, apical and local senescence with an objective of modeling.

Objective. Clarifying the impact of septoria on apical senescence dynamics: is it accelerated or anticipated or conserved in diseased leaves in comparison with healthy ones?

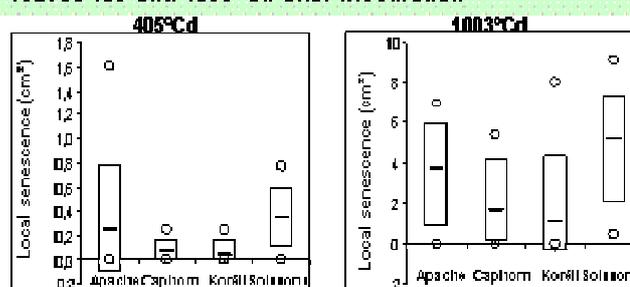
Materials and methods.

- Combining 4 wheat varieties with 4 septoria isolates
- Inoculating flag leaves on 2 cm² at a 10⁵ spore/ml dose
- Non destructive assessing of septoria lesions and apical senescence by taking numerical photos via a closed device; image analysis using Assess software (Lamari L., 2002)
- Log-transformed data of apical senescence

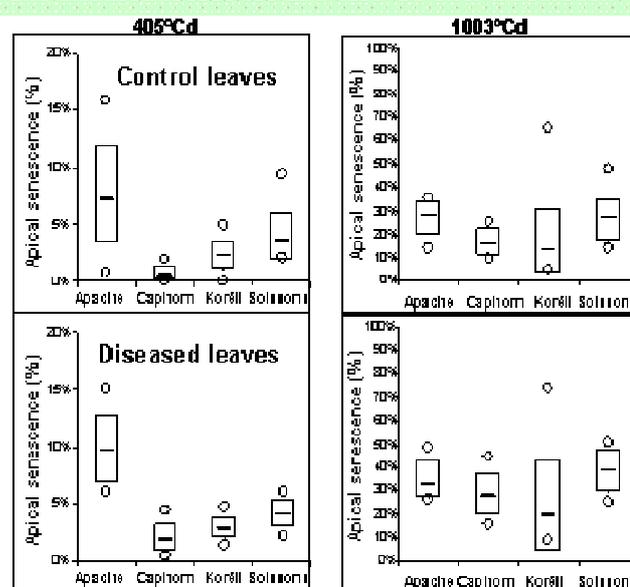


Results

Box plots per variety of local senescence in diseased leaves 405 and 1003°Cd after inoculation



Box plots per variety of apical senescence of control and diseased leaves 405 and 1003°Cd after inoculation



ANOVA on parameters of apical senescence

	Slope	Intercept
Covariate	ns	ns
Variety	+++	+++
Isolate	ns	**
Interaction	ns	ns

Covariate: AUDPC at 1003°Cd

Conclusion. According to our experimental conditions, apical senescence rate was conserved among inoculated and control flag leaves

ANNEXE IV

Dosage des acides aminés par le TNBS en microplaque

SYNOPSIS

Protocole TNBS (TNBS congelé)	
	μL
Echantillon	100
Tampon	50
1ère lecture de DO410 et DO460	
MR-TNBS	50
20 min d'incubation 20°C, puis DO410 et DO460	

OBJECTIF

Il s'agit de doser chimiquement les acides aminés par le TNBS (= Picryl Sulfonate) selon une méthode adaptée de: Brown HH (1968). A Study of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid for automated amino acid chromatography. *Clinical Chemistry* **14** 967-978)

Concentrations pendant la réaction: Na₂CO₃ 900 mM + NaHCO₃ 100 mM + TNBS 3 mM; pH 10,5

MOYENS TECHNIQUES

- a) Extraction: Dans le cadre de la thèse, ce dosage a été réalisé après reprise dans l'eau d'extraits d'échantillons lyophilisés par un mélange éthanol/eau 80% v/v. (l'extrait ne doit pas contenir de protéines).
- b) Tampon carbonate/bicarbonate: Carbonate de Sodium (Na₂CO₃ ≈ Fluka 71350) 1M: 4485 μL; Bicarbonate de Sodium (NaHCO₃ ≈ Fluka 71628) 1M: 515 μL
- c) Milieu réactionnel: MR-TNBS: TNBS (2,4,6 TriNitroBenzeneSulfonic acid solution 1M ≈ Fluka 82822) 1M: 30μL + Na₂CO₃ 1M: 4515 μL + NaHCO₃ 1M: 485 μL. Ce MR est instable et doit être utilisé le plus vite possible
- d) NB: La lecture est plus sensible à 410 nm, mais la coloration naturelle des échantillons étant souvent importante, on peut se rabattre sur 460 nm.
- e) Gamme étalon de glutamine (C₅H₁₀N₂O₃ ≈ Fluka 49420): entre 0 et 60 nmol/puits pour une lecture à 410 nm, et entre 0 et 120 nmol/puits pour une lecture à 460 nm.

ANNEXE V

Protocole de dosage des chlorophylles en microplaques

SYNOPSIS

Protocole Chl	
	μL
Echantillon	1000
Acétone	4000
20h d'incubation à 5°C	
Centrifuger 10 min à 8000 g	
Transférer 100 ou 200 μL dans une microplaque	
DO: lecture Triple 640/660/750 nm	

OBJECTIF

Il s'agit d'extraire les chlorophylles a et b par l'acétone 80 % v/v sur le culot d'extraction des activités enzymatiques (dosages colorimétriques des chlorophylles adapté de: MacKinney G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry* **140**: 315-322 et Arnon D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1-14)

MOYENS TECHNIQUES

a) Tampon d'extraction: c'est celui de décongélation des échantillon, soit un tampon MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid, sodium salt \approx Sigma M1254) 25 mM + β mercaptoéthanol 215 vpm (3 mM) + EDTA 1 mM; pH 7,6. On peut aussi directement extraire du matériel lyophilisé par de l'acétone à 80% v/v (\approx Fluka 179973).

b) Etalonnage: La méthode à été calibrée sur des étalons de chlorophylles (\approx Fluka 10865 et 25740) dont les concentrations en chlorophylles a et b étaient évaluées au spectrophotomètre selon le système d'équations de MacKinney (1941) et Arnon (1949):

$$\text{➤ } [\text{Chla}] \text{ (mg/L)} = 12.7 A_{663} - 2.69 A_{647}$$

$$\text{➤ } [\text{Chlb}] \text{ (mg/L)} = 22.6 A_{647} - 4.68 A_{663}$$

Les mêmes étalons ayant ensuite été lus en microplaque, on en a déduit deux nouveaux systèmes d'équations adapté à notre lecteur:

Pour 100 μL d'échantillon par puits

$$\text{➤ } [\text{Chla}] \text{ (}\mu\text{g/puits)} = -11,55 \cdot (A_{640} - A_{750}) + 8,71 \cdot (A_{660} - A_{750}) + 0,28 \cdot (A_{660} - A_{640})^2$$

$$\text{➤ } [\text{Chlb}] \text{ (}\mu\text{g/puits)} = 4,99 \cdot (A_{640} - A_{750}) + 0,22 \cdot (A_{660} - A_{750}) - 0,46 \cdot (A_{660} - A_{640})^2$$

Pour 200 μL d'échantillon par puits

$$\text{➤ } [\text{Chla}] \text{ (}\mu\text{g/puits)} = -16,75 \cdot (A_{640} - A_{750}) + 2,99 \cdot (A_{660} - A_{750}) + 1,43 \cdot (A_{660} - A_{640})^2$$

$$\text{➤ } [\text{Chlb}] \text{ (}\mu\text{g/puits)} = 3,00 \cdot (A_{640} - A_{750}) + 0,48 \cdot (A_{660} - A_{750}) - 0,02 \cdot (A_{660} - A_{640})^2$$

c) NB: Si l'un des puits dépasse DO = 0,8 pour 100 μL d'échantillon ou 1,8 pour 200 μL , diluer l'échantillon de moitié et recommencer la lecture

ANNEXE VI

Protocole de dosage des nitrates en microplaque

SYNOPSIS

Protocole NO₃ (MR et Rév congelés)	
	μL
Echantillon	100
DO0: lecture Double 520/750 nm	
MR-NO ₃	50
DO1: lecture Double 520/750 nm	
Rév-NO ₃ : Rév-0 ou Rév-1	50
1,5 à 20 h d'incubation à 20°C	
DO2: lecture Double 520/750 nm	



OBJECTIF

Il s'agit de doser les nitrites/nitrates par la méthode de Griess (adaptée de: Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5**(1) 62-71; 2001)

Concentrations pendant la réaction: Sulphanilamide 20 g/L, VCl₃ 1,67 g/L, HCl 0,33N

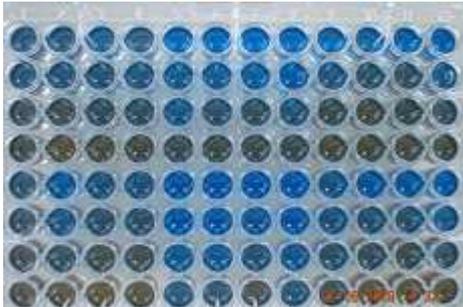
MOYENS TECHNIQUES

- a) Tampon d'extraction: pour des raisons pratiques, les nitrates sont dosés dans l'extrait qui sert à mesurer l'activité NR. Ce tampon contient 2 mM de βmercaptoéthanol qui inhibe partiellement la réaction et impose une concentration élevée en sulphanilamide.
- b) Milieu réactionnel MR-NO₃: Sulphanilamide (=4-aminobenzenesulfonamide C₆H₈N₂O₂S ≈ Merck 11799 ou Fluka 33626): 60 g/L (≈350 mM), VCl₃ (Chlorure de Vanadium (III) ≈ Aldrich 20.827.2 ou Fluka 14204): 5 g/L (≈32 mM), HCl: 1,0N
- c) Solution de non-révélation des nitrates "Rév-N03.0": H₂O
- d) Solution de révélation des nitrates "Rév-N03.1": NNEDD (=N-(1-naphthyl) ethylendiamin, dihydrochloride C₁₂H₁₄N₂, 2HCl ≈ Fluka 33461) 0,1 g/L (≈0,39 mM)
- e) Gamme étalon de nitrates entre 0 et 0,2 μg N-NO₃ /puits

ANNEXE VII

Protocole de dosage des protéines en microplaque

SYNOPSIS

Protocole Bradford (MR commercial)		
	μL	
Echantillon	20	
H2O	100	
= Echantillon dilué 1/6		
Prendre une nouvelle plaque		
MR-B/4	200	
DO0: lecture à 595 nm		
Echantillon dilué	20 ou 50	
DO1: lecture à 595 nm		
20 min d'incubation à 20°C		
DO2, lecture à 595 nm		

OBJECTIF

Il s'agit de doser par colorimétrie les protéines solubles dans tout solvant aqueux (méthode adaptée de: Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72** 248-254).

MOYENS TECHNIQUES

a) Tampon d'extraction: pour des raisons pratiques, les protéines sont dosés dans l'extrait qui sert à mesurer l'activité NR. Ce tampon (12,5 mL + 267 mg PVP /gMF) apporte MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid, sodium salt \approx Sigma M1254) 50 mM (pH 7,6), EDTA (sel disodique à 2 molécules d'eau \approx Fluka 03680) 2 mM, NaF 5 mM, NaMoO₄ 1μM, βmercaptoéthanol (\approx 143 vpm de βmercaptoéthanol 98 %; d = 1,113; MW = 78,13 g) 2 mM. Les concentrations obtenues étant trop élevées, on doit pratiquer une surdilution au 1/6 par de l'eau milli Q

b) Milieu réactionnel: solution commerciale de Bleu de Coomassie (Bio-Rad Protein Assay \approx Biorad 500-0006) diluée au 1/4 par de l'eau milli Q et utilisée extemporanément.

c) Gammes étalon de BSA (Serumalbumine bovine \approx Sigma A 7906): de 0 à 20 μg /puits. NB: on effectue deux dosages avec des volumes d'échantillons différents (20 μL et 50 μL) pour augmenter les chances d'être dans la plage de réponse. Cependant une même quantité de protéines donne des réponses légèrement différentes selon le volume utilisé. On effectuera donc deux gammes de BSA

ANNEXE VIII

Dosage de l'activité NR en microplaque

SYNOPSIS

Protocole NR (MR et Rév congelés)		
	μL	
Echantillon	50	
MR-NR 30 min d'incubation à 30°C DO1: lecture Double 520/750 nm	150	
Rév-NR: Rév-0 ou Rév-1 15 min- 20h d'incubation à 20°C DO2: lecture Double 520/750 nm	50	

OBJECTIF

Il s'agit de doser l'activité Nitrate Réductase NR (adaptée de: Ferrario-Mery et al. 1998: *Plant Physiology* **117** 293-302)

Concentrations des principaux réactifs pendant la réaction enzymatique: MOPS 50 mM pH 7,6 + NaF 5 mM +KNO₃ 9 mM +NADH 0,375 mM +EDTA 5 mM

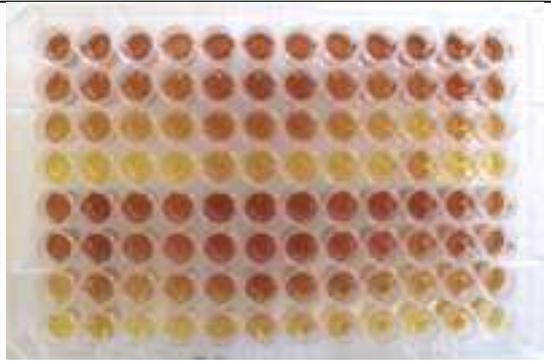
MOYENS TECHNIQUES

- a) Tampon d'extraction: le tampon (12,5 mL + 267 mg PVP /gMF) doit apporter MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid, sodium salt ≈ Sigma M1254) 50 mM (pH 7,6), EDTA (sel disodique à 2 molécules d'eau ≈ Fluka 03680) 2 mM, NaF 5 mM, NaMoO₄ 1μM, βmercaptoéthanol (≈143 vpm de βmercaptoéthanol 98 %; d = 1,113; MW = 78,13 g) 2 mM.
- b) Milieu réactionnel MR-NR: MOPS 50 mM, KNO₃ 12 mM, EDTA 6 mM, NaF 5 mM, NADH 0,5 mM; pH 7,6
- c) Solution de non-révélation des nitrites "Rév-NR0": Sulphanilamide (=4-aminobenzenesulfonamide C₆H₈N₂O₂S ≈ Merck 11799 ou Fluka 33626) 75 g/L (≈435 mM) dans HCl 1,25N
- d) Solution de révélation des nitrites "Rév-NR1": Sulphanilamide 75 g/L (≈435 mM), NNEDD (=N-(1-naphthyl) ethylendiamin, dihydrochloride C₁₂H₁₄N₂, 2HCl ≈ Fluka 33461)125 mg/L (≈0,48 mM) dans HCl 1,25N
- e) Gamme étalon de nitrites entre 0 et 20 nmol NO₂ /puits

ANNEXE IX

Protocole de dosage de l'activité GS en microplaque

SYNOPSIS

Protocole GS (MR et Rév congelés)		
	μL	
Echantillon	50	
MR-GS0 ou MR-GS1 30 min d'incubation à 30°C	100	
Rév-GS	100	
Centrifuger 10 min à 4000 rpm		
Transférer 200 μL dans une nouvelle plaque		
DOO, lecture à 520 nm		

OBJECTIF

Il s'agit de doser l'activité Glutamine Synthétase GS (adaptée de: O'Neal & Joy, *Arch Biochem Biophys* **159** 113-121; 1973)

Concentrations pendant la réaction enzymatique: Glu 80 mM; Hydroxylamine 20 mM; MgSO_4 (ou MgCl_2) 20 mM; EDTA 4 mM; ATP 20 mM; MOPS 100 mM; pH 7,6 (éviter le Tris, comme pour tout dosage impliquant l'ammonium)

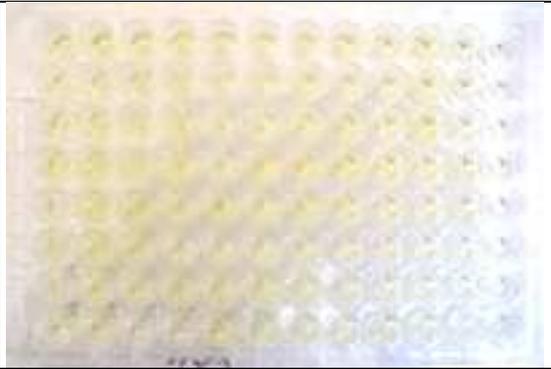
MOYENS TECHNIQUES

- Tampon d'extraction: Pour une extraction isolée, le tampon (12,5 mL + 267 mg PVP /gMF) doit apporter MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid, sodium salt \approx Sigma M1254) 25 mM (pH 7,6), EDTA (Acid EDTA, sel disodique à 2 molécules d'eau \approx Fluka 03680) 1 mM, MgCl_2 1 mM, β mercapto-éthanol 13,3 mM (=1‰ v/v)
- Milieu réactionnel MR-GS0 (sans substrat): MOPS 25 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 1 mM; pH 7,6
- Milieu réactionnel MR-GS1 (avec substrats): MOPS 137,5 mM, Glu (Acide glutamique $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \approx$ Fluka 49450) 120 mM, Hydroxylamine (NH_2OH , HCl hydroxylamine hydrochloride \approx Fluka 55460) 30 mM, ATP (Adénosine TriPhosphate, sel disodique hydraté à 5% \approx Fluka 02060) 30 mM, MgSO_4 29,5 mM, EDTA 5,5 mM; pH 7,6
- Solution de révélation du γ -GHM "Rév-GS": FeCl_3 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ chlorure ferrique hydraté \approx Fluka 31232) 370 mM, TCA (Cl_3CCOOH acide trichloracétique \approx Fluka 91232) 200 mM dans HCl 1,5 N
- Gamme étalon de γ -GHM ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ γ glutamic acid monohydroxamate \approx Sigma G2253) entre 0 et 2 μmol /puits

ANNEXE X

Protocole de dosage de l'activité GDH aminante en microplaque

SYNOPSIS

Protocole GDHa (MR et Rév congelés)		
	μL	
Echantillon	50	
MR-HA0 ou MR-HA1	100	
DO0, lecture à 340 nm		
30 min d'incubation à 30°C		
DO1, lecture à 340 nm		

OBJECTIF

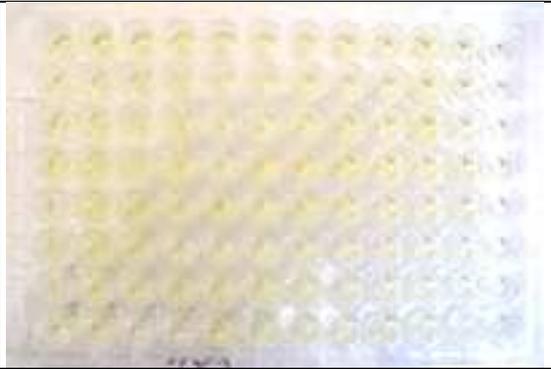
Il s'agit de doser l'activité Glutamate DéHydrogénase (GDH) dans le sens NADH dépendant (adaptée de: Chaffei *et al.* Implication du glutamate, de l'isocitrate et de la malate déshydrogénases dans l'assimilation de l'azote chez la tomate stressée par le cadmium *Comptes Rendus Biologies* **329** 790–803; 2006)

Concentrations pendant la réaction enzymatique: MOPS 100 mM, NH_4^+ 150 mM, acide α -cétoglutarique 10 mM, CaCl_2 1 mM, NADH 0,5 mM; pH 7,5 (éviter le Tris, comme pour tout dosage impliquant l'ammonium)

MOYENS TECHNIQUES

- Tampon d'extraction: Pour des raisons pratiques, cette activité est dosée dans l'extrait utilisé pour la GS. Le tampon (12,5 mL + 267 mg PVP /gMF) apporte MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid, sodium salt \approx Sigma M1254) 25 mM (pH 7,6), EDTA (Acid EDTA, sel disodique à 2 molécules d'eau \approx Fluka 03680) 1 mM, MgCl_2 1 mM, β mercapto-éthanol 13,3 mM (\approx 1% v/v). Le tampon MOPS 25 mM pH 7,6 apporté avec l'extrait a un effet négligeable (\approx 0,02) sur le pH final
- Milieu réactionnel MR-HA0 (sans substrat): MOPS 137,5 mM, NH_4^+ ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ Sulfate d'ammonium \approx Fluka 11225 Attention sel diamine) 225 mM, CaCl_2 1,5 mM, NADH (NADH, Na_2 , $2\text{H}_2\text{O}$ 88,2% Nicotinamine Adénine Dinucléotide reduced disodium salt \approx Sigma N6005) 0,75 mM; pH 7,5
- Milieu réactionnel MR-HA1 (avec substrat): MOPS 137,5 mM, NH_4^+ 225 mM, acide α -cétoglutarique ($=$ 2-Oxoglutaric acid $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5 \approx$ Fluka 75890) 15 mM, CaCl_2 1,5 mM, NADH 0,75 mM; pH 7,5
- Etalonnage: le milieu réactionnel apporte NADH à des niveaux proches de la saturation, et la réaction le dégrade progressivement. On ne peut donc apporter d'étalon dans le MR. On utilise la gamme de NADH réalisée pour le dosage de l'activité GDHd.

ANNEXE XI**Protocole de dosage de l'activité GDH dé aminante en microplaque****SYNOPSIS**

Protocole GDHd (MR et Rév congelés)		
	μL	
Echantillon	50	
MR-HD0 ou MR-HD1	100	
30 min d'incubation à 30°C		
	DO0, lecture à 340 nm	
	DO1, lecture à 340 nm	

OBJECTIF

Il s'agit de doser l'activité Glutamate DéHydrogénase (GDH) dans le sens NAD dépendant (adaptée de: Chaffei *et al.* Implication du glutamate, de l'isocitrate et de la malate déshydrogénases dans l'assimilation de l'azote chez la tomate stressée par le cadmium *Comptes Rendus Biologies* **329** 790–803; 2006)

Concentrations pendant la réaction enzymatique: TEA 100 mM; Glu 200 mM; CaCl₂ 1 mM; NAD 1 mM; pH 8,0 (éviter le Tris, comme pour tout dosage impliquant l'ammonium)

MOYENS TECHNIQUES

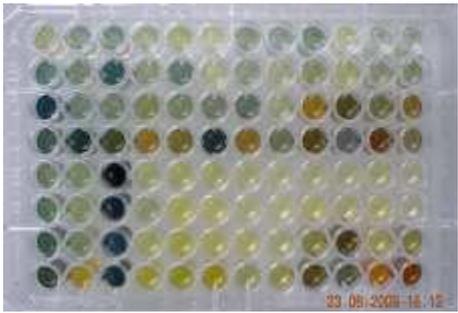
- f) Tampon d'extraction: Pour des raisons pratiques, cette activité est dosée dans l'extrait utilisé pour la GS. Le tampon (12,5 mL + 267 mg PVP /gMF) apporte MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid, sodium salt ≈ Sigma M1254) 25 mM (pH 7,6), EDTA (Acid EDTA, sel disodique à 2 molécules d'eau ≈ Fluka 03680) 1 mM, MgCl₂ 1 mM, βmercapto-éthanol 13,3 mM (=1‰ v/v). Le tampon MOPS 25 mM pH 7,6 apporté avec l'extrait a un effet négligeable (≈ 0,02) sur le pH final.
- g) Milieu réactionnel MR-HD0 (sans substrats): TEA 150 mM, CaCl₂ 1,5 mM; pH 8,0
- h) Milieu réactionnel MR-HD1 (avec substrats): TEA 150 mM, CaCl₂ 1,5 mM, Glu (Acide glutamique C₅H₉NO₄ ≈ Fluka 49450) 300 mM, NAD (Nicotinamine Adénine Dinucléotide ≈ Fluka 43410) 1,5 mM; pH 8,0
- i) Gamme étalon de NADH (Nicotinamine Adénine Dinucléotide reduced disodium salt ≈ Sigma N6005) entre 0 et 150 nmol /puits

ANNEXE XII

Protocole de dosage des activités endoprotéases neutres en microplaque

SYNOPSIS

Protocole Endoprotéases (Substrat solide)	
	μL
Substrat	10 mg
Tampon de gonflage	50
1-16 h d'incubation à 5°C	
Echantillon	500
180 min d'incubation à 30°C	
centrifugation 10 min 4000 rpm	
Prendre une nouvelle plaque	
Echantillon incubé	150
DO1: lecture à 595 nm (la DO0 est faite ailleurs)	



OBJECTIF

Il s'agit de doser les endoprotéases par un substrat spécifique (de type azuro-caséine) en référence à une activité protéase standard.

MOYENS TECHNIQUES

a) Tampon d'extraction: Pour une extraction isolée, le tampon doit être à pH 7,0. Pour des raisons pratiques, on décongèle l'échantillon dans un tampon MOPS (4-morpholine propane sulfonic acid, sodium salt \approx Sigma M1254) 25 mM + β mercaptoéthanol 215 vpm (3 mM) EDTA 1 mM; pH 7,6. Le pH du tampon (7,6 mL + 267 mg PVP /gMF) devra donc être rectifié

b) Substrat: 10 ± 1 mg (Megazyme T-PRAK 200) d'azocaséine insoluble. Pesée pour chaque puits en macroplaque (1 mL /puits), puis prégonflage du substrat dans 50 μ L de tampon MOPS 300 mM; pH 6,65. Le pH obtenu après mélange avec 500 μ L d'extrait est de 7,0.

c) NB: on estime la coloration naturelle de l'échantillon à 595 nm (DO0) d'après une mesure annexe à cette longueur d'onde de 100 μ L d'échantillon lors du dosage des nitrates.

d) Gamme étalon de trypsine (Sigma T4799): 0-4 BAEE /puits. NB: la réponse du substrat dépend très fortement de l'enzyme étudiée, et n'est pas très linéaire. Après étalonnage, on définira 1 UA (unité arbitraire) comme l'activité endoprotéase aboutissant à la même coloration que 1 BAEE de trypsine étalon.

ANNEXE XIII

Moyenne et écart-types obtenus par les ajustements logistique de la surface verte (cm^2/brin) selon les différentes modalités expérimentales de l'expérimentation de 2008 au champ.

Tableau XIII-1: Surface verte maximale (cm^2/brin) par modalité expérimentale. Moyenne \pm écart type de trois ajustements

CV:	FON:	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	69,2 \pm 1,2	90,8 \pm 1,4	104,6 \pm 0,7
	Non Traité	68,2 \pm 2,6	84,7 \pm 0,9	100,1 \pm 0,9
Bastide	Traité	72,7 \pm 0,1	102,5 \pm 3,4	107,7 \pm 2,6
	Non Traité	71,4 \pm 1,7	96,6 \pm 3,7	102,2 \pm 3,7

Tableau XIII-2: Point d'inflexion (djA) de la surface verte totale par modalité expérimentale. Moyenne \pm écart type de trois ajustements

CV:	FON:	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	501 \pm 7	496 \pm 5	485 \pm 7
	Non Traité	376 \pm 6	385 \pm 2	330 \pm 11
Bastide	Traité	463 \pm 6	459 \pm 11	424 \pm 9
	Non Traité	369 \pm 11	339 \pm 19	312 \pm 15

Tableau XIII-3: Taux de décroissance initial ($\% \text{dj}^{-1}$) de la surface verte totale par modalité expérimentale. Moyenne \pm écart type de trois ajustements

CV:	FON:	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	-2,2 \pm 0,5	-1,3 \pm 0,1	-1,2 \pm 0,1
	Non Traité	-1,4 \pm 0,1	-1,4 \pm 0,1	-1,0 \pm 0,0
Bastide	Traité	-1,8 \pm 0,2	-1,3 \pm 0,2	-1,0 \pm 0,1
	Non Traité	-1,6 \pm 0,4	-1,2 \pm 0,1	-1,0 \pm 0,1

Tableau XIII-4: Durée entre 5% et 95% de sénescence (dj) pour la surface verte totale par modalité expérimentale. Moyenne \pm écart type de trois ajustements

CV:	FON:	2008.1	2008.2	2008.3
Soissons	Traité	279 \pm 66	452 \pm 27	504 \pm 24
	Non Traité	410 \pm 16	429 \pm 16	576 \pm 11
Bastide	Traité	330 \pm 38	457 \pm 64	619 \pm 37
	Non Traité	373 \pm 94	510 \pm 64	595 \pm 47

ANNEXE XIV

Valeurs moyennes et écarts-types (*en italique*) des contenus en azote des feuilles 1, 2 et 3 pour chaque modalité (variété x traitement azoté x traitement fongicide) depuis la floraison jusqu'à maturité physiologique.

Les résultats de l'analyse de variance multi factorielle par date, avec les interactions de premier ordre, est figurée pour chaque feuille, avec ns, P>5%; *, P<1%; **, P<0.1%; ***, P<0.01%, selon le test de Bonferroni.

A- Feuille 1

Cv	Feuille 1		Date								
	Azote	Fongicide	19-20/5	23-27/5	30-3/6	6-10/6	13-17/6	20-24/6	27-1/7	4-8/7	11-15/7
Contenu en azote par feuille (mg par feuille)											
Soissons	2008-1	Traité	5.06	6.04	6.73	6.28	4.85	4.52	2.19	0.75	0.74
			<i>0.67</i>	<i>0.33</i>	<i>0.81</i>	<i>0.40</i>	<i>0.56</i>	<i>0.28</i>	<i>0.06</i>	<i>0.02</i>	<i>0.08</i>
Soissons	2008-1	Non Traité	5.06	5.82	7.65	6.16	5.23	3.31	2.01	2.09	2.45
			<i>0.67</i>	<i>0.24</i>	<i>0.59</i>	<i>0.30</i>	<i>0.42</i>	<i>0.19</i>	<i>0.03</i>	<i>0.27</i>	<i>0.18</i>
Bastide	2008-1	Non Traité	6.48	7.07	7.11	7.14	6.23	4.02	1.62	0.96	0.78
			<i>0.33</i>	<i>0.42</i>	<i>0.29</i>	<i>0.31</i>	<i>0.43</i>	<i>0.08</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.02</i>
Bastide	2008-1	Non T	6.48	7.47	7.37	6.74	6.24	3.39	2.87	2.73	2.64
			<i>0.33</i>	<i>0.33</i>	<i>0.85</i>	<i>0.11</i>	<i>0.33</i>	<i>0.06</i>	<i>0.17</i>	<i>0.15</i>	<i>0.24</i>
Soissons	2008-2	Traité	6.01	5.97	6.15	6.20	5.30	5.01	2.33	0.79	0.62
			<i>1.12</i>	<i>0.97</i>	<i>0.34</i>	<i>0.14</i>	<i>0.17</i>	<i>0.25</i>	<i>0.09</i>	<i>0.03</i>	<i>0.07</i>
Soissons	2008-2	Non Traité	6.01	5.27	5.70	5.69	5.70	4.14	2.40	2.12	1.80
			<i>1.12</i>	<i>0.69</i>	<i>0.19</i>	<i>0.34</i>	<i>0.51</i>	<i>0.22</i>	<i>0.14</i>	<i>0.26</i>	<i>0.05</i>
Bastide	2008-2	Traité	6.92	7.36	6.86	6.60	5.82	4.46	2.13	0.96	0.83
			<i>0.53</i>	<i>1.07</i>	<i>0.47</i>	<i>0.05</i>	<i>0.37</i>	<i>0.31</i>	<i>0.25</i>	<i>0.15</i>	<i>0.04</i>
Bastide	2008-2	Non Traité	6.92	6.95	7.03	6.78	6.65	4.53	2.19	2.44	2.69
			<i>0.53</i>	<i>0.40</i>	<i>0.51</i>	<i>0.78</i>	<i>0.40</i>	<i>0.19</i>	<i>0.09</i>	<i>0.19</i>	<i>0.10</i>
Soissons	2008-3	Traité	7.35	7.35	7.15	8.08	6.77	6.96	3.72	0.92	1.15
			<i>0.35</i>	<i>0.86</i>	<i>0.45</i>	<i>0.79</i>	<i>0.17</i>	<i>0.35</i>	<i>0.40</i>	<i>0.06</i>	<i>0.10</i>
Soissons	2008-3	Non Traité	7.35	7.17	6.82	6.02	6.40	4.94	2.74	3.52	2.29
			<i>0.35</i>	<i>0.65</i>	<i>0.11</i>	<i>0.31</i>	<i>0.48</i>	<i>0.25</i>	<i>0.18</i>	<i>0.18</i>	<i>0.09</i>
Bastide	2008-3	Traité	9.39	7.96	8.16	6.87	6.95	5.60	3.07	1.09	0.84
			<i>0.38</i>	<i>0.82</i>	<i>1.61</i>	<i>0.11</i>	<i>1.16</i>	<i>0.45</i>	<i>0.05</i>	<i>0.10</i>	<i>0.10</i>
Bastide	2008-3	Non Traité	9.39	8.11	8.03	7.64	7.82	3.68	2.90	3.45	2.84
			<i>0.38</i>	<i>0.71</i>	<i>0.27</i>	<i>0.58</i>	<i>0.29</i>	<i>0.16</i>	<i>0.09</i>	<i>0.39</i>	<i>0.09</i>
ANOVA											
Cv			***	***	*	*	***	***	ns	*	***
N			***	**	*	*	***	***	***	***	**
Fon				ns	ns	ns	ns	***	ns	***	***
Cv x N			ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	**
Cv x Fon				ns	ns	*	ns	*	**	ns	***
N x Fon				ns	ns	ns	ns	***	***	***	ns

ANNEXE XIV (suite)

B- Feuille 2

Cv	Feuille 2		Date								
	Azote	Fongicide	19-20/5	23-27/5	30-3/6	6-10/6	13-17/6	20-24/6	27-1/7	4-8/7	11-15/7
Contenu en azote par feuille (mg par feuille)											
Soissons	2008-1	Traité	3.16 0.19	3.08 0.06	3.47 0.19	2.73 0.41	2.85 0.13	2.29 0.21	0.87 0.03	0.44 0.04	0.42 0.02
Soissons	2008-1	Non Traité	3.16 0.19	2.87 0.19	3.39 0.35	2.76 0.08	2.35 0.16	1.45 0.08	1.37 0.08	1.34 0.15	1.46 0.13
Bastide	2008-1	Non Traité	3.57 0.22	3.86 0.35	3.37 0.47	3.28 0.21	2.91 0.17	1.99 0.26	0.66 0.04	0.62 0.11	0.65 0.02
Bastide	2008-1	Non T	3.57 0.22	4.44 0.44	4.41 0.43	3.78 0.28	3.76 0.27	1.79 0.06	2.31 0.11	2.23 0.30	2.02 0.11
Soissons	2008-2	Traité	4.69 0.25	4.95 0.08	5.05 0.14	3.95 0.44	3.83 0.06	3.43 0.07	1.58 0.14	0.66 0.02	0.63 0.02
Soissons	2008-2	Non Traité	4.69 0.25	4.46 0.06	4.68 0.38	4.46 0.48	3.50 0.20	2.77 0.01	2.14 0.12	1.81 0.08	1.84 0.05
Bastide	2008-2	Traité	6.20 0.29	5.95 0.01	5.58 0.08	4.80 0.15	5.16 0.19	3.12 0.30	1.26 0.10	1.09 0.13	0.78 0.01
Bastide	2008-2	Non Traité	6.20 0.29	6.02 0.29	5.60 0.24	4.96 0.23	4.12 0.29	2.65 0.16	2.19 0.08	2.57 0.38	1.96 0.10
Soissons	2008-3	Traité	6.47 0.28	6.11 0.21	4.89 0.19	4.91 0.61	4.91 0.35	3.99 0.44	1.64 0.12	1.06 0.07	1.07 0.03
Soissons	2008-3	Non Traité	6.47 0.28	5.77 0.02	4.87 0.21	4.67 0.31	3.90 0.08	2.46 0.03	2.09 0.09	2.03 0.11	1.88 0.04
Bastide	2008-3	Traité	6.75 0.40	6.44 0.12	5.38 0.65	5.19 0.22	4.95 0.29	3.20 0.18	1.39 0.13	0.94 0.08	0.95 0.03
Bastide	2008-3	Non Traité	6.75 0.40	6.24 0.26	5.42 0.29	4.70 0.15	4.06 0.08	2.23 0.13	2.69 0.22	2.57 0.13	2.17 0.07
ANOVA											
Cv			***	***	***	**	***	*	*	***	***
N			***	***	***	***	***	***	***	***	***
Fon				ns	ns	ns	**	***	***	***	***
Cv x N			***	**	ns	ns	*	*	*	*	*
Cv x Fon				*		ns	ns	*	***	***	**
N x Fon					ns		**	**		ns	ns

ANNEXE XIV (suite)

C- Feuille 3

Cv	Feuille 3		Date								
	Azote	Fongicide	19-20/5	23-27/5	30-3/6	6-10/6	13-17/6	20-24/6	27-1/7	4-8/7	11-15/7
Contenu en azote par feuille (mg par feuille)											
Soissons	2008-1	Traité	1.54 0.02	1.55 0.09	1.89 0.09	1.53 0.16	1.55 0.05	1.07 0.12	0.40 0.02	0.33 0.01	0.35 0.02
Soissons	2008-1	Non Traité	1.54 0.02	1.50 0.03	1.75 0.14	1.51 0.17	1.16 0.04	0.80 0.08	0.64 0.01	0.65 0.01	0.99 0.11
Bastide	2008-1	Non Traité	1.59 0.15	1.77 0.05	1.78 0.04	1.53 0.11	1.34 0.13	0.49 0.03	0.43 0.07	0.50 0.04	0.39 0.03
Bastide	2008-1	Non T	1.59 0.15	2.13 0.09	1.99 0.12	1.72 0.03	1.48 0.05	0.85 0.06	1.01 0.03	0.94 0.11	0.91 0.07
Soissons	2008-2	Traité	2.15 0.13	2.46 0.09	2.51 0.11	1.95 0.15	2.02 0.07	1.34 0.08	0.51 0.05	0.56 0.01	0.52 0.01
Soissons	2008-2	Non Traité	2.15 0.13	1.93 0.24	2.21 0.13	2.27 0.42	1.63 0.03	1.33 0.02	1.04 0.08	0.95 0.05	0.94 0.10
Bastide	2008-2	Traité	3.19 0.19	2.80 0.08	2.87 0.12	2.47 0.08	2.43 0.08	0.98 0.11	0.92 0.08	0.76 0.12	0.57 0.01
Bastide	2008-2	Non Traité	3.19 0.19	3.51 0.26	3.06 0.25	2.28 0.11	1.61 0.07	1.52 0.15	1.44 0.10	1.40 0.13	1.20 0.05
Soissons	2008-3	Traité	3.07 0.31	3.19 0.35	2.32 0.17	2.39 0.36	2.12 0.11	1.61 0.05	0.88 0.03	0.74 0.04	0.63 0.06
Soissons	2008-3	Non Traité	3.07 0.31	3.00 0.11	2.78 0.10	1.84 0.47	1.26 0.10	0.93 0.13	0.92 0.07	0.75 0.04	0.77 0.03
Bastide	2008-3	Traité	2.92 0.29	3.00 0.13	2.11 0.12	2.05 0.19	1.98 0.02	0.95 0.08	0.91 0.08	0.68 0.05	0.65 0.03
Bastide	2008-3	Non Traité	2.92 0.29	2.73 0.06	1.67 0.18	1.47 0.05	1.29 0.10	1.09 0.01	1.10 0.05	1.03 0.07	0.95 0.05
ANOVA											
Cv			**	***	ns	ns	ns	***	***	***	*
N			***	***	***	***	***	***	***	***	**
Fon				ns	ns	ns	***	ns	***	***	***
Cv x N			***	***	***		ns		***	*	
Cv x Fon				*	ns	ns	ns	***	*	***	ns
N x Fon				ns	ns	*	***	***	***	***	***

STB effect on senescence and nitrogen fluxes during grain filling in bread wheat

Abstract

Septoria tritici blotch caused by the hemibiotrophic pathogen (*Mycosphaerella graminicola*) is among the most damaging diseases of wheat in the north of Europe. It causes important yield and quality losses. Its main effect is a green leaf area loss which correlates well to yield losses but to a lesser extent to variations in grain protein concentration. Variations in grain nitrogen (N) are not well understood, and their relationship with green area losses less stable.

The objectives of this work are to better understand 1) the behaviour of N metabolism and fluxes in the plant when varying N availability by leaves manipulation, 2) fungus impact on plant senescence, while separating local effect around the disease symptoms and remote effect at leaf apex and in healthy organs, and finally 3) the behaviour of N metabolism and fluxes in the plant and in the diseased leaves in the case of natural epidemics.

A first experiment impaired nitrogen remobilisation of healthy plants in the absence of post-anthesis absorption. Cutting or wrapping leaves 2nd and 3rd upper leaf blades suddenly varied nitrogen availability for the remaining parts of the plant. Grain nitrogen filling rate is not driven by the grain demand. In fact, reducing N availability immediately leads to a reduced rate of N filling without any compensation by the other organs; while increasing N availability does not modify the rate of grain N filling because of a temporary storage in stems or sheaths which up-regulated nitrogen flash resulting from the sharp senescence of wrapped leaves.

The green leaf area loss results from: i) septoria symptoms, ii) local senescence developing around disease necrosis, and iii) apical senescence. Because this latter is highly correlated to N remobilization in healthy plants, its modification in diseased plants would suggest that remobilization regulation is perturbed in diseased plants. Various contrasted septoria kinetics were evaluated for their ability to modify apical senescence, thus combining either cultivar × isolate or cultivar × crop managements, in greenhouse or in natural conditions, with diseased surfaces varying from 0 to 70%. Symptoms and apical senescence evolutions were followed on tagged plants using a non destructive way. In almost all cases, the effects of septoria on apical senescence rate were weak enough to stay within the experimental noise. These results strongly suggest that apical senescence is either not or hardly affected by septoria, and that only local senescence would be important in the decrease of green area.

The effects of the disease on different biochemical markers of N metabolism and on grain N filling were studied on crops grown under contrasted management strategies referring to previous results. Nitrogen kinetics of non infected organs was never modified by the leaf disease. In diseased leaves, N assimilation metabolism prematurely switched to a degradation and remobilisation metabolism. NR activity disappeared as well as N uptake. Early degradation of N balance in diseased leaves would be caused by the stopping of absorption rather than by an accelerated remobilisation rate. Thus, diseased leaves would export N at the same rate than the healthy ones, as suggested by their unchanged rate of apical senescence. This explains why the rate for grain N filling remains unaffected at the beginning of the disease. Final grain N is however decreased because diseased leaves stopped prematurely to export N when their green surface disappeared. Such a blockage could be related to N incorporation in fungal tissues.

Key words:

Bread wheat, septoria leaf blotch, *Mycosphaerella graminicola*, nitrogen remobilisation, post-anthesis absorption, grain nitrogen filling, apical senescence, sink/source relationship

Effets de la septoriose foliaire sur la sénescence et les flux d'azote pendant le remplissage des grains chez le blé tendre

Résumé

La septoriose foliaire du blé causée par le champignon hémibiotrophe (*Mycosphaerella graminicola*) est la maladie la plus nuisible au nord de l'Europe, entraînant des pertes de rendement et de qualité importantes. Le principal effet de la maladie semble être la perte de surface verte, qui explique très bien les pertes de rendement mais moins bien les variations de teneur en protéines des grains. Les variations d'azote (N) du grain sont bien moins comprises et leur lien à la baisse de surface verte moins stable.

L'objectif de ce travail est donc de mieux comprendre 1) la réponse du métabolisme et des flux N à une manipulation des sources chez des plantes saines, 2) l'influence du champignon sur la sénescence de la plante, en distinguant l'effet localisé autour des symptômes de ceux à distance à l'apex des feuilles atteintes et dans les organes sains, 3) en conditions d'infection naturelle, la réponse du métabolisme et des flux N dans la plante et dans les feuilles malades.

Une première expérience perturbe la remobilisation N de plantes saines sans absorption post-floraison. L'ablation ou l'emballage des 2^{ème} et 3^{ème} feuilles supérieures a fait varier brutalement la disponibilité N pour le reste de la plante. Les grains ne régulent pas eux-mêmes leur vitesse de remplissage N. Ainsi, une diminution de disponibilité N se traduit immédiatement par un ralentissement du remplissage N sans compensation par les autres organes. L'augmentation de disponibilité N ne modifie pas la vitesse de remplissage N des grains, en raison d'un stockage temporaire dans les tiges ou les gaines, qui écrête le flush N lié à la sénescence brutale des feuilles emballées.

La perte de surface verte provient i) des symptômes de la septoriose ii) de la sénescence locale induite autour de ces nécroses et iii) de la sénescence apicale. Cette dernière étant liée à la remobilisation N chez les plantes saines, sa modification chez les plantes malades suggérerait une perturbation de la régulation de la remobilisation. Diverses manières de créer des cinétiques contrastées de septoriose et de sénescence apicale ont été utilisées (combinaisons variété × isolat ou variété × conduite agricole) avec des surfaces septoriées allant de 0% à 70%, en serre ou conditions naturelles. Les évolutions des symptômes et de la sénescence apicale ont été suivies de manière non destructive. Dans la plupart des cas, les effets de la septoriose sur le taux de sénescence apicale sont assez faibles pour être couverts par le bruit expérimental. Ces résultats suggèrent fortement que la sénescence apicale n'est pas ou peu affectée par la septoriose, et que seule la sénescence locale autour des lésions aurait une importance dans la diminution de surface verte.

L'effet de la maladie sur divers marqueurs biochimiques du métabolisme N de la feuille malade et ses répercussions sur le remplissage N des grains ont été étudiés sous des conduites agricoles contrastées en s'appuyant sur les résultats des chapitres précédents. La cinétique N des organes non infectés n'est jamais modifiée par la maladie des feuilles. Dans les feuilles malades le métabolisme d'assimilation est prématurément remplacé par un métabolisme de dégradation et remobilisation. L'activité NR disparaît, et l'absorption d'azote avec elle. La dégradation précoce du bilan N des feuilles malades serait due à l'arrêt de l'absorption plutôt qu'à une accélération de la remobilisation N. Donc les feuilles malades exporteraient à la même vitesse que les saines, comme le suggère l'absence de modification de leur sénescence apicale. Ceci explique que la vitesse de remplissage N des grains est constante au début de la maladie. L'azote final des grains est cependant diminué car les feuilles malades arrêtent prématurément d'exporter de l'azote quand leur surface verte s'annule. Ce blocage pourrait être lié à l'incorporation d'azote dans les tissus du champignon.

Mots clés: Blé tendre, septoriose foliaire, *Mycosphaerella graminicola*, remobilisation d'azote, absorption post-floraison, remplissage des grains en azote, sénescence apicale, relation source/puits.